

# Immunturbidimetrische Bestimmung von Thyroxin (T4) am mechanisierten Analysensystem RA-1000

## Immunoturbidimetric Analysis of Thyroxine (T4) with the Random Access Analyzer RA-1000

A. Skurk, L. Thomas

Zentrallabor Krankenhaus Nordwest, Frankfurt/Main

### Zusammenfassung:

*Wir haben einen kommerziell verfügbaren Test zur Bestimmung von Thyroxin (T4) am Analysensystem RA-1000 auf seine Eignung in unserem Labor untersucht. Das Prinzip des Tests beruht auf einer immunturbidimetrischen Inhibitionstechnik, die besonders zur Messung niedriger T4-Konzentrationen geeignet ist. Es wurde eine Präzision (in Serie, von Tag zu Tag) zwischen 2,6 und 4,6% (VK) ermittelt. Die Richtigkeit wurde untersucht an Patientenproben mit 2 Vergleichsmethoden und vergleichend zu den Sollwerten kommerziell verfügbarer Richtigkeitskontrollseren. Der Vergleich an Patientenproben ergab eine gute bis akzeptable Übereinstimmung, der Vergleich mit den Sollwerten von Richtigkeitskontrollseren zeigte in einigen Seren gewisse methodische Differenzen. Insgesamt ergaben unsere Untersuchungen, daß die immunturbidimetrische Inhibitionstechnik am RA-1000 eine schnelle und zuverlässige Bestimmung der T4-Konzentration ermöglicht.*

### Schlüsselwörter:

*T4-Bestimmung – immunturbidimetrische Inhibitionstechnik – RA-1000 – Schilddrüsenfunktion*

### Summary:

*We evaluated a commercially available test for the quantitative determination of thyroxine (T4) on the RA-1000. The purpose of the evaluation was to check the suitability of the test system in our laboratory. The method is based on an immunoturbidimetric inhibition technique, which is well suitable for measuring low concentrations of T4. The calculated within-run and day to day precision (% CV) was found to be within 2.6 to 4.6. The accuracy was studied with clinical specimens and various commercial control sera. The clinical values are in agreement with values from 2 comparative methods, as indicated by regression statistics. The analysis of accuracy data using quality control sera, showed in some cases between method difference. We believe, that the immunoturbidimetric inhibition technique on the RA-1000 is a quick and accurate method for the quantitative determination of T4.*

### Keywords:

*T4-analysis – immunoturbidimetric inhibition technique – RA-1000 – thyroid functioning*

## Einleitung

Die Serumkonzentration des Schilddrüsenhormons Thyroxin (T4) ist ein Kriterium zur Beurteilung der Stoffwechselsituation der Schilddrüse (1).

Die Thyroxinbestimmung erfolgt gewöhnlich durch Immunoassays, wobei die radioaktivitätsfreien Bestimmungsmethoden wie Enzym-, Fluoreszenz- und Lumineszenz-Immunoassays zunehmend an Bedeutung gewinnen.

Immunturbidimetrische Techniken werden gewöhnlich aufgrund mangelnder analytischer Sensitivität nur zur quantitativen Bestimmung von Plasmaproteinen eingesetzt, nicht aber zur Hormonbestimmung. Mit der turbidimetrischen Immuninhibitionstechnik wird jedoch eine analytische Sensitivität erreicht, die auch die quantitative Bestimmung von Hormonen ermöglicht (2).

Die immunturbidimetrische Inhibitionstechnik verwendet neben dem zu bestimmenden Antigen und dem korrespondierenden Antikörper einen dritten Reaktanten, das

Agglutinator-Antigen. Bei Durchführung der Bestimmung (Abb.1) werden zuerst die Probe und das Agglutinator-Antigen gemischt und vorinkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe des an Latexpartikel gekoppelten Antikörpers. Es kommt nun zur Agglutinationsreaktion zwischen Antigen und Latex-gekoppelten Antikörpern. Dabei konkurriert das Antigen der Probe mit dem Agglutinator-Antigen um eine begrenzte Anzahl von Latex-gekoppelten Antikörpern. Das Probenantigen selbst verzögert die bei 600 nm meßbare Agglutinationskinetik zwischen Agglutinator-Antigen und Latex-gebundenen Antikörpern. Je höher die Konzentration des Probenantigens ist, desto geringer wird die meßbare Trübungsänderung des Reaktionsansatzes.

Wir haben die Validität eines kommerziell angebotenen Immuninhibitionstests zur Bestimmung von T4 entsprechend einem Protokoll für das Analysensystem RA-1000 geprüft. Weiterhin erfolgte die Beurteilung durch einen Methodenvergleich mit einem Enzymimmunoassay und einem Lumineszenzimmunoassay an Patientenproben.

## Material und Methoden

### Immunturbidimetrische T4-Bestimmung am RA-1000 (3)

Durchgeführt wurde ein Zwei-Reagenz-Verfahren unter Anwendung des Reagenziensatzes T4 der Technicon GmbH, Bad Vilbel.

Reagenz 1: Es enthält ein T4-Ficoll-Konjugat und Trypsin. Letzteres soll durch Proteinabbau im Reaktionsansatz Störeinflüsse, die nach Zugabe der Probe auftreten können, unterdrücken.

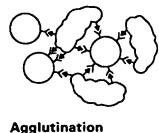
Reagenz 2: Es besteht aus dem an Latexpartikel gebundenen spezifischen Antikörper gegen T4 und Anilino-1-Naphthalin-Sulfonsäure. Letztere dient der Freisetzung des T4 vom Bindungsprotein.

Prinzip: In einem ersten Reaktionsschritt wird die Probe mit Reagenz 1 für 4 min inkubiert. Es erfolgt eine Durchmischung der T4-haltigen Probe mit dem T4-Agglutina-torreagenz.

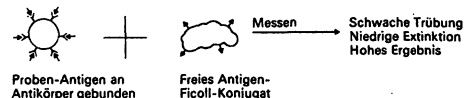
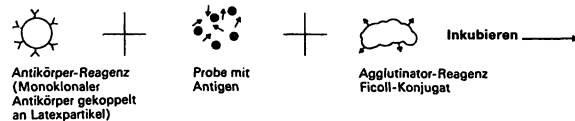
Im zweiten Reaktionsschritt wird monoklonaler T4-Antikörper, gekoppelt an Latexpartikel, zugegeben und die Bildung von Immunkomplexen kinetisch-turbidimetrisch bei 600 nm gemessen. Bei hoher T4-Konzentration der Probe ist die meßbare Extinktionsänderung klein, bei niedriger groß.

Die Geräteeinstellung des RA-1000 zur T4-Bestimmung ist in Tab. 1 angegeben. Zur Erstellung der Standardkurve wurde der T4-Kalibrator-Set der Technicon GmbH mit den Konzentrationswerten 0, 15, 40, 80, 120, 240 ng/ml eingesetzt. Die Software des RA-1000 erlaubt die Aufnahme unlinearer Standardkurven wie z. B. des aufsteigenden Schenkels der Heidelberger Kurve.

#### Negative Reaktion (Kein Antigen in der Probe)



#### Positive Reaktion (Probe mit Antigen)



#### Agglutinations-Hemmung

Abb. 1: Reaktionsprinzip des immunturbidimetrischen Inhibitionsassays zur T4-Bestimmung

Tab. 1: Geräteeinstellung des RA-1000 zur T4-Bestimmung

MTH.NR		# STD	6
30 T4		# ASP	2
IMNOASSY		STD 1	0.0
IA TABLE	10	STD 2	15
TYP	4	STD 3	40
% PR.VOL.	(26 µl) 52	STD 4	80
FILTER POS	6 WL800	STD 5	120
TOTZ.	1:00	STD 6	240
% REAGVOL	(182 µl) 38	LIM 1	4
Z.REAG.		LIM 2	3
VOL.Z.RG	(182 µl) 38	LIM 3	3
EINH.	15 MCG/ML	LIM 4	4
UNIT FAC	1.0000	LIM 5	5
DEZ.PUNKT	1	LIM 6	15
RLW UG	0.000	SLM 1	2
RLW OG	1.400	SLM 2	2
LINBER UG	0.6	SLM 3	2
LIN.GR.	24.0	SLM 4	3
NORM.B. -	4.0	SLM 5	3
NORM.B. +	12.0	SLM 6	1
STEIG	1.000	10 PAW	25.0
SCHNITTP	0.0000	% 10 PAW	30
C1*10E-6	30.00	50 PAW	8.5
C2*10E-6	600.00	% 50 PAW	30
D1*10E-6	20.00	90 PAW	1.5
IA TYP	0	% 90 PAW	65
		SFQ LIM	1.00

Tab. 2: Präzision in Serie (n = 20) der immuniturbidimetrischen T4-Bestimmung am RA-1000

$\bar{x}$ (ng/ml)	33,4	72,7	143	209
VK (%)	2,6	3,1	3,6	4,0

Tab. 3: Richtigkeit der immunturbidimetrischen T4-Bestimmung am RA-1000 vergleichend zu den Sollwerten von Richtigkeitskontrollserien für den Enzymun® T4 und dem Magic® Lite T4. Angaben in ng/ml

	Lympho-check			Gilford TDM 602			Gilford Ligand B 017601
	I	II	III	I	II	III	
Immunturbidimetrie RA-1000	29	61	153	79	126	187	75
Magic® Lite T4	31	70	160	75	112	149	68
Enzymun® T4	24	58	84	82	119	167	86

#### Vergleichsmethoden

Die Bestimmung von T4 in Patientenproben erfolgte vergleichend zu einer ELISA-Technik und einer LIA-Technik.

ELISA-Technik: Eingesetzt wurde der Enzymun-Test® T4 von Boehringer Mannheim (4), die Bestimmung erfolgte am vollmechanisierten Analysensystem ES 600 (Boehringer Mannheim). Die Kalibration wurde mit 5 Standards im Konzentrationsbereich von 0–250 ng/ml durchgeführt.

LIA-Technik: Verwendet wurde der Magic® Lite T4 Immunoassay (Corning Gießen) (5), gemessen wurde am Magic Lite Analyzer II (Corning Gießen). Die Kalibration erfolgte durch Eingabe einer Chargen-abhängigen Masterkurve. Vor jeder Analysenserie wurde diese durch eine 2-Punkt-Kalibration „rekalibriert“.

#### Statistische Auswertung

Die Vergleichsmessungen wurden statistisch ausgewertet mittels des linearen Regressionsverfahrens nach Passing und Bablok (6) und durch Berechnung der standardisierten Hauptkomponente (7).

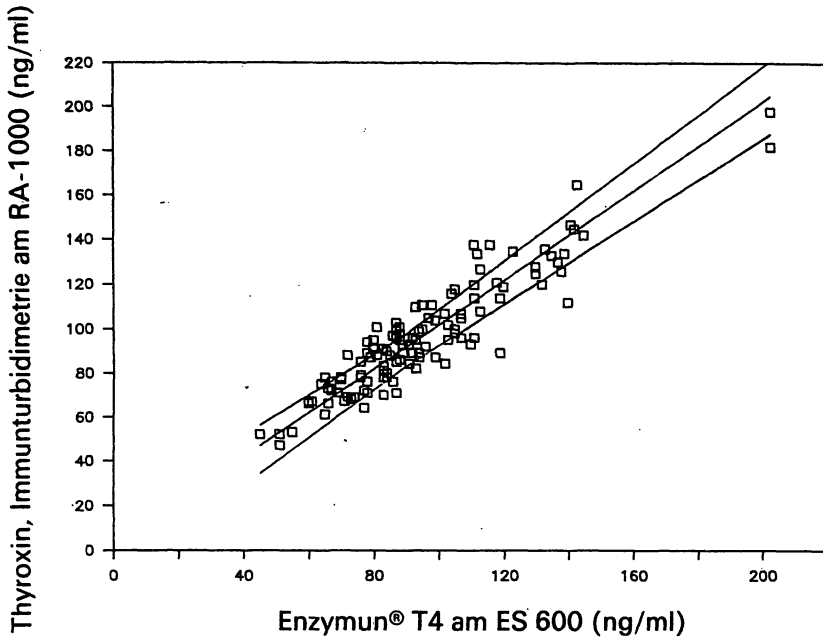


Abb. 2: Methodenvergleich an Patientenseren zwischen Magic Lite T4 (x) und immunturbidimetrischer T4-Bestimmung am RA-1000 (y). Auswertung nach Passing/Bablok; n = 110; Daten des Methodenvergleichs in Tab. 4

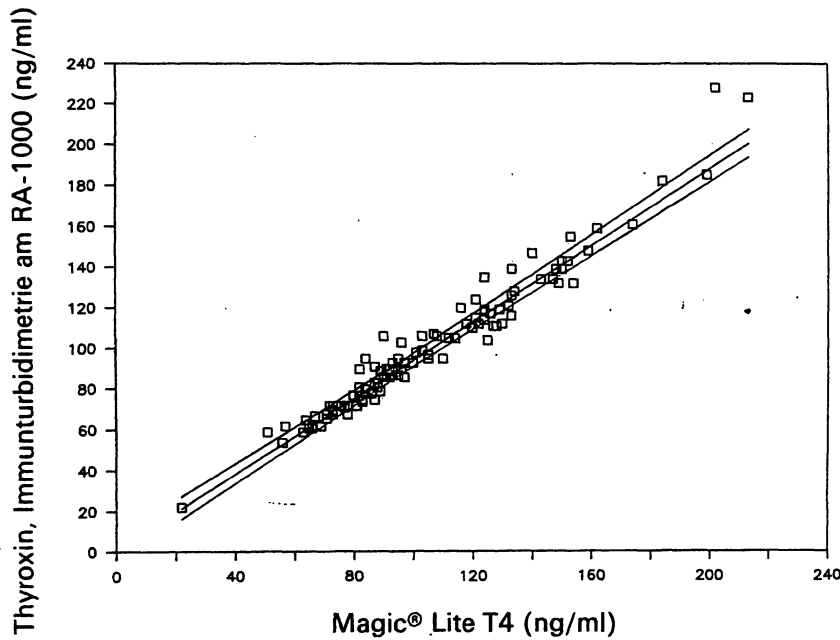


Abb. 3: Methodenvergleich an Patientenseren zwischen Enzymun T4 (x) und immunturbidimetrischer T4-Bestimmung am RA-1000 (y). Auswertung nach Passing/Bablok; n = 119; Daten des Methodenvergleichs in Tab. 4

## Ergebnisse

### Präzision

Für die immunturbidimetrische T4-Bestimmung wurde die Präzision in Serie (n = 20) mit 4 verschiedenen Poolseren in aufsteigender T4-Konzentration bestimmt. Wie aus Tab. 2 ersichtlich ist, wird, entsprechend dem Prinzip der immunturbidimetrischen Inhibitionstechnik, bei niedriger T4-Konzentration eine bessere Präzision erzielt als bei hoher. In den klinisch relevanten Entscheidungsbereichen Hypothyreose/Euthyreose und Euthyreose/Hyperthyreose liegt der VK bei 3,1% bzw. 3,6%.

Für die Präzision von Tag zu Tag, durchgeführt an 10 Analysentagen, wurden bei täglich neuer Kalibration fol-

gende VK-Werte ermittelt: 4,6% mit dem Kontrollserum Lyphocheck III (~ 160 ng/ml), 3,9% mit dem Kontrollserum Gilford I (~ 80 ng/ml).

### Meßbereich und untere Nachweisgrenze

Die untere Nachweisgrenze der immunturbidimetrischen T4-Bestimmung wurde durch Verdünnung von 3 Patientenproben mit 5% Rinderserumalbumin bestimmt und beträgt 6 ng/ml bei einer Präzision (VK) von 4,9%. Die Obergrenze des Meßbereiches liegt bei 210 ng/ml, diese Konzentration kann noch mit einer Präzision (VK) von 5,2% bestimmt werden. Bei höheren Konzentrationen wird aufgrund der nur noch geringen Extinktionsänderung die Präzision zunehmend schlechter, so daß Konzentrationswerte über 210 ng/ml generell mit 1:2 verdünnter

Tab. 4: Methodenvergleich an Patientenproben zwischen immunturbidimetrischer T4-Bestimmung am RA-1000, dem Magic® Lite T4 und dem Enzymun® T4.  $y = a + bx$ ; die Konfidenzbereiche von  $a$  und  $b$  für Passing/Bablok sind in Klammern gesetzt;  $ma$  = Streuung der Residuen um Passing/Bablok;  $S_{y/x}$  = Standardfehler der Residuen um die standardisierte Hauptkomponente;  $r$  = Korrelationskoeffizient

Darstellung	Passing/Bablok				stand. Hauptkomp.			r
	a	b	ma 68	ma 95	a	b	$S_{y/x}$	
Magic® Lite (x)	0,656	0,938	3,465	11,194	-1,518	0,968	5,485	0,979
vs. Immunturb. (y)	(-2,340 bis 3,976)	(0,905 bis 0,969)						
Enzymun® T4 (x)	2,000	1,000	6,394	14,124	3,426	0,979	7,188	0,925
vs. Immunturb. (y)	(-6,285 bis 7,878)	(0,927 bis 1,088)						

Probe nochmals gemessen werden müssen. Als Verdünnungslösung wird der 0-Kalibrator empfohlen.

### Richtigkeit

Die Richtigkeit der immunturbidimetrischen T4-Bestimmung wurde beurteilt durch Messung von

– Richtigkeitskontrollseren und Vergleich der erhaltenen Werte mit den methodenabhängigen Sollwertangaben,

– Patientenproben im Methodenvergleich zum Enzymun-Test® T4 und dem Magic® Lite T4.

In Tab. 3 sind die T4-Werte der immunturbidimetrischen Bestimmungsmethode vergleichend zu den methodenabhängigen Sollwertangaben von Richtigkeitskontrollseren dargestellt. Im Vergleich zu den anderen nichtradioaktiven Immunoassays werden bei 2 Seren stärkere methodenabhängige Differenzen gefunden.

Der Methodenvergleich an Patientenproben ist in den Abb. 2 und 3 dargestellt. Es trat keine Abweichung von der Linearität auf. Die immunturbidimetrische T4-Bestimmung am RA-1000 zeigt eine signifikante proportionale leichte Verminderung gegenüber dem Magic® Lite T4 in der Auswertung nach Passing/Bablok (Daten des Methodenvergleichs in Tab. 4). Gegenüber dem Enzymun® T4 liegen keine signifikanten Abweichungen vor, jedoch ist die Streuung der Werte hoch.

### Diskussion

Die turbidimetrische Bestimmung des Schilddrüsenhormons T4 ist mit einer Immuninhibitionstechnik an dem Random Access-Analyzer RA-1000 innerhalb von 10 min mit hoher analytischer Sensitivität und guter Präzision möglich. Das ist besonders wichtig, wenn die Analysenwerte schnell verfügbar sein sollen, z. B. bei Patienten mit Verdacht auf Thyreotoxikose oder zur Kontrolle einer thyreosuppressiven Behandlung 12–24 Std. nach der letzten Einnahme von Levothyroxin. Da immunturbidimetrische Methoden zur Bestimmung weiterer Schilddrüsenhormone noch nicht zur Verfügung stehen, ist der diagnostische Einsatz der immunturbidimetrischen T4-Bestimmung begrenzt.

Sowohl der Vergleich mit methodenspezifischen Sollwerten von Kontrollseren, als auch der Methodenvergleich an Patientenseren zeigt eine gute bis praktikable Übereinstimmung mit den beiden Vergleichsmethoden. Die nicht unerhebliche Streuung der Werte von Patientenproben im Methodenvergleich zum Enzymun®-Test T4 führen wir auf Schwierigkeiten zurück, die sich in unseren Händen mit der T4-Bestimmung am Analysensystem ES-600 ergaben.

Unter der Voraussetzung, daß in naher Zukunft auch Reagenzien zur immunturbidimetrischen Bestimmung weiterer Schilddrüsenhormone angeboten werden, ist die immuninhibitorische T4-Bestimmung als eine, anderen nichtradioaktiven immunochemischen Methoden gleichwertige Technik zur Diagnostik und Verlaufsbeurteilung von Schilddrüsenerkrankungen anzusehen.

### Schrifttum:

1. PFANNENSTIEL, P., PANITZ, N., RUMMENY, E.: Schilddrüsenfunktionen. In: Thomas, L., Labor + Diagnose, S.1019–1040. Med. Verlagsgesellschaft, Marburg 1988.
2. RICCOMI, H., MARSON, P. L., VAERMAN, J. P., HERMANS, J. F.: An automated nephelometric inhibition immunoassay for haptens. In: Hamm, E., Automated immuno-precipitation reactions, S.9–11. Edition Technicon, New York 1972.
3. VUNNAM, R., CRAINE, J., MARX, K. C., BIANCA, C. et al.: Particle enhanced turbidimetric immunoassays with the Technicon RA-1000 system, using agglutination inhibition techniques. Abstr.XII Internat. Congr. Clinical Chemistry, Rio de Janeiro 1984.
4. BORNER, K. et al.: Bestimmung von Thyroxin mit einem heterogenen Enzymimmunoassay: Ergebnisse einer gemeinsamen Erprobung. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 17, 471–481 (1979).
5. Es liegt nur zitationswürdige Literatur für den FT4- nicht aber für den T4-LIA vor.
6. PASSING, H., BABLOK, W.: J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 21, 709–720 (1983). A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies.
7. EISENWIENER, H. G., BABLOK, W., BARDORFF, W., BENDER, R., MARKOWETZ, D., PASSING, H., SPAËTHE, R., SPECHT, W., VÖLKERT, E.: Lab. med. 8, 232–244 (1984). Statistische Auswertung beim Methodenvergleich.

### Anschrift für die Verfasser:

Dr. A. Skurk  
Prof. Dr. L. Thomas  
Zentrallaboratorium  
Nordwest-Krankenhaus  
Steinbacher Hohl 2–26  
6000 Frankfurt 90