

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 23, 1985, pp. 117–127

Methodische und klinische Evaluation einer neuen enzymimmunologischen Methode zur Bestimmung des Thyroxin bindenden Globulins (TBG) und des T₄/TBG-Quotienten: Eine multizentrische Studie

Von *Anne-Ch. Kessler*

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim und Tutzing

K. H. Rudorff

Gemeinschaftskrankenhaus, Herdecke

M. Oellerich

Institut für Klinische Chemie der Medizinischen Hochschule, Hannover

K. Horn

Medizinische Klinik Innenstadt der Universität München

J. Mattersberger

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim und Tutzing

R. D. Hesch

Endokrinologische Abteilung der Medizinischen Hochschule, Hannover

und Beteiligte:

C. Bernutz, Medizinische Klinik Innenstadt der Universität München

S. L. Braun, Klinikum Großhadern, München

E. Digeon, Centre Hospitalier, Chambéry

G. Galvan, Landeskrankenanstalten, Salzburg

H. Haindl, Medizinische Hochschule, Hannover

K. Hengst, Universitätsklinik, Münster

S. C. Kampf, Marienkrankenhaus, Hamburg

K. Kleesiek, Universitätsklinik, Aachen

F. Rovelli, Ospedale Monza

F. Schulz, Universitätsklinik, Frankfurt

W. Vogt, Klinikum Großhadern, München

H. Wagner, Universitätsklinik, Münster

(Eingegangen am 1. Juni/24 Oktober 1984)

Zusammenfassung: Zur Bestimmung des Thyroxin bindenden Globulins (TBG) wurde ein heterogener Enzymimmunoassay entwickelt und in 12 Laboratorien evaluiert. Der Test beruht auf dem Kompetitionsprinzip und setzt mit anti-TBG Antikörper (Ziege) beschichtete Polystyrolröhrchen als Festphase ein. Über den

Konzentrationsbereich von 4–40 mg/l TBG wurden bei Präzision in der Serie Variationskoeffizienten von 1,4–8,9% und von Tag zu Tag von 2,9–8,6% gemessen. Unter Verwendung einer chemisch hochreinen TBG-Präparation als Standard ergaben sich im Methodenvergleich zu verschiedenen TBG-Radioimmunoassays mit Enzymun-Test® TBG durchschnittlich 30% niedrigere Ergebnisse. In einer umfangreichen Referenzwertermittlung fand sich in dem normal verteilten Kollektiv schilddrüsengesunder Kontrollpersonen zwischen 18 und 50 Jahren ein Median von 14,33 mg/l TBG, 95% aller Werte lagen zwischen 9,6–18,5 mg/l TBG. Der Medianwert bei Frauen von 14,5 mg/l TBG lag signifikant höher als bei Männern mit 13,4 mg/l TBG. Hyperthyreote Patienten lagen im Referenzbereich, während hypothyreote Patienten erhöhte TBG Konzentrationen zeigten. Bei Frauen unter Östrogen Therapie (Median: 22,2 mg/l TBG) und in der Schwangerschaft (Median: 28,5 mg/l TBG) wurden stark erhöhte TBG-Konzentrationen gemessen. Die Quotienten T_4 /TBG ermöglichen eine differenzierte Zuordnung zu euthyreoten (Median: 4,9), hyperthyreoten (Median: 11,3) und hypothyreoten (Median: 1,0) Stoffwechsellagen. In der Schwangerschaft liegen die Quotienten (Median: 3,1) im Vergleich zu den Kontrollpersonen signifikant niedriger.

Methodological and clinical evaluation of a new enzyme immunological method for the determination of thyroxine binding globulin (TBG) and the T_4 /TBG ratio

Summary: A heterogeneous enzyme immunoassay for the determination of thyroxine binding globulin (TBG) was developed and assessed in clinical trials in 12 laboratories. The assay is based on the competition principle and employs plastic tubes coated with goat anti-TBG. CV's between 1.4–8.9% for intra-assay precision and 2.9–8.6% for inter-assay precision were found over the concentration range of 4–40 mg/l TBG. In comparative studies using highly purified TBG as standard, values with Enzymun-Test® TBG were found to be on average 30% lower than those obtained by various TBG-RIAs. A broad-base study, to determine reference values, was carried out on a group of control persons 18 to 50 years old without previous history of thyroid disease. This study revealed a median of 14.33 mg/l TBG, with 95% of all values between 9.6 and 18.5 mg/l TBG. The median in women of 14.5 mg/l TBG was significantly higher than in men (13.4 mg/l TBG). TBG values in hyperthyroid patients were within the reference range while those in hypothyroid individuals were elevated. Highly elevated TBG values were seen in women receiving oestrogen (median: 22.2 mg/l TBG) and in pregnant women (median: 28.5 mg/l TBG). The T_4 /TBG ratios made it possible to distinguish between euthyroid, hyperthyroid and hypothyroid subjects (median: 4.9, 11.3 and 1.0, respectively). These ratios were significantly lower in pregnant women (median: 3.1) than in the control persons.

Einführung

Das Thyroxin bindende Globulin (TBG) ist das Transportprotein für Iodthyronine mit der höchsten Affinität (1). Seine Aminosäurezusammensetzung ist bekannt, obwohl sie in unterschiedlichen Arbeiten verschieden angegeben wird (2, 3). Seine Aminosäuresequenz ist nur teilweise aufgeklärt, da genügend Mengen an hochreinem TBG für solche Analysen bislang nicht vorlagen (4). Trotz dieses Mangels ist die physiko-chemische Funktion von TBG hinreichend untersucht (1–7). Die radioimmunchemische Bestimmung von TBG hat in den letzten Jahren immer mehr zu einer wertvollen Bereicherung in der Schilddrüsendiagnostik selbst beigetragen (3, 8–16). Dies gilt vor allem auch für extrathyreoidale Miterkrankungen und Störungen der Proteinsynthese, die sich in Konzentrationsänderungen des TBG niederschlagen. Die Aussagekraft von Konzentrationsänderungen des TBG ist hoch, und über das Thyroxin/

Thyroxin bindende Globulin (T_4 /TBG)-Verhältnis kann die Fraktion des freien T_4 errechnet werden (14). Wir sehen in der getrennten Bestimmung von zwei kenngrößenabhängigen Größen einen großen klinischen Vorteil gegenüber der direkten Bestimmung von freiem T_4 . Die Problematik der TBG-Bestimmung liegt in ihrer bisher mangelnden Standardisierung. Aus Mangel an genügend hochreinem, chemisch gut charakterisierten TBG liegt keine einheitliche Referenzpräparation und damit kein gültiger Referenzbereich vor. Dies hat vor allem in der Klinik zu einer Unsicherheit gegenüber der TBG-Bestimmung geführt. Wir haben daher TBG erneut hochgereinigt und chemisch charakterisiert, worüber an anderer Stelle berichtet wird. Mit dem so gewonnenen TBG-Präparat wurde ein Enzymimmunoassay aufgebaut. In einer multizentrischen Studie wurden methodische und klinische Untersuchungen zur Etablierung dieser TBG-Bestimmung durchgeführt, über die im folgenden berichtet werden soll.

Material und Methoden

Ionenaustauschermaterialien und Gelfiltrationsmedien wurden von der Firma Pharmacia, Freiburg, FRG, bezogen. Das Affinitätsadsorbens zur Immunsorption des anti-TBG wurde von Boehringer Mannheim (Best.-Nr. 665525) bezogen. Die Kopplung von TBG an den Adsorber (Spherosil) erfolgte nach mitgelieferter Vorschrift.

L-Thyroxin (freie Säure, p. A.) wurde von der Firma Henning, Berlin, FRG, bezogen. L-Thyroxin wurde an epoxyaktivierte Sepharose nach der von *Kågedal & Källberg* (17) beschriebenen Methode gekoppelt.

Elektrophoresen wurden nach *Lämmli* (18) durchgeführt. Die Reduktion und Denaturierung des TBG erfolgte durch Inkubation mit Dithioerythrit (10 g/l) und Erhitzen auf 100°C für 2 min. Die Aminosäure-Analyse des TBG erfolgte nach der Methode von *Spackmann* (19) an einem Beckman-Aminosäure-Analysator 121 c. Die Mikroheterogenität des TBG wurde nach *Gärtner* (20) untersucht.

TBG-Isolierung

TBG wurde nach der Methode von *Kågedal & Källberg* (17) mit einigen Modifikationen aus einem Pool von frischen Normalhumanseren isoliert.

Zunächst wurden Lipoproteine und Gerinnungsfaktoren durch Aerosilbehandlung aus dem Serum entfernt und die γ -Globulinfraktion durch Ammoniumsulfatfällung abgetrennt. Die weitere Aufreinigung erfolgte in 3 Schritten:

- Immunsorption des TBG an T₄-Epoxy-Sepharose und Elution mit 8-Anilinonaphthalin-sulfonsäure-(1) Ammoniumsalz
- Diethylaminoethyl-Sephacel-Ionenaustausch-Chromatographie
- Sephacryl S 200-Chromatographie.

Die Ausbeute mit diesem Verfahren betrug 50%. Die Reinheit des mit diesem Isolierverfahren erhaltenen TBG wurde in der SDS-Flachgel-Elektrophorese überprüft. Die Elektrophorese zeigte auch bei starker Überladung der TBG-Bande keine weiteren Banden. Unter den gewählten Bedingungen wäre eine Verunreinigung mit Fremdproteinen >0,5% im Gel feststellbar gewesen.

Charakterisierung des TBG

In der SDS-Gelelektrophorese zeigte das gereinigte TBG eine homogene Bande. Nach Behandlung mit Reduktionsmittel ergibt sich ebenfalls nur eine Bande mit leicht verringerter Wanderungsgeschwindigkeit im Vergleich zum nativen Molekül (21). Aus der SDS-Gelelektrophorese ergibt sich für das isolierte TBG ein Molekulargewicht von 59000 (22). Die Absorbanz einer TBG-Lösung (10 g/l) bei 280 nm bei 1 cm Schichtdicke beträgt 7,0 (2, 5). Das gereinigte TBG bindet T₄ in einem molaren Verhältnis von 1:0,9 (23) und weist die in Tabelle 1 angegebene Aminosäurezusammensetzung auf.

In der isoelektrischen Fokussierung ergab das TBG im wesentlichen 3 Hauptbanden mit einem isoelektrischen Punkt von 4,18, 4,40 und 4,50.

Antiserumgewinnung

Zur Gewinnung von TBG-Antiserum wurden Ziegen mit 10 μ g reinst-TBG in 1 ml komplettem *Freund*'schen-Adjuvans (Firma Difco) über 12 Monate einmal monatlich immunisiert. Anschließend wurde das Serum gesammelt und der Titer bestimmt. Die Titerbestimmung erfolgte durch die derjenigen Antiserumverdünnung, welche 30% des eingesetzten [¹²⁵I]TBG in Gegenwart von Polyethylenglykol zu präzipitieren im Stande war.

Tab. 1. Aminosäureanalysen der eigenen TBG-Präparation in nmol bezogen auf 500 Aminosäurereste pro mol TBG.
A) eigene Ergebnisse
B) Ergebnisse *M. C. Gershengorn et al.* (2)
C) Ergebnisse *K. Horn et al.* (3).

	A	B	C
Lysin	35	28	28
Histidin	16	11	12
Arginin	8	6	6
Asparaginsäure	48	36	36
Threonin	33	25	24
Serin	39	29	30
Glutaminsäure	57	42	44
Prolin	22	15	16
Glycin	32	19	19
Alanin	37	28	28
Cystein	4	5	—
Valin	31	27	23
Methionin	11	12	20
Isoleucin	27	18	19
Leucin	59	38	39
Phenylalanin	28	22	22
Tryptophan	—	4	—
Tyrosin	—	9	9

Die Spezifität des Antiserums wurde in der 2-dimensionalen Immunelektrophorese überprüft. Es zeigte keine Bande mit Human-Präalbumin und Human-Albumin sowie nur eine Bande mit Human-Schwangeren-Serum und normalem Humanserum. Eine unspezifische Reaktion des Antiserums mit T₃ (100 μ g/l) und T₄ (1000 μ g/l) konnte bei Verwendung im Enzymun-Test® TBG nicht festgestellt werden.

Anti-TBG-IgG wurde aus dem Serum durch Affinitätschromatographie an TBG-Spherosil isoliert. 700 ml Serum wurden über eine 200-ml-TBG-Affinitätsäule aufgereinigt und das gebundene anti-TBG-IgG wurde durch Propionsäure (1 mol/l) eluiert.

Standardisierung

Für die Standardisierung von Enzymun-Test® TBG wurden folgende Verfahren gewählt:

- Isolierung des nativen Antigens in reiner Form,
- Kalibrierung über Einwaage
Mit dem isolierten reinst-TBG, das in einer wässrigen Lösung vorlag, wurde wegen der Instabilität des TBG in diesem Milieu in zeitlich genau koordinierten Aktionen folgende Bestimmung durchgeführt: Lyophilisation eines Aliquots der TBG-Lösung, Proteinbestimmung mit der Biuret-Methode, Herstellung von Urstandards.

In unabhängigen Verdünnungsansätzen wurden aus reinst-TBG und TBG-freiem Serum Urstandards hergestellt. Alle nachfolgenden Standardchargen wurden an diesem Urstandard kalibriert.

Herstellung von TBG-freiem Serum

TBG wurde aus normalem Humanserum durch Affinitätschromatographie mittels T₄-Epoxysepahrose (17) entfernt.

Testablauf von Enzymun-Test® TBG

20 μ l Serum oder Standard werden zusammen mit 1 ml Konjugat (TBG, gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase) in mit anti-

TBG beschichteten Polystyrolröhrchen für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach B/F-Trennung durch Aussaugen der Flüssigkeit und einem Waschschriff wird die wandgebundene Konjugatmenge durch Zugabe von 1 ml 2,2'-Azino-di-(3-ethyl-benzthiazolin-sulfonsäure(6)-diammoniumsals (ABTS[®]) für 60 min bestimmt. Das gefärbte Produkt wird bei 405 nm gemessen. Der ELISA TBG ist ein kompetitiver Test, d. h. die gemessene Absorbanz ist der TBG-Konzentration im Serum umgekehrt proportional.

Aufbau der Studie

12 klinisch-chemischen Instituten wurden vom Hersteller Testpackungen zur Bestimmung von Thyroxin bindendem Globulin (TBG)¹, Thyroxin (T_4)² und Thyroxinbindungskapazität (TBK)³ zur Verfügung gestellt.

In 6 Laboratorien wurden die Testbestimmungen überwiegend manuell unter Zuhilfenahme von Pipettierhilfen durchgeführt, 6 Laboratorien setzten den ELISA-Meßplatz von Eppendorf[®] ein.

Neben einem selbst entwickelten TBG-Radioimmunoassay (3) wurden Kits der folgenden Hersteller verwendet: RIA-gnost[®] TBG, Behring-Werke AG; (¹²⁵J-TBG Radioimmunoassay Test System, Immophase, Corning; TBG-RIAcid, Henning GmbH; TBG Radioimmunoassay Kit, CEA SORIN; GammaDab (¹²⁵J-TBG Clinical Assay, Travenol.

Die Laboratorien werden in dieser Arbeit mit den Nummern 1–12 bezeichnet. Die Numerierung ist nicht identisch mit der alphabetischen Reihenfolge der Teilnehmer.

Der T_4 /TBG-Quotient wurde nach *Glincoer* (8, 14) als Quotient beider Konzentrationen, jeweils in mg/l, berechnet.

- 1) Im Handel erhältlich: Enzymun-Test[®] TBG, Art.-Nr. 249432, Firma Boehringer Mannheim GmbH.
- 2) Enzymun-Test[®] T_4 , Art.-Nr. 204510, Firma Boehringer Mannheim GmbH.
- 3) Enzymun-Test[®] TBK, Art.-Nr. 249416, Firma Boehringer Mannheim GmbH.
- 4) Eppendorf Gerätebau, Netheler & Hinz GmbH, Hamburg.

Ergebnisse

Präzision

Die Präzision in der Serie (Abb. 1), bestimmt mit nativem Humanserum im Konzentrationsbereich von 4–40 mg/l TBG und berechnet aus Mittelwerten von 3fach Analysen, war zufriedenstellend (Variationskoeffizienten: 1,4–8,4%):

Bei der Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag mit einer aus Humanserum hergestellten Kontrollprobe ergaben sich Variationskoeffizienten von 1,5–8,9% bei einem Mittelwert von 13,0 mg/l TBG.

Linearität

Um zu überprüfen, ob eine lineare Beziehung zwischen Meßsignal und TBG-Konzentration besteht, wurden in unabhängigen Meßreihen 3 Humanseren (36,1; 27,0; 21,2 mg/l TBG) mit dem Inkubationspuffer (Phosphatpuffer 40 mmol/l, pH 6,8, 2,5 g/l Rinderserumalbumin), dem TBG-freien Nullstandard der Testpackung sowie mit 0,15 mol/l NaCl-Lösung stufenweise verdünnt.

Bei der Auftragung der gemessenen gegen die berechneten TBG-Werte (Abb. 2) ergibt sich, daß zur Verdünnung TBG-freies Serum und 0,15 mol/l NaCl-Lösung gleichermaßen eingesetzt werden können. Die mit Phosphatpuffer angesetzte Verdünnungsreihe zeigt einen sigmoiden Verlauf. Dieses Ergebnis konnte in 3 weiteren Laboratorien bestätigt werden.

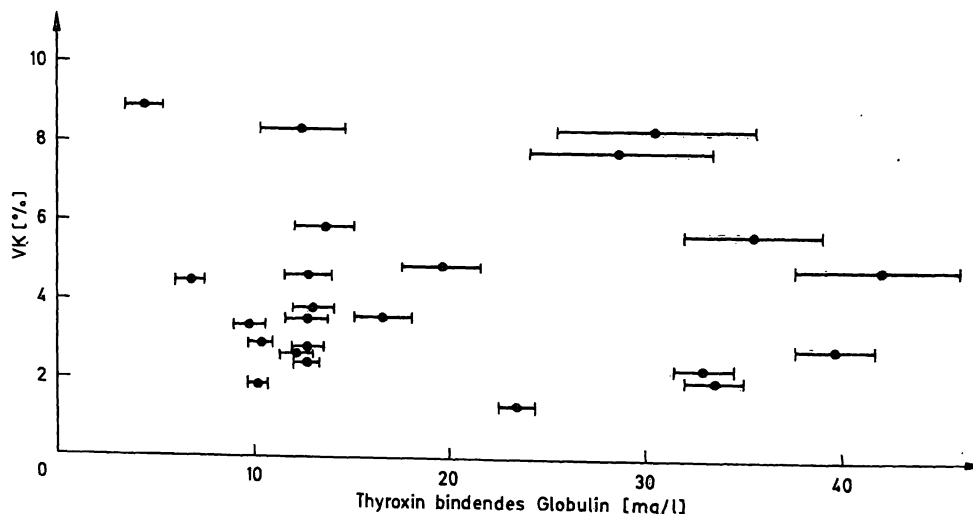


Abb. 1. Präzision in der Serie bei TBG-Konzentrationen von 4,4–40 mg/l (Zusammenfassung aller Ergebnisse). Es sind die Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen ($\bar{x} \pm 2s$) dargestellt (n = 10).

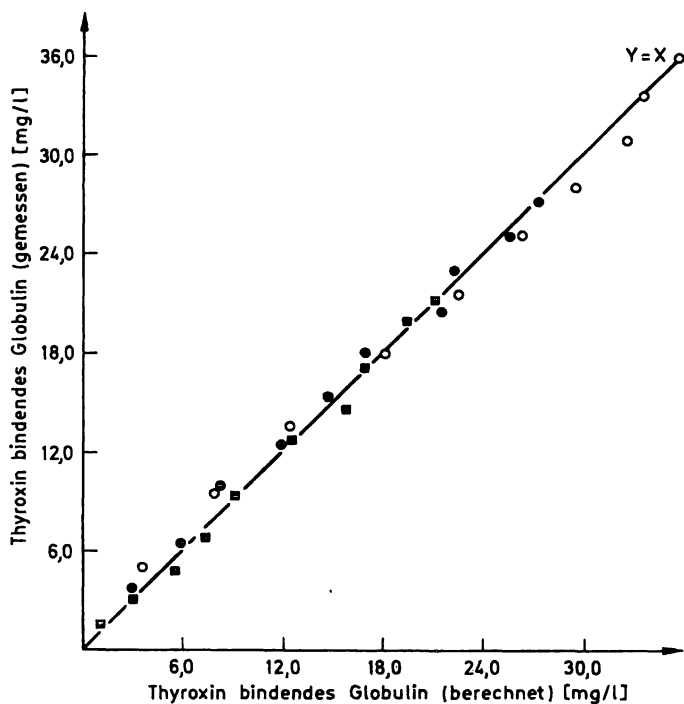


Abb. 2. Überprüfung der Linearität durch Verdünnung nativer Humanseren mit den Verdünnungsmedien:
 ○-○ Phosphatpuffer, □-□ TBG-freies Serum,
 ●-● 0,15 mol/l NaCl-Lösung. Mittelwerte aus Dreifachanalysen.

Methodenvergleich

Der TBG-Enzymimmunoassay wurde von 1 Teilnehmer mit einem selbstentwickelten TBG-Radioimmunoassay (3) verglichen, 7 Laboratorien setzten kommerziell erhältliche TBG-Radioimmunoassays ein.

Die Ergebnisse wurden über ein nichtparametrisches Verfahren (24, 25) ausgewertet. Alle Vergleiche in Tabelle 2 zeigen deutlich, daß die Ergebnisse des Enzymimmunoassays systematisch um 20–40% niedriger liegen als die der Radioimmunoassays.

Störsubstanzen

Arzneimittel

Normalseren wurden mit der maximalen Tagesdosis (Herstellerangaben) von 37 häufig verwendeten Pharmaka (26) sowie Thiamazol und Dextrothyroxin versetzt. Eine Beeinflussung der Meßwerte im Enzymun-Test® TBG konnte nicht festgestellt werden.

Hyperbilirubinämie, Hyperlipämie

Bei den mit dem Enzymimmunoassay und dem RIA der Firma Hennig gemessenen 35 Patientenseren mit Bilirubinkonzentrationen von 65–350 µmol/l und Triglyceridkonzentrationen von 3,5–17 mmol/l ergaben sich bei Berücksichtigung der methodischen Differenzen (Tab. 2) keine relevanten Unterschiede.

Hämolyse

Wie in Abbildung 3 dargestellt, wird der TBG-Enzymimmunoassay durch Hämoglobin gestört. Bei 10 g/l Hb werden etwa 2 mg/l TBG weniger gemessen. Zusatzversuche zeigten, daß durch zweifaches Waschen in diesem Experiment nur noch 0,5 mg/l TBG zu wenig erfaßt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine unspezifische Bindung der aus den Erythrocyten freiwerdenden Pseudoperoxidase an den Antikörper sein, die eine zusätzliche Farbentwicklung verursacht und somit falsch zu niedrige TGB-Werte vortäuscht.

Antikoagulantien

Bei Überprüfung der Verwendbarkeit von Plasma (27) (Natriumfluorid, Natriumcitrat, EDTA, Heparin und Natriumoxalat) konnten im Vergleich zu den entsprechenden Seren in keinem Versuch Meßwertabweichungen gefunden werden.

Tab. 2. Methodenvergleiche von Enzymun-Test® TBG (y) mit verschiedenen RIA Kits (x) der angeführten Herstellerfirmen unter Anwendung eines nichtparametrischen Verfahrens.

Labor	Methode		N ¹⁾	Steigung b	Achsen- schnitt a	TBG $\bar{x} \pm s$ (mg/l)	TGB $\bar{y} \pm s$ (mg/l)
	x	y					
3	Hyland	Enzymun-Test®	56	1,565	4,895	26,99 ± 7,38	17,07 ± 4,75
4	Hennig	Enzymun-Test®	59	1,572	3,312	24,33 ± 7,83	16,11 ± 4,99
5	Hennig	Enzymun-Test®	67	2,077	0,883	29,10 ± 5,28	16,93 ± 3,56
6	Behring	Enzymun-Test®	147	1,408	4,913	25,44 ± 11,48	17,04 ± 7,57
8	Hennig	Enzymun-Test®	130	1,407	4,887	24,69 ± 11,10	16,88 ± 8,15
10	eig. RIA	Enzymun-Test®	53	1,979	2,825	29,61 ± 8,94	16,15 ± 4,91
11	Hennig	Enzymun-Test®	52	1,488	-0,672	26,19 ± 13,97	20,70 ± 9,11
14	Corning	Enzymun-Test®	60	1,315	2,217	28,58 ± 12,25	20,31 ± 9,31
14	IDW	Enzymun-Test®	60	1,234	-0,037	24,97 ± 11,40	20,31 ± 9,31

¹⁾ Anzahl der Meßwertpaare

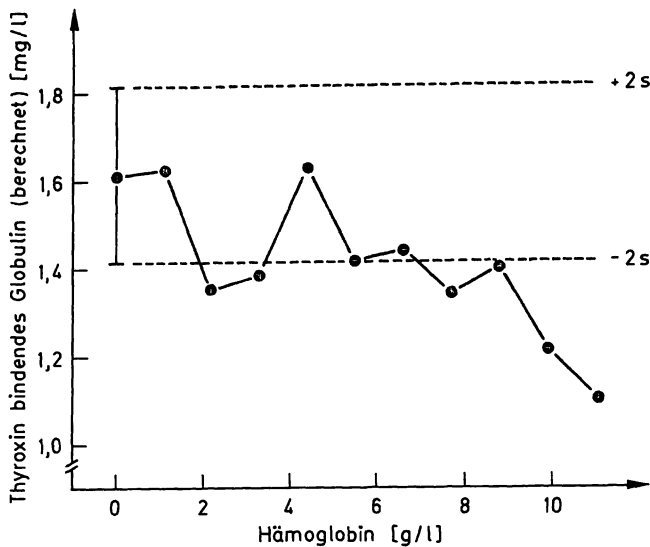


Abb. 3. Störung durch Hämoglobin. Bestimmung von TBG in einer Verdünnungsreihe aus hämolysiertem und hämolytischem Serum des gleichen Patienten.

Referenzwerte für TBG und T₄/TBG-Quotienten

Alle Teilnehmer unterteilten ihr Krankengut nach klinischen Gesichtspunkten, wobei die endgültige Diagnose aus der Gesamtheit zusätzlicher Kenngrößen erstellt wurde. Hierzu diente die Bestimmung von T₄, T₃, T₃-uptake Test und die Bestimmung von Thyrotropin vor und nach Injektion von Protirelin (synthetisches Thyroliberin). Die Klassifikation erfolgte nach jeweils Labor-eigenen Referenzwertbereichen. Die Kollektive wurden eingeteilt in schilddrüsengesunde Kinder, Kontrollpersonen von 18–50 Jahren, Kontrollpersonen in einem Alter über 50 Jahren, Kranke mit blander Struma, hypo- und hyperthyreote Patienten, Frauen unter Östrogentherapie und Frauen in der Schwangerschaft. Bei schilddrüsengesunden Kontrollpersonen (18–50 Jahren) liegt der Median bei 14,3 mg/l TBG, 95% der Werte liegen zwischen

Tab. 3. Referenzwerte für TBG, ermittelt mit Enzym-Test® TBG in den Laboratorien aller Teilnehmer.

	N	Thyroxin bindendes Globulin (mg/l)							
		Min	5%	10%	50%	90%	95%	Max	\bar{x}
<i>Kinder</i>									
0–1 Jahre	17	9,3	9,3	10,5	19,3	30,7	31,2	21,2	19,4
1–7 Jahre	35	10,0	11,7	13,6	17,9	22,6	24,4	25,8	17,7
8–12 Jahre	20	12,1	12,6	13,0	16,8	20,0	20,9	21,0	16,8
13–17 Jahre	41	10,0	10,6	12,5	15,7	19,2	21,0	21,7	15,4
<i>Schilddrüsengesunde erwachsene Kontrollpersonen</i>									
gesamt 18–50 Jahre	374	6,6	9,6	10,5	14,3	17,8	18,5	21,5	13,9
davon Männer	196	6,6	9,2	10,3	13,4	17,1	17,8	20,3	13,4
davon Frauen	178	9,4	10,4	10,9	14,5	17,9	19,0	21,5	14,5
gesamt >50 Jahre	171	9,2	10,4	11,1	15,0	18,4	18,8	23,1	14,0
davon Männer	72	9,2	9,5	10,6	14,2	17,4	18,3	18,7	14,4
davon Frauen	99	9,8	11,1	12,1	15,7	18,6	19,5	23,1	15,6
<i>Hyperthyreose</i>									
gesamt	75	7,9	8,5	10,5	14,9	18,5	20,9	26,5	14,6
davon Männer	18	7,9	7,9	8,6	13,1	16,8	20,9	20,9	13,4
davon Frauen	57	8,0	8,8	10,5	15,7	18,7	21,2	26,5	14,9
<i>Hypothyreose</i>									
gesamt	74	10,3	11,8	14,5	19,5	26,8	29,4	37,3	20,0
davon Männer	27	10,6	14,2	14,6	19,7	24,5	26,8	28,8	19,9
davon Frauen	47	10,3	11,8	13,8	19,5	27,4	29,5	37,3	20,0
<i>Orale-Kontrazeptiva</i>									
	83	14,2	16,4	17,8	22,2	29,1	30,6	32,2	23,4
<i>Schwangerschaft</i>									
gesamt	46	17,4	22,7	23,8	28,5	36,9	37,7	40,9	29,2
davon bis 26. Woche	12	23,4	23,4	23,7	24,5	35,0	37,8	37,8	28,3
davon 27.–40. Woche	34	22,3	22,7	25,2	29,5	36,9	40,2	40,9	29,9
<i>Dialyse</i>									
gesamt	33	6,9	10,8	11,4	15,5	20,8	30,7	32,5	16,3

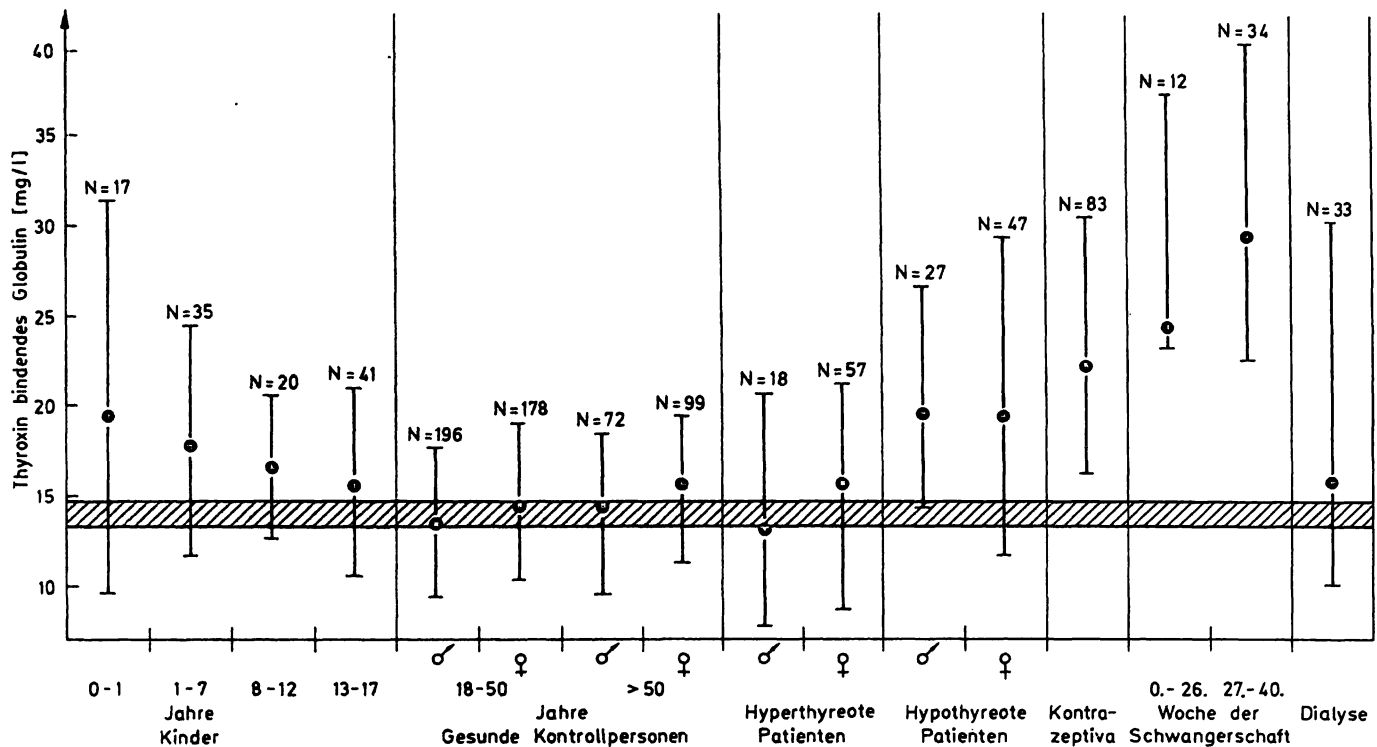


Abb. 4. Referenzwerte für TBG. Es sind die Medianwerte (●) und die 95% Bereiche (I) der einzelnen Kollektive aufgetragen. Der Referenzbereich schilddrüsengesunder Probanden einer mittleren Altersgruppe ist schraffiert eingezeichnet.

9,6–18,5 mg/l TBG. Der Median bei Frauen mit 14,5 mg/l TBG lag signifikant höher als bei Männern mit 13,4 mg/l TBG. Die Werte hyperthyreoter Patienten liegen überwiegend im Referenzbereich, hypothyreote Patienten zeigen bei einem Median von 19,5 mg/l TBG deutlich erhöhte Werte (Tab. 3, Abb. 4).

Durch die Bildung von T_4 /TBG-Quotienten (Tab. 4, Abb. 5) erhält man bei gesunden Kontrollpersonen (18–50 Jahren) einen Medianwert von 4,6, bei hypothyreoten Patienten von 1,0 und bei hyperthyreoten Patienten von 11,3. In der Schwangerschaft liegen die Quotienten (Median = 3,1) an der oberen Grenze des hypothyreoten Bereichs.

Diskussion

Die sinnvolle Kombination von Laboruntersuchungen zur rationalen und richtigen Diagnostik von Erkrankungen der Schilddrüse und deren metabolischen peripheren Konsequenzen mit hoher Sensitivität und Spezifität ist immer noch kontrovers. Die Bedeutung der Bestimmung der Gesamt-Schilddrüsenhormonkonzentrationen ist unbestritten (3, 8–16). Ungewiß ist, ob zur Miterfassung der freien Hormonfraktion deren direkte Bestimmung nützlich ist (28, 29) oder ob über eine quantitative Erfassung der Konzentration der wesentlichen Bindungsproteine die Errechnung der freien Hormonfraktion vorzuziehen ist (3,

8, 11, 15). In dieser Situation erscheint es zunächst bedeutsam, über eine reproduzierbare Methodik zur quantitativen Bestimmung des wichtigsten Schilddrüsenhormon-Bindungsproteins, des Thyroxin bindenden Globulins (TBG) zu verfügen. Ein wesentliches Problem bei der Quantifizierung von TBG ist das Fehlen eines internationalen Referenzpräparates oder eines allgemein akzeptierten hochgereinigten TBG-Standard-Präparates. Wir haben das Glykoprotein TBG noch einmal hochgereinigt und chemisch charakterisiert. Die unterschiedlichen chromatographischen Techniken der verschiedenen Arbeitsgruppen (2, 3, 5) führen offenbar zu unterschiedlich zusammengesetzten Proteinen, was sich an der unterschiedlichen Aminosäurezusammensetzung ablesen läßt. Aus früheren präparativen Untersuchungen war schon bekannt, daß ein unterschiedliches Molekulargewicht von etwa 60000 ± 3000 angegeben wurde (1, 4, 20, 21, 22). Obwohl angenommen wurde, daß TBG aus 374 Aminosäuren zusammengesetzt ist, und zur einen Hälfte aus einer α -Helix und zur anderen Hälfte aus einer β -Faltblatt-Struktur bestehen sollte, besteht aufgrund der präparativen Unsicherheit und der Mikroheterogenität von TBG (4, 22) noch immer eine Unsicherheit hinsichtlich der molekularen Zusammensetzung. Dies ist bedeutend, da insbesondere die Beteiligung hydrophiler Proteinsequenzen an einem Protein dessen antigene Determination bestimmen (30). Obwohl bei unserer Präpara-

Tab. 4. Referenzwerte für den T₄/TBG-Quotienten.

	N	T ₄ /TBG-Quotienten							Max	x̄
		Min	5%	10%	50%	90%	95%			
<i>Schilddrüsengesunde erwachsene Kontrollpersonen</i>										
gesamt 18–50 Jahre	323	2,9	3,4	3,6	4,6	6,2	6,5	14,6	4,8	
davon Männer	181	2,9	3,6	3,8	4,8	6,2	6,5	10,2	4,9	
davon Frauen	142	2,9	3,4	3,5	4,4	6,0	6,4	14,6	4,6	
gesamt > 50 Jahre	156	2,8	3,3	3,7	4,9	6,2	6,6	12,9	4,9	
davon Männer	66	3,1	3,7	3,8	4,9	6,3	6,5	7,3	4,9	
davon Frauen	90	2,8	3,2	3,6	4,9	6,1	6,6	12,9	4,9	
<i>Hyperthyreose</i>										
gesamt	62	4,0	7,7	8,0	11,3	20,7	23,5	30,3	12,7	
davon Männer	15	7,9	7,9	8,8	11,3	17,5	22,0	22,0	12,3	
davon Frauen	47	4,0	5,9	7,8	11,1	20,9	24,3	30,3	12,8	
<i>Hypothyreose</i>										
gesamt	70	0,1	0,2	0,4	1,0	3,7	3,9	4,6	1,5	
davon Männer	24	0,1	0,2	0,2	0,8	2,7	3,9	4,3	1,1	
davon Frauen	46	0,1	0,5	0,6	1,1	3,7	3,9	4,6	1,7	
<i>Orale Kontrazeptiva</i>										
	49	2,2	2,7	2,8	3,7	4,9	5,0	5,5	3,8	
<i>Schwangerschaft</i>										
gesamt	46	2,3	2,4	2,5	3,1	4,0	4,5	4,8	3,3	
davon bis 26. Woche	12	2,6	2,6	2,8	3,5	4,6	4,6	4,6	3,6	
davon 27.–40. Woche	34	2,3	2,4	2,5	3,1	3,9	4,0	4,2	3,6	
<i>Dialyse</i>										
gesamt	33	2,1	2,1	2,4	3,5	5,4	6,8	7,4	3,8	

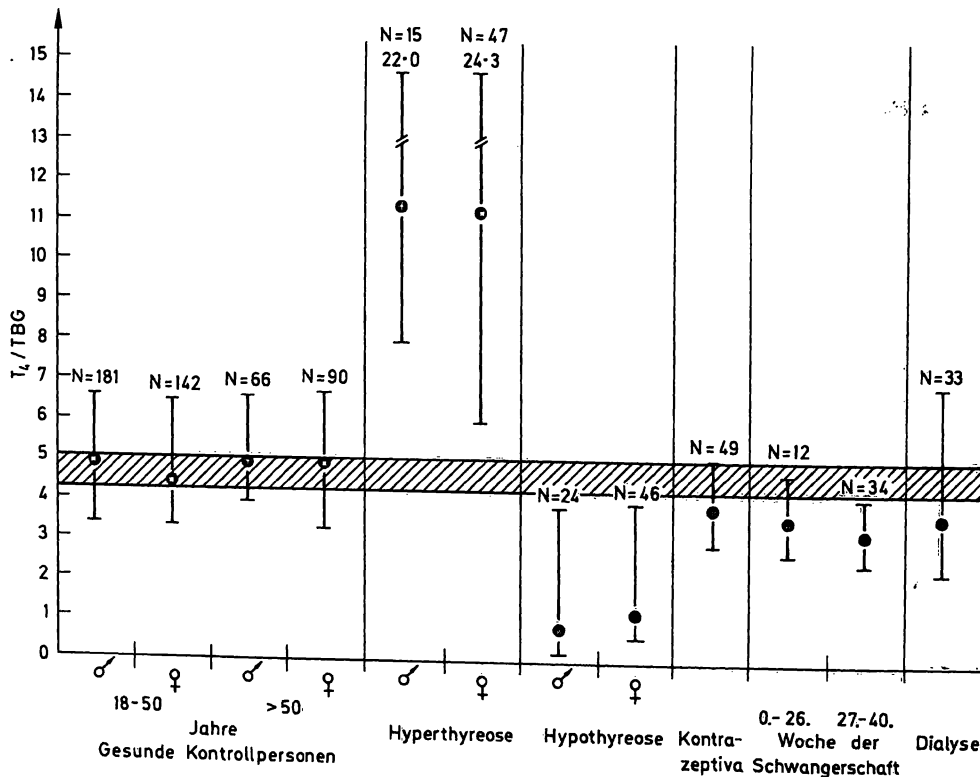


Abb. 5. Referenzwerte für T₄/TBG-Quotienten. Es sind die Medianwerte (●) und die 95% Bereiche (I) der einzelnen Kollektive aufgetragen. Der Referenzbereich schilddrüsengesunder Probanden einer mittleren Altersgruppe ist schraffiert eingezeichnet.

$$T_4/TBG\text{-Quotient} = \frac{T_4[\mu\text{g/dl} \times 10^4]}{TBG[\text{mg/l}]} = \frac{T_4[\text{mg/l}]}{TBG[\text{mg/l}]}$$

tion der heutige Standard der Proteinchemie berücksichtigt wurde, ist die Reproduzierbarkeit der Präparation nicht gewährleistet. Daher ist dieses TBG nicht als Referenzstandard verwendbar. Vielmehr empfiehlt sich zur Vereinheitlichung unterschiedlicher TBG-Bestimmungsmethoden die internationale Etablierung eines Poolserum-Standards mit Konzentrationsangabe.

Dieses Vorgehen wäre aber nur zu vertreten, wenn Antiseren, die mit unterschiedlichen TBG-Präparationen hergestellt wurden, bei paralleler Verdünnung identische Meßergebnisse mit einer solchen Serum-Präparation zeigen würden.

Unser Methodenvergleich hat erwiesen, daß die Immunreaktion unterschiedlicher Antiseren gegen die antigenen Hauptdeterminanten von im Serum zirkulierendem TBG parallel ist, so daß dieses Vorgehen sinnvoll ist und damit erwartet werden kann, daß alle kommerziellen Testbestecke mit einem Serum-Referenzstandard identische Werte produzieren. Damit ist eine wesentliche Voraussetzung für die klinische Praktikabilität und die Weiterverbreitung der TBG-Bestimmung gegeben.

Theoretische Berechnungen lassen die Konzentration von zirkulierendem TBG im Serum bei 10 mg/l erwarten (1, 21, 23). Die von anderen Autoren (9, 10, 31) radioimmunchemisch ermittelten Konzentrationen bei gesunden Probanden lagen nahe an diesem Erwartungswert, der auch mit unserer enzymimmunologischen Methode annäherungsweise gemessen wird. Von mehreren Autoren wurden aber teilweise wesentlich höhere Konzentrationen angegeben (6, 3, 11, 32). Dieser Unterschied wäre nicht gravierend, wenn nicht die TBG-Bestimmung zur Errechnung der freien T₄-Fraktion mittels des T₄/TBG-Quotienten herangezogen würde (8, 14). Eine standardisierbare Vereinheitlichung ist daher erforderlich. Die hier vorgestellte enzymimmunologische Bestimmungsmethode weist eine hohe methodische Präzision auf und hat in der klinischen Praxis eine große Zuverlässigkeit gezeigt. Die klinische Brauchbarkeit läßt sich auch an der geringen Störanfälligkeit gegenüber relevanten Interferenzen ausweisen. Die Bestimmung der TBG-Konzentration bei Kontrollpersonen zeigt die bekannte Abhängigkeit vom Lebensalter (12, 33). Von der perinatalen Lebensphase an bis zum Erwachsenenalter nimmt die TBG-Konzentration zunächst kontinuierlich ab, um nach dem 50. Lebensjahr wieder anzusteigen. Offensichtlich haben aber solche altersabhängigen TBG-Schwankungen keinen Einfluß auf die Bioverfügbarkeit von Schilddrüsenhormonen. Die häufigste Ursache für die Erhöhung der TBG-Konzentration ist die Östrogenwirkung auf Synthese in der Leber und peripheren Abbau von TBG (3, 20). So-

wohl unter einer erhöhten endogenen Östrogen-Produktion während der Schwangerschaft als auch unter exogener Zufuhr von Östrogenen etwa in der Form von oralen Kontrazeptiva finden sich Anstiege der TBG-Konzentrationen, die sich nach Beendigung von Schwangerschaft oder Östrogen-Medikation wieder normalisieren (8, 34).

Der Enzymimmunoassay zeigt diese bekannten Veränderungen zuverlässig an. Der Verlauf von TBG-Konzentrationsänderungen bei akuten und chronischen Lebererkrankungen ist gegenläufig. Bei akuter Hepatitis kann es zu einem Anstieg von TBG kommen, während mit zunehmender Verminderung der Lebersyntheseleistung die TBG-Konzentration abfällt (11, 35). Genetisch bedingte TBG-Vermehrungen sind beschrieben (36), ebenso erhöhte Konzentrationen von TBG bei Hypothyreose (8, 22). Unter dem Einfluß von Androgenen (35), hochdosierter Steroid-Medikation (37), im Verlauf von schweren Allgemeinerkrankungen (7, 13), bei anhaltenden katabolen Stoffwechselluständen (11), bei Null-Diät (38) sowie bei genetisch bedingtem TBG-Mangel (11, 39) und bei schwerer Hyperthyreose können verminderte TBG-Konzentrationen gefunden werden.

Die TBG-Messung ergibt also eine zuverlässige Konzentrationsangabe des wichtigsten zirkulierenden Schilddrüsenhormon-Bindungsproteins, dessen Konzentrationsänderungen für die Diagnostik von Schilddrüsenerkrankungen und Änderungen des peripheren Schilddrüsenhormonstoffwechsels unter Einbeziehung der Gesamtkonzentrationen an Schilddrüsenhormonen relevant werden kann. Dies gilt besonders für T₄, wobei eine Kenngröße für dessen freie Fraktion klinisch bedeutsam ist. Durch Bildung des T₄/TBG-Quotienten (8, 14) kann frei von physikochemischen Voraussetzungen an die Definition des freien T₄ eine Kenngröße für diese biologisch und klinisch relevante Meßgröße T₄ ermittelt werden. Damit sind die immer noch kontroversen Diskussionen um die methodische Richtigkeit der direkten Bestimmung des freien T₄ sowie ihre Beeinflussung durch Serumbestandteile oder durch andere Krankheiten umgangen, und die Qualität der Schilddrüsen-Diagnostik wird nicht durch die Unsicherheit eines Testsystems in Frage gestellt. Vielmehr erlaubt die getrennte Ermittlung von TBG und freiem T₄ eine kausale Zuordnung klinisch relevanter Abweichungen vom Referenzbereich. Unsere Untersuchungen bestätigen, daß Änderungen von TBG die mit diesem Protein im Gleichgewicht stehende freie T₄-Fraktion kaum beeinflusst. Das gilt insbesondere für altersabhängige Schwankungen. Bemerkenswert ist, daß der T₄/TBG-Quotient in der Gravidität signifikant gegenüber dem Referenzbereich erniedrigt ist, so daß

auch diese Untersuchung wieder die Frage aufwirft, ob während der Gravidität eine leichte Hypothyreose des mütterlichen Organismus besteht (40).

Bei nierenkranken Patienten kann es je nach Funktionszustand der Niere zu komplexen Änderungen der Bindungsproteine und der Schilddrüsenhormonkonzentrationen kommen, wobei der T₄/TBG-Quotient eine hypothyreote Stoffwechsellaage zuverlässig anzeigt (41). Obwohl die Einzeldaten aus unserer Untersuchung hier nicht angeführt sind, so unterstützt unsere Untersuchung das Ergebnis zahlreicher Untersucher, die fanden, daß die Treffsicherheit des T₄/TBG-Quotienten bei der Abgrenzung grenzwertiger Situationen klinisch Hyper- oder Hypothyreosen als höher angesehen werden kann als die des FT₄-Index, des ETR- oder des NTR-Tests (3, 8, 11, 13, 14, 32, 35). Nur einzelne Autoren halten die genannten Kenngrößen in der klinischen Routine-Diagnostik für gleichwertig (42), oder geben dem FT₄-Index gegenüber dem T₄/TBG-Quotienten den Vorzug (43). Die hohe Treffsicherheit von T₄/TBG-Quotient unterliegt einigen Einschränkungen, insbesondere gehen Änderungen von Albumin und Präalbumin nicht in die Berechnungen ein. Dies ist meist ohne klinischen Belang, solange TBG das bestimmende Bindungsprotein mit der höchsten Affinität für T₄ ist. In jüngster Zeit ist aber eine T₄ Erhöhung durch eine spezifische T₄ bindende Albumin-Fraktion beschrieben worden, deren diagnostische Relevanz für den Schilddrüsenhormonstoffwechsel von kritischer Bedeutung sein kann (44). Da die Bindung von T₃ an TBG mit einer geringeren Affinität als die von T₄ erfolgt, läßt sich eine Kenngröße für das freie T₃ zwar errechnen, erreicht aber keine diagnostische Trennschärfe. Mit Rücksicht darauf, daß T₃ hauptsächlich die periphere Konversion von T₄ anzeigt, ist aber aus pathophysiologischen Gründen ein freies T₃, sofern es korrekt definiert werden könnte, klinisch auch nicht so relevant, wie der nicht an Protein gebundene Anteil von T₄. Für den T₄/TBG-Quotienten gelten somit folgende diagnostische Grenzen.

1. bei einem stark ausgeprägten TBG-Mangel steigt der T₄/TBG-Quotient disproportioniert an, vermutlich weil das Thyroxin bindende Präalbumin stärker mit Thyroxin abgesättigt ist als bei normalem TBG-Gehalt (45).

2. der T₄/TBG-Quotient gibt keinen direkten Aufschluß über eine mögliche Verdrängung von Schilddrüsenhormonen aus der Proteinbindung durch Medikamente (z. B. Salicylat, Phenytoin) oder Metabolite (freie Fettsäuren), sondern läßt diesen Verdacht bestenfalls durch einen unerklärlich niedrigen Wert aufkommen. Diese Einschränkungen gelten aber auch für die anderen Bestimmungsmethoden von freiem T₄.

Schlußfolgerungen

Die hier vorgestellte immunochemische Bestimmung von TBG (Enzymun-Test® TBG) ist eine empfindliche, zuverlässige und klinisch relevante Methode zur Messung der zirkulierenden TBG-Konzentrationen im menschlichen Serum. Durch die Kalibrierung an einem gut charakterisierten Referenzpräparat konnte für Kinder und Erwachsene beiderlei Geschlechts ein Referenzbereich erarbeitet werden. Dieser Referenzbereich für TBG und die weitgehende Standardisierung der Gesamt-Thyroxin-Bestimmung führen dann ebenfalls zu einem Bereich für den T₄/TBG-Quotienten, womit eine wesentliche Voraussetzung für eine Vereinheitlichung der klinischen Evaluierung gegeben ist. Der T₄/TBG-Quotient erlaubt es, ein physiko-chemisch gut charakterisiertes Äquivalent für das freie T₄ anzugeben, das verlässlicher erscheint als die unterschiedlichen direkten Bestimmungsmethoden für freies T₄. Die Bestimmung von TBG und die Ermittlung von freiem T₄ aus T₄/TBG ist für die Erstdiagnostik thyreogener und extrathyreoidaler Störungen bei Kindern und Frauen bei unbekannter östrogenen Ausgangslage unerlässlich. Die Anwendung erscheint ebenfalls sinnvoll bei allen Patienten, bei welchen neben der Schilddrüsenkrankheit a priori eine extrathyreoidale Erkrankung mit in die Differentialdiagnose einbezogen werden muß, da dann der Protirelin-Test in seiner Aussage eingeschränkt sein kann. TBG-Bestimmung und Protirelin-Test ergänzen sich also schon bei der Erstdiagnose einer Schilddrüsenenerkrankung, während die TBG-Bestimmung allein zusammen mit der Bestimmung von Schilddrüsenhormonen für alle Verlaufsuntersuchungen zur Behandlung von Schilddrüsenenerkrankungen und extrathyreoidalen Erkrankungen eine relevante Methode ist.

Literatur

1. Sterling, K., Hamada, S., Takemura, Y., Brenner, M. A., Newman, E. S. & Inada, M. (1971), *J. Clin. Invest.* 50, 1758–1971.
2. Gershengorn, M. C., Cheng, S. Y., Lippoldt, R. E., Lord, R. S. & Robbins, J. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 8713–8718.
3. Horn, K., Kubiczek, Th., Pickardt, C. R., Scriba, P. C. (1977) *Klin. Wochenschr.* 55, 881–894.
4. Cheng, C.-Y. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 79, 1212–1218.
5. Hocman, G. (1978) *Int. J. Biochem.* 9, 295–298.
6. Cavalieri, R. R. (1975) *J. Clin. Invest.* 56, 79–87.
7. Tabachink, M. & Korcek, L. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 537, 169–175.
8. Glinioer, D., Fernande-Deville, M. & Ermans, A. M. (1978) *J. Endocrinol. Invest.* 1, 329–335.
9. Kågedal, B. & Kaellberg, M. (1977) *Clin. Chem.* 23, 1694–1699.
10. Gershengorn, M. C., Larsen, P. R. & Robbins, J. (1976) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 42, 907–911.
11. Pickardt, C. R., Bauer, M., Horn, K., Kubiczek, Th. & Scriba, P. C. (1977) *Internist* 18, 538–543.
12. Hesch, R. D., Gatz, J., Jueppner, H. & Stuppe, P. (1977) *Horm. Metab. Res* 9, 141–146.
13. McDowell, D. R. (1979) *Ann. Clin. Biochem.* 16, 81–85.
14. Hesch, R. D. (1977) *Dtsch. Med. Wochenschr.* 102, 1386–1388.
15. Horn, K., Pickard, C. R. & Scriba, P. C. (1979) *Nuclearmedizin* 2, 17.
16. Rudorff, K.-H., Herrmann, J., Kroell, H. J. & Krueskemper, H. L. (1976) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 14, 31–36.
17. Kågedal, B. & Kaellberg, M. (1977) *Clin. Chim. Acta* 78, 103–111.
18. Lämmlli, M. K. (1970) *Nature* 227, 680–685.
19. Spackmann, M., Stein, D. H. & Moore, W. H. (1958) *Anal. Chem.* 30, 1190–1206.
20. Gärtner, R., Henze, R., Horn, K., Pickardt, C. R. & Scriba, P. C. (1981) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 52, 657–664.
21. Marshall, J. S. & Pensky, J. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* 146, 76–83.
22. Raouf, A. A. M., Geisow, M. J., O’Gorman, P., Marsden, P. & Howorth, P. (1980) *Clin. Chim. Acta* 104, 25–41.
23. Green, A. M., Marshall, J. S., Pensky, J. & Stanbury, J. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 278, 117–124.
24. Passing, H. & Bablock, W. (1983) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 21, 709–720.
25. Haeckel, R., (1984) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 22, 265–270.
26. Staber, G., Busch, E. W. & Koller, P. U. (1982) *Med. Lab.* 35, 10–13.
27. Richterich, R. (1965) *Klinische Chemie, Theorie und Praxis*, 1. Aufl., Akademische Verlagsgesellschaft Frankfurt a. M.
28. Bayer, M. F. & McDougall, J. R. (1982) *Clin. Chim. Acta* 118, 209–218.
29. Symons, R. G., Walichnowski, Ch. M. & Murphy, L. J. (1982) *Clin. Chem.* 28, 266–277.
30. Hopp, T. P. & Woods, K. R. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 3824–3828.
31. Burr, W. A., Evans, S. E., Lee, J., Princé, H. P. & Ramsden, D. B. (1979) *Clin. Endocrinol.* 11, 333–342.
32. Levy, R. P., Marshall, J. S. & Velayo, N. L. (1971) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 32, 372–381.
33. Rudorff, K.-H., Herrmann, J. & Krüskemper, H. L. (1982), *Internistische Welt* 3/1982, 102–108.
34. Rudorff, K.-H., Herrmann, J., Dietrich, T. & Krüskemper, H. L. (1978) *Med. Klin.* 73, 1109–1113.
35. Rudorff, K.-H. (1979) *Fortschr. Med.* 97, 2038–2046.
36. Refetoff, S., Fang, V. S., Marshall, J. S. & Robin, N. J. (1976) *J. Clin. Invest.* 57, 485–95.
37. Oppenheimer, J. H. & Werner, S. C. (1966), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 26, 715–721.
38. Scriba, P. C., Bauer, M., Emmert, D., Fateh-Moghadam, A., Hofmann, G. G., Horn, K. & Pickardt, C. R. (1979) *Acta Endocrinol.* 91, 629–643.
39. Marshall, J. S. & Pensky, J. (1969) *J. Clin. Invest.* 48, 508–515.
40. Burrow, G. N., Polackwich, R., Donabedian, R. (1975) In: *Perinatal Thyroid Physiology and Disease* (Fisher, D. A. & Burrow, G. N., eds.) pp. 1–10, Raven Press, New York.
41. Rudorff, K.-H., Schmitz, B. & Jahnke, K. (1982), *Aktuelle Endokrinol. Stoffw.* 3, 50–55.
42. Wellby, M. L., Guthrie, L. L. & Reilly, C. P. (1981) *Clin. Chem.* 27, 2022–2024.
43. Börner, W., Ruppert, G., Moll, E. & Reiners, Chr. (1980) *Der Nuklearmediziner* 3, 235–241.
44. Barlow, J. W., Csicsmann, J. M., White, E. L., Funder, J. W. & Stockigt, J. R. (1982) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 55, 244–250.
45. Attwood, E. C. & Atkin, G. E. (1982) *Ann. Clin. Biochem.* 19, 101–103.

Anne-Ch. Kessler
Boehringer Mannheim GmbH
Biochemical Research Center
D-8132 Tutzing

