

# Schilddrüse 1975

Henning Symposium Publikation

Herausgegeben von

J. Herrmann, H. L. Krüskemper und B. Weinheimer

Geleitwort von K. Oberdisse

Mit Beiträgen von

D. D. Adams

F. Adlkofer

C. M. Aickin

G. Albers

D. Appleton

H. Arnold

R. E. Ballieux

R. Berberich

T. Bird

W. Börner

M. Brewis

C. W. Burke

A. W. Burrows

T. Chen

A. Chen-Stute

F. Clark

E. Cooper

H. Creutzig

J. R. Daly

T. F. Davies

M. Doepp

D. Doniach

F. Erhardt

J. G. Evans

D. C. Evered

A. J. Fairfax

R. Finke

T. Frank

H. Gerdes

B. Glöbel

R. Gotthier

S. F. Grebe

M. Grussendorf

K. Hackenberg

R. Hall

R. Hehrmann

H. G. Heinze

J. Herrmann

R. D. Hesch

B. Höffken

M. Hüfner

K. Joseph

H. Jüppner

M. Knöpfle

R. Ködding

P. Kotulla

H. J. Kröll

G. Krüskemper

H. L. Krüskemper

H. J. Lehr

K. P. Littmann

J. Mahlstedt

J. Marschner

H. Medau

H. Meinhold

E. Moll

A. von zur Mühlen

N. A. J. Mul

G. Nilsson

J. Nolte

E. Oberhausen

V. B. Petersen

C. Pinedo

I. Ramsay

C. Reiners

D. Reinwein

H. D. Röher

K. H. Rudorff

G. Ruppert

H. J. Rusche

H. Schleusener

U. Schmidt

C. G. Schneekloth

B. Schollmeier

P. C. Scriba

K. Seybold

R. A. Shakespear

B. R. Smith

P. Smith

G. Thiede

W. M. G. Tunbridge

R. Volpé

K. Wagner

R. Wahl

K. W. Wenzel

H. Wilhelm

E. T. Young

D. Zimmer

C. Zollikofer

198 Abbildungen, 57 Tabellen



Georg Thieme Verlag Stuttgart 1977

## Inhaltsverzeichnis

Geleitwort .....	V
Vorwort .....	VI
<u>Session I: IN-VIVO UND IN-VITRO VERFAHREN; METHODIK</u>	
Herrmann, R., Hesch, R.-D.: Radioimmunologische Bestimmung von T <sub>4</sub> und T <sub>3</sub> im Serum .....	1
Erhardt, F., Marschner, J., Scriba, P.C.: Radioimmunologische Bestimmung von TSH im Serum .....	15
Creutzig, H., Thiede, G.: Fortschritte auf dem Gebiet der in-vivo-Schilddrüsendiagnostik .....	23
Frank, Th., Schneekloth, C.G., Zollikofer, C., Albers, G.: Zur Differentialdiagnose szintigraphisch "stummer" Bezirke in der Schilddrüsenregion mit Ultraschall .....	36
<u>Session II: INTERPRETATION DER ERGEBNISSE VON IN-VITRO UND IN-VIVO-VERFAHREN</u>	
Herrmann, J.: Indikationen zur radioimmunologischen T <sub>3</sub> -Bestimmung .....	42
Wenzel, K.W.: Drei Jahre TRH-Test .....	54
Heinze, H.G., Zimmer, D.: Fortschritte in der Diagnostik des dekompensierten autonomen Adenoms .....	70
Oberhausen, E., Berberich, R., Glöbel, B., Gotthier, R.: Erfahrungen mit der Messung der Jodidclearance und der täglichen Jodaufnahme der Schilddrüse .....	81
Börner, W.: Heutige Wertigkeit der nuklearmedizinischen In-vivo-Diagnostik von Schilddrüsenkrankheiten ...	91
<u>Session III: EINFÜHRUNGEN UND ÜBERSICHTEN</u>	
Hesch, R.D.: Wirkungsweise der Schilddrüsenhormone ....	102
Schleusener, H., Kotulla, P., Adlkofer, F., Finke, R.: Wirkungsmechanismus und Bedeutung von schilddrüsenstimulierenden Antikörpern (thyroid stimulating immunoglobulins/TSI) bei der Entstehung der Hyperthyreose vom Typ Basedow .....	120
Hackenberg, K., Reinwein, D.: Immunologische Phänomene bei Schilddrüsenkrankheiten .....	131
Ramsay, I.: Thyroid Disease and Muscle Dysfunction ....	145

Session IV: IMMUNOLOGY IN THYROID DISEASE

Adams, D.D.: Thyroid-Stimulating Antibodies .....	154
Fairfax, A.J., Doniach, D.: Some Aspects of Thyroid Autoimmunity .....	160
Evered, D.C. et al.: Epidemiological Aspects of Thyroi- ditis and the Clinical Significance of Circulating Thyroid Antibodies .....	167
Nilsson, G.: Fine needle aspiration studies on the Askanazy cells in lymphoid goiter .....	175
Pinedo, C., Mul, N.A.J., Ballieux, R.E.: Antibodies mediated adherence in vitro of lymphoid cells to thyroid tissue in autoimmune thyroiditis .....	185
Volpé, R.: The role of the lymphocytes in the aetiology of Graves' disease .....	191

Session V: NEW ASSAYS FOR THYROID STIMULATORS;  
CONVERSION

Daly, J.R.: Assays for thyroid stimulating hormone ....	208
Smith, B.R., Davies, T.F.: Thyroid-stimulating immuno- globulins .....	217
Petersen, V.B.: The cytochemical assay of human thyroid stimulators .....	223
Burrows, A.W., et al.: Significance of low serum T <sub>3</sub> concentrations in the elderly sick .....	229
Meinhold, H., Wenzel, K.W.: Reverse T <sub>3</sub> : radioimmunolo- gical measurement in different thyroid states and kinetic studies .....	237
Hüfner, M., Grussendorf, M., Knöpfle, M.: Die direkte Messung von Reverse T <sub>3</sub> (rT <sub>3</sub> ) im menschlichen Serum .....	247
Herrmann, J., et al.: Excessive peripheral conversion of thyroxine (T <sub>4</sub> ) and triiodothyronine (T <sub>3</sub> ) during treatment of 2 cases of T <sub>3</sub> -thyrotoxicosis .....	260
Höffken, B., et al.: Biochemical Aspects of Monodeiodi- nation of Thyroxine .....	272
Wilhelm, H., Glöbel, B., Berberich, R.: Untersuchungen zur extrathyreoidalen Kinetik von T <sub>3</sub> und T <sub>4</sub> beim Menschen .....	282

Session VI: SPEZIELLE THEMEN

Krüskenper, G.: Psychodiagnostik bei Schilddrüsenfunk- tionsstörungen .....	288
Mahlstedt, J., et al.: Vergleich von TRH-Test und Sup- pressionstest mit quantitativer Szintigrammaus- wertung zur Beurteilung der Prognose autonomer Adenome unter prolongierter Jodzufuhr .....	297
Wahl, R., Hüfner, M., Grussendorf, M., Röher, H.D.: Untersuchungen zur thyreotropen Hypophysenfunktion nach Langzeitsuppressionsbehandlung bei Trägern blander Strumen und wegen blander Strumen subtotal Resezierten .....	305
Doeppe, M.: Feedback Mechanism in Thyroiditis .....	314

Chen, T., Chen-Stute, A.: Tagesprofil von Thyroxin und Trijodthyronin hypothyreoter Patienten unter Substitutionstherapie .....	332
Nolte, J., Arnold, H., Scriba, P.C.: Klinik und Biochemie des Riboflavinmangels. Hypothyreose durch Störung der Hormonbiosynthese .....	339
Littmann, K.-P., Gerdes, H., Schollmeier, B.: Klinische und experimentelle Befunde zur Wirkung von Lithium auf die Schilddrüsenfunktion und Thyroxinintoxikation .....	347
Doepp, M., Medau, H.J., Grebe, S.F.: Beziehung zwischen dem Carrierprotein TBG, TBPA und Albumin und den Schilddrüsen-in-vitro-Parametern bei Frauen mit und ohne Ovulationshemmern sowie Leber- und Nierenkranken .....	356
Ruppert, G., et al.: Vergleich von RIA und CPBA zur Thyroxin-Bestimmung im Serum .....	363
Rudorff, K.H., Herrmann, J., Krüskemper, H.L.: Ergebnisse mit einem Competitiven Ligand-Binding Assay (CLBA) für Thyroxin-bindendes Globulin (TBG) .....	372

## Radioimmunologische Bestimmung von TSH im Serum

F. ERHARDT, J. MARSCHNER, P.C. SCRIBA

II. Medizinische Klinik, Laboratorien für Klinische Chemie und Endokrinologie, Universität München

Die radioimmunologische TSH-Bestimmung vor allem zusammen mit dem TRH-Test hat sich in den letzten Jahren einen festen Platz unter den Laboratoriumsmethoden zur Diagnostik und Therapiekontrolle von Schilddrüsenerkrankungen erworben.

Seit Odell et al. (1) 1965 als erste die radioimmunologische TSH-Bestimmung im menschlichen Serum mit Hilfe der Doppelantikörpermethode beschrieben haben, sind eine Vielzahl von Veröffentlichungen zu diesem Thema erschienen.

Inzwischen sind mindestens 5 TSH-Kits auf dem Markt, die alle nach der Doppelantikörpermethode oder einer Variante der Doppelantikörpermethode zur Trennung von gebundenem oder freiem TSH arbeiten. Daneben sind Kits auf dem Markt, die nach der sog. Solid-Phase-Technik arbeiten. Alle käuflichen TSH-Kits und alle laboreigenen TSH-RIA's haben folgendes gemeinsam:

1. Verwendung eines  $^{125}\text{J}$ -markierten Thyreotropins als Tracer,
2. Verwendung eines gegen humanes Thyreotropin gerichteten spezifischen Antiserums in geeigneter Verdünnung (eventuell an eine feste Matrix gebunden), und
3. TSH-Standards, z.B. den internationalen Standard MCR 68/38 oder daran geeichte Standards.
4. Schließlich beinhalten die Doppelantikörpermethoden natives oder an eine polymere Matrix gebundenes präzipitierendes Antiserum.

Man kann sagen, daß die in den Kits verwendeten Reagenzien durchweg brauchbar sind.

Kits und laboreigene Methoden unterscheiden sich durch folgende Punkte:

1. Durch die Inkubationsvorschriften,
2. durch das Milieu, in dem Standards angesetzt werden, und
3. durch die Art der bound und free Trennung.

Ein im Frühjahr dieses Jahres von der Sektion Schilddrüse der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie durchgeführter Ringversuch zur radioimmunologischen TSH-Bestimmung (2) hatte experimentellen Charakter und verfolgte zwei Fragestellungen:

1. Sollte der Status quo der TSH-Bestimmung festgestellt werden, und
2. sollten Anhaltspunkte für methodische Verbesserungen, vor allem bezüglich Empfindlichkeit und Richtigkeit des TSH-Radioimmunoassays, gewonnen werden.

Bei diesem TSH-Ringversuch, dessen technische Durchführung in den Händen unserer endokrinologischen Gruppe in München lag, wurden nicht nur einzelne Kontrollwerte versandt, sondern zusätzlich eine komplette Eichkurve in TSH-armem Serum, um Unterschiede in der Messung in Serum und in Puffer in verschiedenen

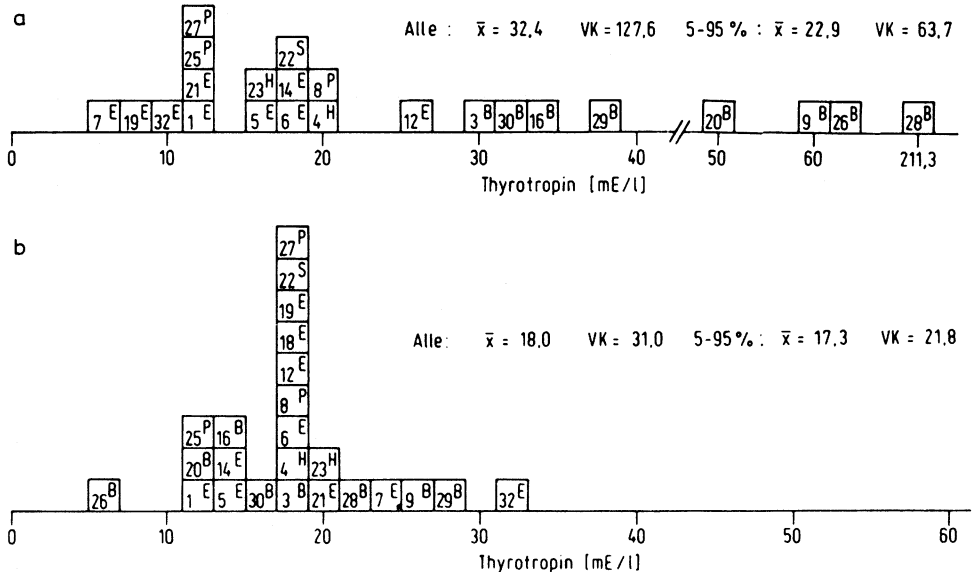


Abb. 1: a) Histogramm der Meßergebnisse einer Kontrollprobe (Poolbereich 15,1 - 20 mE/l hTSH) anhand der jeweiligen Standardkurve,  $\bar{x}$  = Mittelwert,  $VK$  = Variationskoeffizient. 5-95% = Mittelwert und  $VK$  nach Eliminierung der oberen und unteren 5% Extremwerte ( $\pm 1,7$  s-Bereich).  
 b) Histogramm der Meßergebnisse der gleichen Probe abgelesen auf der jeweiligen Wiederfindekurve.

Konzentrationsbereichen zu erfassen. Abb. 1 zeigt, was 24 Laboratorien für ein Kontrollserum, das 18  $\mu\text{E}$  TSH/ml enthielt, im einzelnen gemessen haben. Bei Ablesung von der laboreigenen, meistens in einem Puffermedium angesetzten Standardkurve streuen die Werte von 7 bis 211  $\mu\text{E}$  TSH/ml, das entspricht einem Variationskoeffizienten von Labor zu Labor von 127%. Wurde der Kontrollwert von der an jeden Teilnehmer versandten Wiederfindekurve in TSH-armem Serum abgelesen, so streuten die Werte nur noch zwischen 7 und 32  $\mu\text{E}$  TSH/ml, was einem Variationskoeffizienten von Labor zu Labor von 31% entspricht. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, daß die Vergleichbarkeit von radioimmunologisch gemessenen TSH-Werten enorm viel besser wird, -hier um einen Faktor 4- wenn TSH-Standardkurven prinzipiell in einem TSH-armen Serum angesetzt werden. Die nächsten drei Dias sollen Ihnen noch einmal die Diskrepanzen von TSH-Eichkurven aufzeigen, die vergleichsweise in Puffer und in TSH-armem Serum angelegt wurden. Die Bilder stammen ebenfalls aus dem Ringversuch. Das erste der drei Dias zeigt den Idealfall: Die in einem albuminhaltigen Puffer angelegte Standardkurve ist nahezu identisch mit einer Standardkurve, die in TSH-armem Serum angelegt ist. Wäre das immer so, bestünde kein Grund, das Anlegen von TSH-Standardkurven in Serum zu empfehlen.

Das zweite Dia zeigt eine Rechtsverschiebung der Standard-

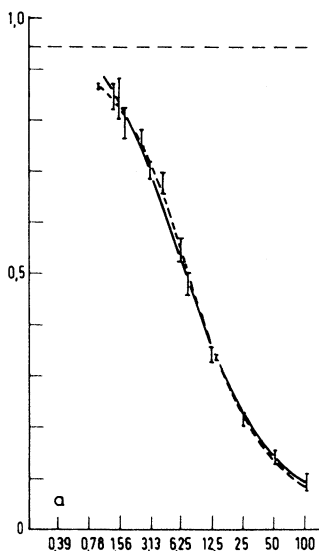


Abbildung 2

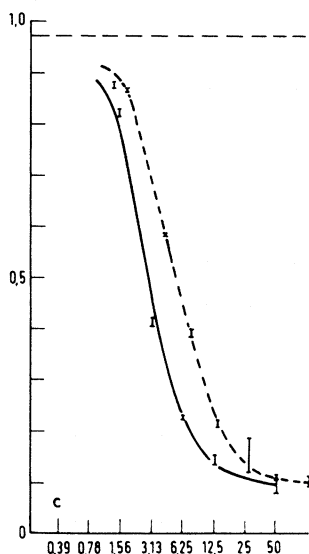


Abbildung 3

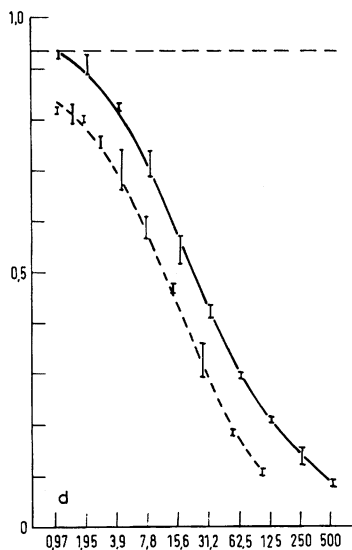


Abbildung 4

Ordinate:  $\frac{B-N}{B_0-N}$

Abszisse: Thyrotropin (mE/l)

Abb. 2 - 4:

Standardkurven = SK (—) und Wiederfindekurven = WK (---). Die Abszisse ist logarithmisch geteilt und gibt jeweils die Konzentrationen der laboreigenen Standardkurve wieder (s. Text).

Abb. 2: Methode: eigene Modifikation ("kalte" Vorinkubation, Doppelantikörper), reziproker Wert der Regression zwischen SK und WK ( $b_r$ ) = 0,93 im Bereich zwischen 80 und 15 %.

Abb. 3: Methode: eigene Modifikation ("kalte" Vorinkubation, Doppelantikörper)  $b_r$  = 2,44 zwischen 80 und 20 %.

Abb. 4: Methode: Byk-Mallinckrodt RIA-mat-TSH ("heiße" Vorinkubation, Doppelantikörper)  $b_r$  = 0,39 zwischen 80 und 20 %.

kurve in Serum im Vergleich zur Standardkurve in Puffer (Abb. 3). Das bedeutet, daß in diesem Radioimmunoassay von der Pufferstandardkurve zu niedrige Werte abgelesen werden.

Das dritte Bild (Abb. 4) dieser Serie demonstriert den umgekehrten Fall; die Standardkurve im Serum ist gegenüber der Puffer-Kurve nach links verschoben: In diesem Radioimmunoassay werden von der Pufferkurve zu hohe Serumwerte abgelesen.

Aus unserer fast vierjährigen Erfahrung mit eigenem TSH-Radioimmunoassay nach der klassischen Doppelantikörpermethode, bei der wir konsequent in jedem Ansatz zwei Standardkurven mitgeführt haben, nämlich eine in 4,2 %igem Rinderalbuminpuffer und eine zweite in TSH-armem Serum, wissen wir, daß zwar häufig Identität von Puffer und Standardkurve besteht, allzu oft jedoch Abweichungen in der eben von mir demonstrierten Weise auftreten. Diese Erfahrung und die daraus zu ziehende Konsequenz, die Standardkurven in TSH-armem Serum anzulegen, wurde durch den TSH-Ringversuch voll bestätigt.

Die radioimmunologische TSH-Bestimmung ist zwar nicht unempfindlicher als andere Radioimmunoassays, doch liegen die basalen TSH-Spiegel mit einem Normalbereich von 0,5 - 3,8  $\mu\text{E/ml}$  (3, 4) so niedrig, daß alle vernünftigen Möglichkeiten zur Empfindlichkeitssteigerung eines Radioimmunoassays ausgenutzt werden müssen, um im Basalbereich noch empfindlich TSH messen zu können. Die Empfindlichkeit eines Radioimmunoassays reichte in keinem Fall bisher aus, um hyperthyreote TSH-Werte signifikant von niedrig-normalen basalen TSH-Werten zu unterscheiden. Neben dem Einsatz von Tracer in geringer Konzentration und TSH-Antiserum in einer Konzentration, die zwischen 20 und 40 % bindet, führt die kalte Vorinkubation an TSH zu einer Empfindlichkeitssteigerung der Messung um einen Faktor 2 - 5 gegenüber der gleichzeitigen Inkubation. Auf Abb. 5 sind Standardkurven dargestellt, die sich nur durch die Inkubationsbedingungen unterscheiden. Kurve A zeigt eine Standardkurve mit heißer Vorinkubation, bei Kurve B wurden Tracer, Standard und Antiserum gleichzeitig zusammengemischt, Kurve C und D sind Standardkurven mit kalter Vorinkubation, wobei bei C zwei Tage kalt vorinkubiert und dann mit Tracer drei Tage weiter inkubiert wurde, bei Kurve D wurde fünf Tage kalt vorinkubiert und dann drei Tage mit Tracer weiter inkubiert. Die Empfindlichkeit, gemessen an der unteren Nachweisgrenze, steigt von Kurve A zu Kurve D von 10 über 2 auf 0,8 und 0,4  $\mu\text{E TSH/ml}$ . Auch diese Ergebnisse konnten durch den TSH-Ringversuch bestätigt werden: Methoden, die eine heiße Vorinkubation einschlossen, zeigten im niederen Meßbereich flachere Eichkurven als Methoden, die gleichzeitige Inkubation oder sogar kalte Vorinkubation einschlossen. So stieg der mittlere Variationskoeffizient beim Übergang von kalter über gleichzeitige bis zur heißen Vorinkubation entsprechend dem flacheren Kurvenverlauf und der damit verbundenen schlechteren Präzision von 24 über 36 auf 48 % an.

Abb. 6 zeigt Ihnen das an unserer Klinik angewandte Pipettier- und Inkubationsschema für den Routine-TSH-RIA, wie er seit etwa einem Jahr automatisiert durchgeführt wird. Die Inkubationszeiten sind dabei wesentlich länger als in den meisten



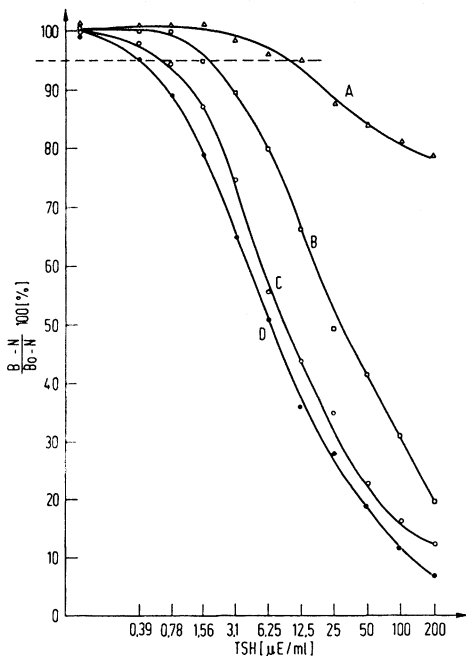


Abb. 5:

Einfluß der Vorinkubation auf Standardkurven in Puffer B. Spezifische Aktivität des  $^{125}\text{J}$ -TSH = 36 mCi/mg; 22600 Imp./min per Probe = 1250 pg

A: 44 h Vorinkubation mit Tracer und Antikörper 1; anschließend 63 h Inkubation mit Standard ( $\Delta - \Delta$ )

B: 63 h gleichzeitige Inkubation in Tracer, Standard und Antikörper I ( $\square - \square$ )

C: 44 h Vorinkubation von Standard und Antikörper I; anschließend 63 h mit Tracer ( $\circ - \circ$ )

D: 140 h Vorinkubation mit Standard und Antikörper I, anschließend 63 h mit Tracer ( $\bullet - \bullet$ )

Die gestrichelte Linie zeigt die untere Nachweisgrenze für alle 4 Kurven.

## 1. Diluter System:

	sample	1st anti-body <sup>7)</sup>	buffer	number of replicates
zero-standard ( $B_0$ )	-	200 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$	9
standards <sup>9)</sup> (0.39–100 mU/l)	100 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$	-	3
nonspecific binding	-	-	300 $\mu\text{l}$	6
unknowns	100 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$	-	2

Incubation for 60 hours at room temperature.

## 2. Pipetting Unit:

Addition of 100  $\mu\text{l}$   $^{125}\text{I}$ -labelled thyrotropin<sup>9)</sup> (20000 cpm, specific activity 50 Ci/g) to each vial.

Incubation for 40 hours at room temperature.

## 3. Pipetting Unit:

Addition of 100  $\mu\text{l}$  2nd antibody<sup>10)</sup> to each vial.

Incubation for 14 hours at room temperature.

Abb. 6:

Arbeitsschema für den TSH-Doppelantikörper-Radioimmunoassay.

Kit-Vorschriften. Das hängt vor allem damit zusammen, daß wir riesige Serien mit bis zu tausend Proben in einem Ansatz haben und wir durch lange Vorinkubation nicht nur die Empfindlichkeit steigern, sondern durch die langen Pipettierzeiten bedingte Unterschiede in den Inkubationszeiten damit ausgleichen. In jedem Assay werden 9 Nullwerte für die Berechnung der unteren Nachweisgrenze mitgeführt, sowie 6 unspezifische Bindungen also Proben ohne Antiserum. Die übrigen Punkte der Standardkurve werden in Dreifachwerten angelegt. Außerdem lassen wir zwei Kontrollen, eine im niedrigen Bereich bei etwa 1  $\mu$ E und eine zweite bei etwa 20  $\mu$ E TSH/ml am Anfang und am Ende eines jeden Ansatzes mitlaufen. Wir setzen am Freitag an, wobei 0,1 ml Serum mit 0,2 ml Antiserum in einer Verdünnung, die etwa 40 % des Tracers zu binden vermag, zusammenpipettiert werden. Am Montag früh werden mit einer Hamilton-Spritze 0,1 ml  $^{125}\text{J}$ -TSH hinzugeschossen, dann 30 - 40 Stunden weiter inkubiert und schließlich am Dienstag abend 0,1 ml präzipitierendes Antiserum ebenfalls mit einer Hamilton-Spritze hinzupipettiert. Am nächsten Morgen erfolgt die Bound/Free-Trennung durch Filtration (5). Bis vor einem Jahr wurde bei uns durch Zentrifugation und Absaugen des Überstandes die Bound/Free-Trennung durchgeführt. Dieses von uns seit Jahren durchgeführte "klassische" Doppelantikörperverfahren bietet den großen Vorteil, daß in keinem Schritt des Radioimmunoassays geschüttelt werden muß, da beim Pipettieren mit der Hamilton-Spritze ausreichend durchmischt wird und das Reaktionsgemisch homogen bleibt, so daß die Durchführung bequem ist, sich leicht mechanisieren läßt und daher auch für große Probenserien geeignet ist (6).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß es sich nach den Erfahrungen der letzten Jahre und aufgrund der Ergebnisse eines TSH-Ringversuchs empfiehlt, zur Steigerung der Richtigkeit TSH-Standardkurven für die TSH-Messung im Serum stets in TSH-armem Serum (7) anzulegen und durch Anwendung kalter Vorinkubation Empfindlichkeit und Präzision der radioimmunologischen TSH-Bestimmung zu verbessern.

#### Literatur:

1. Odell, W.D., J.F. Wilber, W.E. Paul, J. Clin. Endocrinol. Metab. 25, 1179, 1965.
2. Marschner, J., F.W. Erhardt, P.C. Scriba, Z. Klin. Chem. Biochem. 14, 345, 1976.
3. Erhardt, F.W., J. Marschner, R.C. Pickardt, P.C. Scriba, Z. Klin. Chem. Biochem. 11, 381, 1973.
4. Erhardt, F.W., P.C. Scriba, Ärztl. Lab. 20, 191, 1974.
5. Erhardt, F.W., J. Henner, J. Marschner, P.C. Scriba, in: Nuklearmedizin, 418, Eds: H.W. Pabst, G. Hör, A.H. Schmidt, F.K. Schattauer-Verlag Stuttgart - New York, 1975.
6. Marschner, J., F.W. Erhardt, J. Henner, P.C. Scriba, Z. Klin. Chem. Biochem. 13, 481, 1975.
7. Erhardt, F.W., J. Marschner, P.C. Scriba, Z. Klin. Chem. Biochem. 13, 249, 1975.