

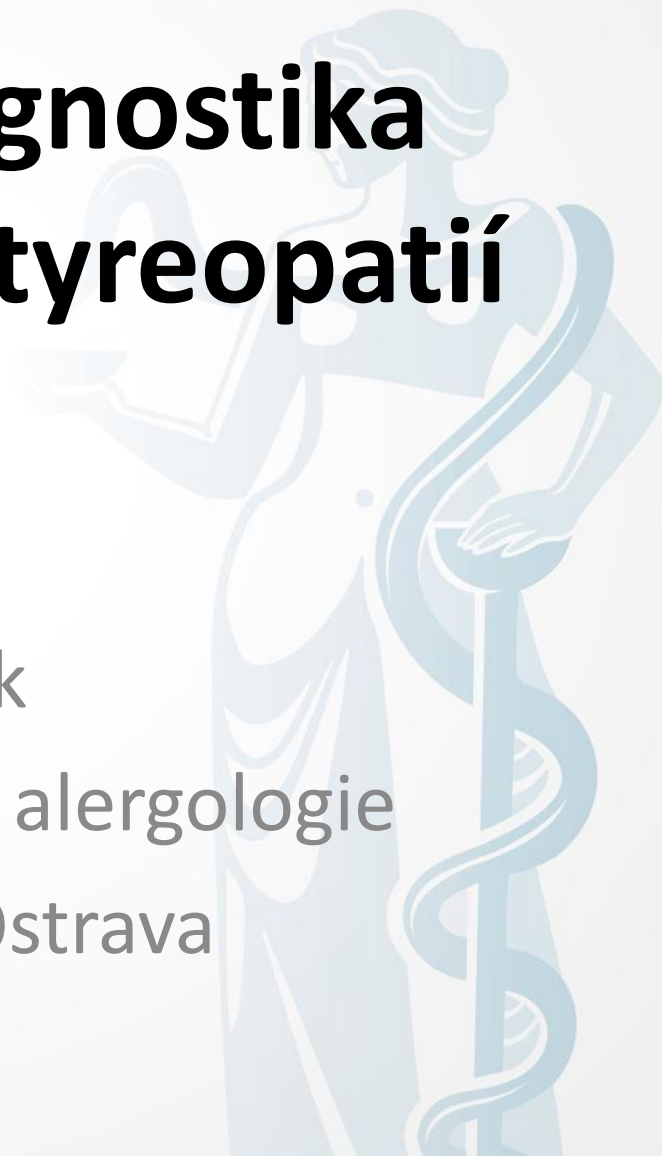


Laboratorní diagnostika autoprotilátek u tyreopatií

Jan Martinek

Oddělení Imunologie a alergologie

Zdravotní ústav, Ostrava





Autoimunitní onemocnění štítné žlázy - Úvod

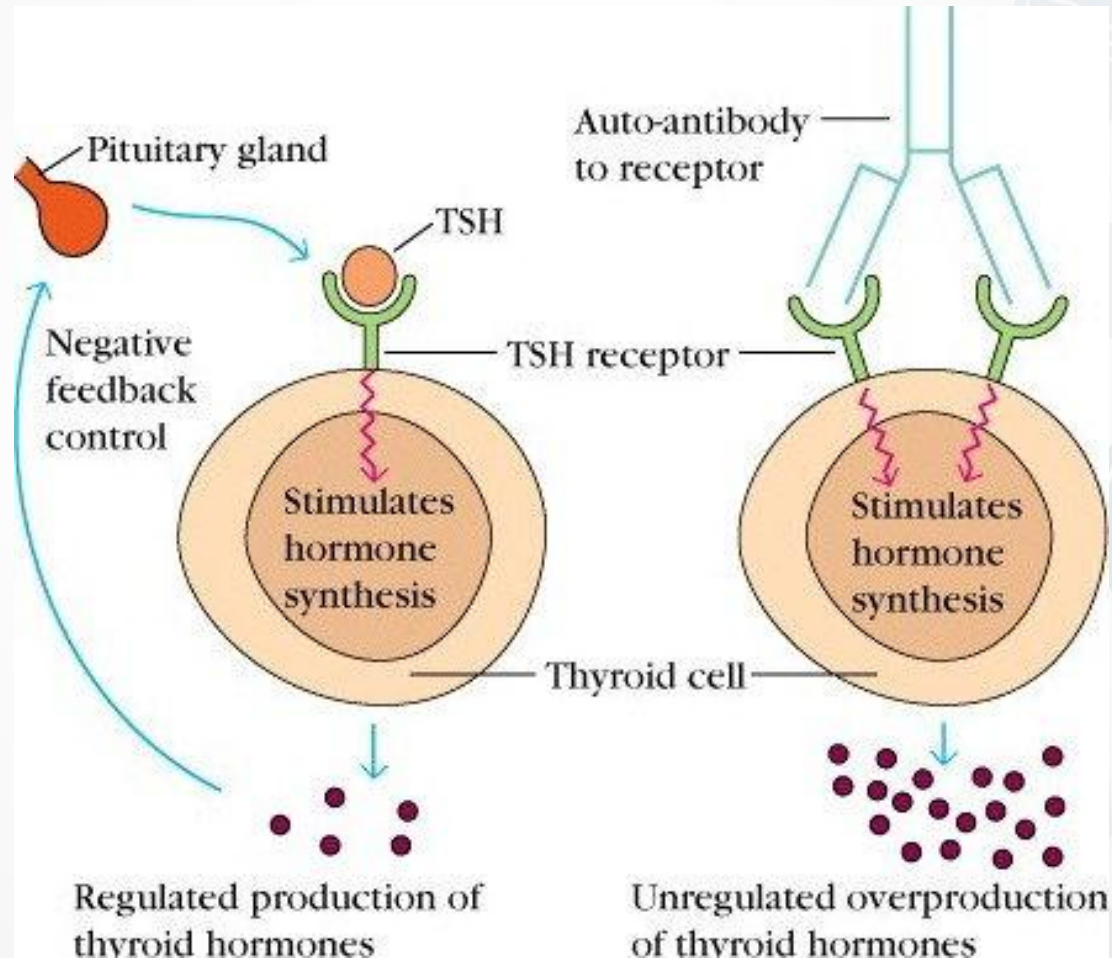
- Autoimunitní onemocnění štítné žlázy (AITD) je důsledek poškození buněk štítné žlázy humorálním a především buněčným mechanismem.
- Poškození buněk nastává tehdy, když se autoreaktivní T-lymfocyty a/nebo autoprotiilátky váží na membrány tyreoidálních buněk a tím je započat imunopatologický proces.
- U AITD se uplatňují tři hlavní tyreoidální autoantigeny - tyreoperoxidáza (TPO), tyreoglobulin (Tg) a TSH receptor.



Gravesova-Basedová nemoc

- Gravesova nemoc (GD) je autoimunitní onemocnění zprostředkované autoprotiilátkami a charakterizované tyreotoxikózou, strumou a orbitopatií.
- Cirkulujícími autoprotiilátky napodobují působení TSH, vážou se a aktivují TSHr, což vede ke zvýšené syntéze a uvolnění hormonů štítné žlázy (hypertyreóza) a hypertrofie folikulárních buněk štítné žlázy (vole).
- Ačkoli je definována jako autoimunitní onemocnění orgánově specifické, příznaky GD jsou multiorgánové, a to buď autoimunitním procesem nebo jako komplikací tyreotoxikózy.

Schéma – Hormony štítné žlázy





Genetika + GD

- Etiologie GD není stále známa, multifaktoriální onemocnění, komplexní interakcí mezi genetickou predispozicí a environmentálními faktory, která vede ke ztrátě imunitní tolerance k tyreoidálním antigenům a iniciizaci autoimunitní reakci
- Vliv prostředí (kouření, infekce, stres, léky, nedostatek mikronutrientů, příjem iodu)
- Immune regulatory genes (HLA-DR, CTLA4, CD40, PTPN22 a Thyroid specific genes (thyroglobulin, TSHR), ale jejich vliv je malý 1)
- Předpokládá se, že GD není dědičné onemocnění, ale často se objevuje spolu s autoimunitní tyroiditidou v rámci rodinných příslušníků

1) Tomer Y, Huber A. The etiology of autoimmune thyroid disease: a story of genes and environment. J Autoimmun 2009 May-Jun;32(3-4):231-9.



TSH receptor

- Receptor pro TSH je členem superrodiny receptorů se sedmi transmembránovými doménami, které jsou spojené s G- proteiny. Gen receptoru pro TSH o molekulové hmotnosti 60 kb umístěný na dlouhém raménku chromozomu 14q31
- Má dvě podjednotky, extracelulární A a transmembránovou B
- Aktivace G-proteinů komplexem hormon-receptor má za následek stimulaci produkce cAMP pomocí adenylátcyklázy



Protilátky

- Je popsáno několik variant a-TSHr: stimulující, blokující a neutrální.
- a-TSHr, podobně jako TSH, se primárně váže na N-terminální část extracelulární domény TSHr a aktivuje dráhu transdukce signálu cAMP – především STIMULUJÍCÍ protilátky, vedoucí ke stimulaci tvorby tyroidních hormonů a proliferaci tyrocytů
- Jiné typy protilátek mohou TSHr antagonizovat nebo blokovat účinek TSH a tím způsobit hypotyreózu u některých pacientů s různými typy autoimunitní tyroiditidy, zejména Hashimotovou tyreoiditidou 1)
- Neutrální (nově nazývané i apoptické) a-TSHr jsou namířeny proti cleavage region a mohou indukovat signální dráhy odlišné od dráhy cAMP a indukují apoptózu tyrocytů 2)

1) (Kahaly GJ, Diana T. TSH receptor antibody functionality and nomenclature. Front Endocrinol (2017)

2) Danilo Villalta, Federica D'Aurizio, Mirella Da Re, Debora Ricci, Francesco Latrofa, Renato Tozzoli: Diagnostic accuracy of a new fluoroenzyme immunoassay for the detection of TSH receptor autoantibodies in Graves' disease.



MOMENKLATURA

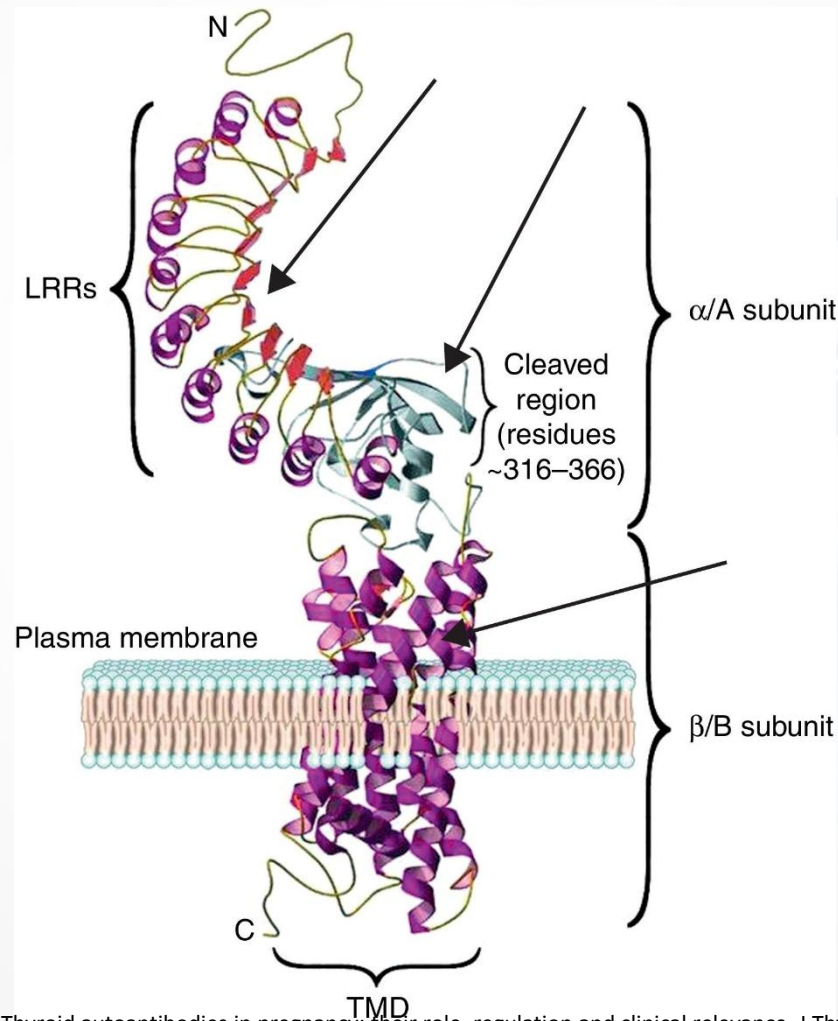
dle Kahaly GJ, Diana T. TSH receptor antibody functionality and nomenclature. Front Endocrinol (2017) 8:28.10.3389/fendo.2017.00028

TABLE 1 | Terminology for TSH receptor antibodies used in bioassays and binding assays.

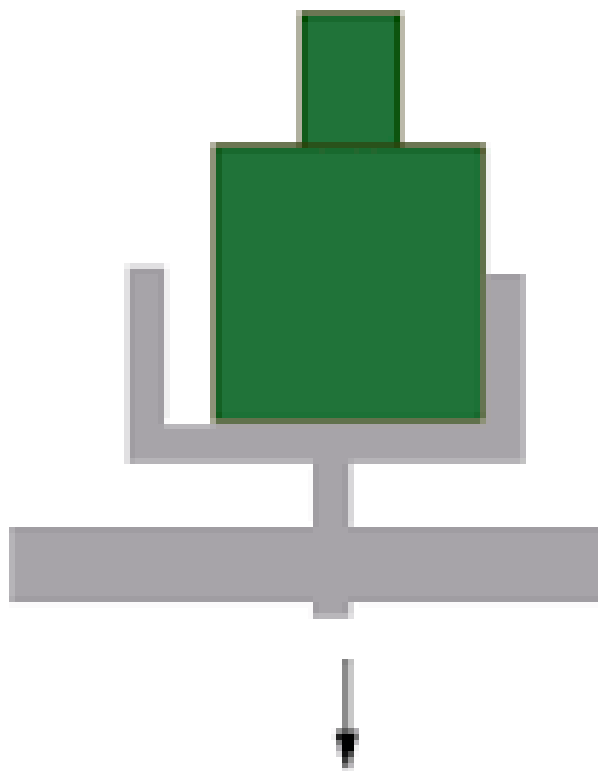
	Abbreviation
Cell-based bioassay	
• TSH-R-stimulating antibodies	TSAb
• TSH-R-stimulating immunoglobulins	TSI
• TSH-R-blocking antibodies	TBAb, TSB-Ab, or TRBAb
• TSH-R-stimulating blocking antibodies	TRBAb
• TSH-R-blocking immunoglobulins	TBI
Competitive-binding assay	
• TSH-R-binding inhibitory immunoglobulins	TBIi



Stimulující – N-terminál region
Neutralní – Cleavage region
Blokující – C-terminál region

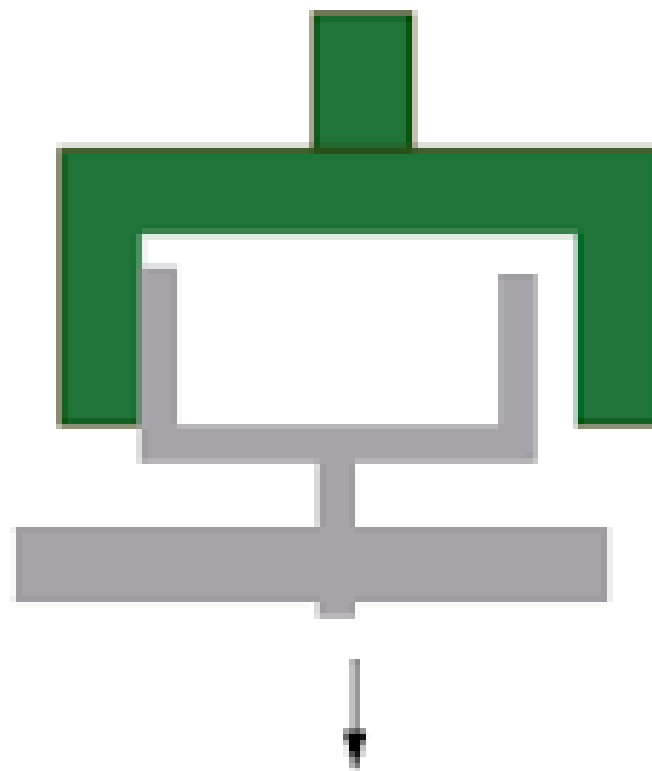


Agonist antibody



Cell stimulation

Antagonist antibody



Cell blockade



Protilátky

- Přítomnost a-TSHr vylučuje další tyreotoxikózy.
- Koncentrace protilátek neslouží pouze k určení diagnózy, ale i k predikci vývoje onemocnění 1),2)
- Přítomnost protilátek a-TSHr v těhotenství je rizikovým faktorem pro dysfunkci štítné žlázy novorozence v důsledku transplacentárního přenosu mateřských protilátek

1) Jang SY, Shin DY, Lee EJ, Lee SY, Yoon JS. Relevance of TSH-receptor anti- body levels in predicting disease course in Graves' orbitopathy: comparison of the third-generation TBII assay and Mc4-TSI bioassay. *Eye (Lond)* (2013) 27:964–71

2) Bartalena L, Burch HB, Burman KD, Kahaly GJ. A 2013 European survey of clinical practice patterns in the management of Graves' disease. *Clin Endocrinol* (2016) 84:115–20.



Protilátky

- a-TSHr je patogenetický znak GD, detekovatelný prakticky u všech pacientů s GD. Protilátky jsou zodpovědné za patologické funkce nemoci (stimulace růstu a funkce štítné žlázy, orbitopatie, dermatologické potíže)1).
- a-TSHr se účastní patogeneze u hypotyroidismu i u atrofické formy Hashimotové tyreoiditidy 2)
- TSHr je exprimován v řadě extra-tyroidních buněk, včetně fibroblastů, adipocytů a kostních buněk, kde je známo, že moduluje funkci cílových buněk

1) Michalek K, Morshed SA, Latif R, Davies TF. TSH receptor autoantibodies. *Autoimmun Rev* (2009) 9:113–6.
doi:10.1016/j.autrev.2009.03.012

2) Giuliani C, Monaco F. Adult primary hypothyroidism. In: Monaco F, editor. *Thyroid Diseases*. Boca Raton, FL: CRC Press (2012). p. 171–94



Protilátky

- Titr a-TSHr taky klesají po tyroidektomii (částečné či celkové), kvůli odstranění zdroje antigenu
- Naopak nárůst titrů a-TSHr pozorujeme po léčbě radioiodine I_{131} (asi dle uvolnění antigenů a zpracování antigenů antigen-presentujícími buňkami)



Protilátky + typ

- Bylo prokázáno, že nedostatečná korelace mezi koncentracemi a-TSHr a klinickým stavem pacienta je většinou způsobena tím, že protilátky a-TSHr v oběhu jsou heterogenní.
- Přejchod z TSAbs na TBAbs je zodpovědný za vývoj hypotyreózy u malého procenta pacientů s Gravesovou nemocí a naopak.
- Skutečnost, že heterogenní protilátky a-TSHr mohou koexistovat u jednoho pacienta a měnit se v průběhu času, je jedním z důvodů, proč bylo těžké vyvinout diagnosticky přesné testy na stanovení protilátek a-TSHr.
- Klinické projevy pacientů s Gravesovou chorobou, kteří vykazují přítomnost protilátek TSAb i TBAb/TSBAb budou závislé spíše na relativní koncentraci a afinitě predominantní protilátky.



Protilátky - sledování

- Sledování hladin TSAb přidává další rozměr k hodnocení aktivity GD s potenciálem předpovědět recidivu nebo remisi u jednotlivých pacientů
- Vysoká perzistentní hladina TSAb je spojena s aktivními a závažnými systémovými projevy a se špatnou odezvou na terapii. Naopak nízké hladiny TSAb jsou nacházeny u pacientů v remisi



Diagnostika

- a-TSHr lze měřit v podstatě dvěma typy testů:
 - Biologickým testem (biotestem, bioassay) které detekují produkci cAMP v buněčných kulturách inkubovaných se sérymi pacientů. Tyto testy identifikují pouze stimulační a-TSHr. Biotesty prokazují nejen přítomnost Ab, ale také jejich funkční aktivitu a účinnost. Historicky sloužily biotesty k výzkumu, ke studiu patofyziologie GD.
 - Protilátkové testy (vazebné, receptorové). Naopak receptorové metody rutinně používané v klinických laboratořích, udávají pouze přítomnost nebo nepřítomnost a-TSHr a jejich koncentrace, ale neuvádějí jejich funkční aktivitu 2)
- Tento základní rozdíl v uspořádání metody vysvětluje, proč biotesty a protilátkové testy vykazují nižší korelaci ($r = 0,31 - 0,65$) 1).

1)Gupta MK. Thyrotropin-receptor antibodies in thyroid diseases: advances in detection techniques and clinical application. Clin Chem Acta 2000;293:1-29

2) Kahaly GJ. Bioassays for TSH receptor antibodies: quo Vadis? Eur Thyroid J. 2015;4:3–5. doi: 10.1159/000375445.



Biotesty

- Biotesty mohou detekovat funkční změny u heterogenních a-TSHr.
- Skutečnost, že heterogenní protilátky a-TSHr mohou koexistovat u jednoho pacienta a měnit se v průběhu času, je jedním z důvodů, proč bylo těžké vyvinout diagnosticky přesné testy na stanovení protilátek a-TSHr.
- Biotesty mohou zlepšit péči o pacienta ve smyslu „personalisované medicíny“.
- Biotesty jsou nabízeny referenčními laboratořemi, je jistý předpoklad, že by se mohly více rozšířit.

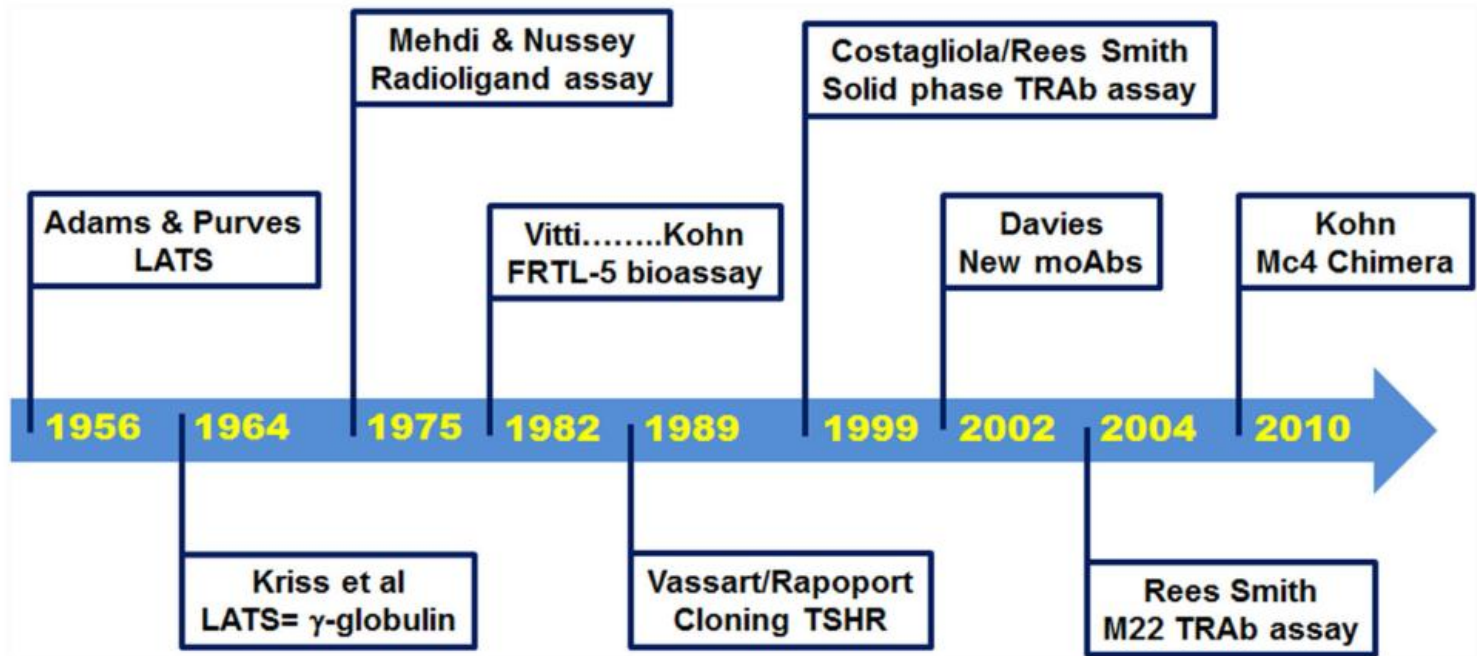


Biotesty

- Během posledních 60 let se biologická analýza a-TSHr vyvinula těžkopádných a časově náročných postupů na geneticky upravené testy založené na buňkách, které jsou charakterizovány dobrou proveditelností a rychlými provozními časy, a které jsou také k dispozici jako komerční sady.
- Komerčně dostupný biotest je Thyretain fa Quidel, který detekuje stimulační aktivitu a-TSHr pomocí chimérického TSHR a genu pro cAMP (signalizace luciferázou). Je schválen FDA pro použití v klinických laboratořích.



HISTORIE



Historický vývoj metod pro měření a-TSHr – dle *Giuliani et.al., 2016*.

Cesidio Giuliani,^{1,*} [Motoyasu Saji](#),² [Ines Bucci](#),¹ and [Giorgio Napolitano](#): Bioassays for TSH Receptor Autoantibodies, from FRTL-5 Cells to TSH Receptor–LH/CG Receptor Chimeras: The Contribution of Leonard D. Kohn. [Front Endocrinol \(Lausanne\)](#). 2016; 7: 103.



LATS

- V r. 1956 Adams a Purves zjistili, že séra pacientů s tyreotoxikózou indukují abnormální prodlouženou odpověď v TSH testu (s morčetem).¹⁾²⁾
- Nazvali jej “abnormal thyroid stimulator,” posléze “long-acting thyroid stimulator” (LATS) ²⁾³⁾, bylo jasné, že je odlišný od TSH a není produkován hypofýzou.
- V roce 1964 byla LATS identifikována jako protein, podobný protilátkám ⁽⁴⁾ a další studie jednoznačně potvrdily, že se jedná o IgG ^(5,6).
- První testy k detekci LATS měly nízkou senzitivitu (60-70%) ⁷⁾.
- Významné zlepšení v testech nastalo v r. 1975, a to s vývojem radioligandového receptorového testu. Test hodnotil inhibici séra od pacientů s GD vázanými radioaktivně značeného TSH na lidské tyroidní membrány ⁽⁸⁾. Test byl nicméně stále zatížen nízkou přesností.
- Další zlepšení přineslo nahrazení tyroidální membrány částečně vyčištěného TSHr - liquid phase first-generation immunoassay, používaná dalších 20 let ^{9,10)}, specifita 99%, senzitivita 80%. ¹¹⁾

1)Adams DD, Purves HD. Abnormal responses in the assay of thyrotropin. *Proc Univ Otago Med Sch* (1956) 34:11–5.

2)Adams DD. The presence of an abnormal thyroid-stimulating hormone in the serum of some thyrotoxic patients. *J Clin Endocrinol Metab* (1958) 18:699–712. doi:10.1210/jcem-18-7-699

3) Adams DD. Bioassay of long-acting thyroid stimulator (LATS); the dose-re- sponse relationship. *J Clin Endocrinol Metab* (1961) 21:799–805.

4) Kriss JP, Pleshakov V, Chien JR. Isolation and identification of the long-acting thyroid stimulator and its relation to hyperthyroidism and circumscribed pretibial myxedema. *J Clin Endocrinol Metab* (1964) 24:1005–28. doi:10.1210/jcem-24-10-1005

5) Kriss JP. Inactivation of long-acting thyroid stimulator (LATS) by anti- kappa and anti-lambda antisera. *J Clin Endocrinol Metab* (1968) 28:1440–4. doi:10.1210/jcem-28-10-1440

6) Volpé R. The immunologic basis of Graves’s disease. *N Engl J Med* (1972) 287:463–4. doi:10.1056/NEJM197208312870910

7) McKenzie JM. Review: pathogenesis of Graves’ disease: role of the long-acting thyroid stimulator. *J Clin Endocrinol Metab* (1965) 25:424–31.

8) Mehdi SQ, Nussey SS. A radio-ligand receptor assay for the long-acting thy- roid stimulator. Inhibition by the long-acting thyroid stimulator of the binding of radioiodinated thyroid stimulating hormone to human thyroid membranes. *Biochem J* (1975) 145:105–11. doi:10.1042/bj1450105

9)Shewring G, Rees Smith B. An improved radioreceptor assay for TSH receptor antibodies. *Clin Endocrinol* (1982) 17:409–17. doi:10.1111/j.1365-2265.1982.tb01607.x

10)Southgate K, Creagh FM, Teece M, Kingswood C, Rees Smith B. A receptor assay for the measurement of TSH receptor antibodies in unextracted serum. *Clin Endocrinol* (1984) 20:539–48. doi:10.1111/j.1365-2265.1984.tb00102.x

11)Tozzoli R, Bagnasco M, Giavarina D, Bizzarro N. TSH receptor autoan- tibody immunoassay in patients with Graves’ disease: improvement of diagnostic accuracy over different generations of methods, systematic review and meta-analysis. *Autoimmun Rev* (2012) 12:107–13. doi:10.1016/j. autrev.2012.07.003



FRTL-5

- Souběžně s vývojem radioligandových receptorových testů docházelo k vývoji „biotestů“. Změna v in vivo na in vitro, jako je použití primárních buněčných kultur 1)
- Další zlepšení přišlo s použitím FRTL-5 buněk – netransformovaných buněčných linií krysích thyroid epithelial buněk v kontinuální kultuře 2). Test byl založen na schopnosti purifikovaných IgG indukovat produkci cAMP. Následně bylo umožněno využít pacientské séra 3)
- Tento test nesloužil jen pro diagnostiku, ale měl zásadní význam v pochopení patfyz vlastností a-TSHr.
- Kohn et.al. 4),5),6) vyvinuli monoklonální protilátku k hodnocení jejich funkčních vlastností.
- Použití buněk FRTL-5 také umožnilo další studium funkční heterogenity a-TSHr (samostatné posouzení účinků jednotlivých IgG na dvě odlišné buněčné aktivity: aktivity produkce cAMP a buněčného růstu) 7)

1)Toccafondi RS, Aterini S, Medici MA, Rotella CM, Tanini A, Zonefrati R. Thyroid-stimulating antibody (TSAb) detected in sera of Graves' patients using human thyroid cell cultures. Clin Exp Immunol (1980) 40:532–9.

2) Ambesi-Impiombato FS, Parks LAM, Coon HG. Culture of hormone-dependent functional epithelial cells from rat thyroids. Proc Natl Acad Sci U S A (1980) 77:3455–9. doi:10.1073/pnas.77.6.3455

3) Vitti P, Chiovato L, Lopez G, Lombardi A, Santini F, Mammoli C, et al. Measurement of TSAb directly in serum using FRTL-5 cells. J Endocrinol Invest (1988) 11:313–7. doi:10.1007/BF03350157

4) Yavin E, Yavin Z, Schneider MD, Kohn LD. Monoclonal antibodies to the thyrotropin receptor: implications for receptor structure and the action of autoantibodies in Graves' disease. Proc Natl Acad Sci U S A (1981) 78:3180–4. doi:10.1073/pnas.78.5.3180

5) Valente WA, Vitti P, Yavin Z, Yavin E, Rotella CM, Grollman EF, et al. Monoclonal antibodies to the thyrotropin receptor: stimulating and blocking antibodies derived from the lymphocytes of patients with Graves' disease. Proc Natl Acad Sci U S A (1982) 79:6680–4. doi:10.1073/pnas.79.21.6680

6) Valente WA, Yavin Z, Yavin E, Grollman EF, Schneider M, Rotella CM, et al. Monoclonal antibodies to the thyrotropin receptor: the identification of blocking and stimulating antibodies. J Endocrinol Invest (1982) 5:293–301. doi:10.1007/BF03350517

7) Valente WA, Vitti P, Rotella CM, Vaughan MM, Aloj SM, Grollman EF, et al. Antibodies that promote thyroid growth. A distinct population of thyroid-stimulating autoantibodies. N Engl J Med (1983) 309:1028–34. doi:10.1056/NEJM198310273091705



Clonování TSHr – 1

- Hlavní průlom přišel s naklonováním TSHr v r. 1989 1-3) – využití lidského TSHr pro RIA i bioassays 4,5) – senzitivita 96% pro RIA
- Pomocí mutačních technik byly připraveny chimerické TSHr
- V 90 létech byly vyvinuty monoklonální protilátky proti C-terminus region rh-TSHr 6,7)

1)Parmentier M, Libert F, Maenhaut C, Lefort Gerard C, Perret J, Van Sande J, et al. Molecular cloning of the thyrotropin receptor. *Science* (1989) 246:1620–2. doi:10.1126/science.2556796

2)Nagayama Y, Kaufman KD, Seto P, Rapoport B. Molecular cloning, sequence and functional expression of the cDNA for the human thyrotropin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* (1989) 165:1184–90. doi:10.1016/0006-291X(89)92727-7

3) Akamizu T, Ikuyama S, Saji M, Kosugi S, Kozak C, McBride OW, et al. Cloning, chromosomal assignment, and regulation of the rat thyrotropin receptor: expression of the gene is regulated by thyrotropin, agents that increase cAMP levels, and thyroid autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1990) 87:5677–81. doi:10.1073/pnas.87.15.5677

4)Ludgate M, Perret J, Parmentier M, Gerard C, Libert F, Dumont JE, et al. Use of recombinant human thyrotropin receptor (TSH-R) expressed in mammalian cell lines to assay TSH-R autoantibodies. *Mol Cell Endocrinol* (1991) 73:R13–8. doi:10.1016/0303-7207(90)90050-I

5) Filetti S, Foti D, Costante G, Rapoport B. Recombinant human thyrotropin (TSH) receptor in a radioreceptor assay for the measurement of TSH receptor autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab* (1991) 72:1096–101. doi:10.1210/jcem-72-5-1096

6) Costagliola S, Morgenthaler NG, Hoermann R, Badenhop K, Struck J, Freitag D, et al. Second generation assay for thyrotropin receptor antibodies has superior diagnostic sensitivity for Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* (1999) 84:90–7. doi:10.1210/jc.84.1.90

7)Sanders J, Oda Y, Roberts S, Kiddie A, Richards T, Bolton J, et al. The inter- action of TSH receptor autoantibodies with 125 I-labelled TSH receptor. *J Clin Endocrinol Metab* (1999) 84:3797–802. doi:10.1210/jcem.84.10.6071



Clonování TSHr – 2

- Druhá generace imunotestů (ELISA) – solid-phase – se staly standardem pro dg a-TSHr, díky přesnosti (98,8% senzitivita a 99,6% specifita) a non-RIA 1,2,3)
- Použitím rh-TSHr nebo vepřový TSHr získáme stejnou analytickou přesnost3)

1)Costagliola S, Morgenthaler NG, Hoermann R, Badenhoop K, Struck J, Freitag D, et al. Second generation assay for thyrotropin receptor antibodies has superior diagnostic sensitivity for Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* (1999) 84:90–7. doi:10.1210/jc.84.1.90

2)Sanders J, Oda Y, Roberts S, Kiddie A, Richards T, Bolton J, et al. The inter- action of TSH receptor autoantibodies with 125 I-labelled TSH receptor. *J Clin Endocrinol Metab* (1999) 84:3797–802. doi:10.1210/jcem.84.10.6071

3)Kamijo K. TSH-receptor antibody measurement in patients with various thyrotoxicosis and Hashimoto's thyroiditis: a comparison of two two-step assays, coated plate ELISA using porcine TSH-receptor and coated tube radio- assay using human recombinant TSH-receptor. *Endocr J* (2003) 50:113–6. doi:10.1507/endocrj.50.113



Monoclonal a-TSHr stimulující

- Na přelomu milénia byly studovány stimulující protilátky a-TSHr 1,2,3)
- Tato data jsou zásadní pro pochopení vztahů struktury a funkcí TSHRr a její role v patogenezi Gravesovy choroby.
- To vše vedlo k izolaci a charakterizaci lidské monoklonální protilátky a-TSHr stimulující – M22. 4)

1) Ando T, Latif R, Pritsker A, Moran T, Nagayama Y, Davies TF. A monoclonal thyroid-stimulating antibody. *J Clin Invest* (2002) 110:1667–74. doi:10.1172/JCI0216991

2) Costagliola S, Franssen JDF, Bonomi M, Urizar E, Willnich M, Bergmann A, et al. Generation of a mouse monoclonal TSH receptor antibody with stimulating activity. *Biochem Biophys Res Commun* (2002) 299:891–6. doi:10.1016/S0006-291X(02)02762-6

3) Sanders J, Jeffreys J, Depraetere H, Richards T, Evans M, Kiddie A, et al. Thyroid-stimulating monoclonal antibodies. *Thyroid* (2002) 12:1043–50. doi:10.1089/105072502321085135

4) Sanders J, Evans M, Premawardhana LDKE, Depraetere H, Jeffreys J, Richards T, et al. Human monoclonal stimulating autoantibody. *Lancet* (2003) 362:126–8. doi:10.1016/S0140-6736(03)13866-4



Třetí generace testů – M22

- V r.2004 byl vyvinut test použitím M22 ve formátu ELISA 1), senzitivita 97,4% a specifita 99,2%. (např. Medipan)
- Test byl vhodný i pro automatizaci 2,3)
- Dostupnost a znalost jak stimulujících tak blokuujících protilátek byla důležitá k pochopení krystalické struktury TSHr a jejích interakcí s a-TSHr. 4), poukázalo to na široké překryvy epitopů mezi stimulujícími a blokuujícími protilátkami. 4)
- Roche: nativní vepřový TSH s M22

1) Rees Smith B, Bolton J, Young S, Collyer A, Weeden A, Bradbury J, et al. A new assay for thyrotropin receptor autoantibodies. *Thyroid* (2004) 14:830–5. doi:10.1089/1050725042451248

2) Tozzoli R, Bagnasco M, Giavarina D, Bizzarro N. TSH receptor autoantibody immunoassay in patients with Graves' disease: improvement of diagnostic accuracy over different generations of methods, systematic review and meta-analysis. *Autoimmun Rev* (2012) 12:107–13. doi:10.1016/j.autrev.2012.07.003

3) Zophel K, Roggenbuck D, von Landenberg P, Wunderlich G, Gruning T, Kotzerke J, et al. TSH receptor antibody (TRAb) assays based on the human monoclonal autoantibody M22 are more sensitive than bovine TSH based assays. *Horm Metab Res* (2010) 42:65–9. doi:10.1055/s-0029-1241196

4) Furmaniak J, Sanders J, Nunez Miguel R, Rees Smith B. Mechanisms of action of TSHR autoantibodies. *Horm Metab Res* (2015) 47:735–52. doi:10.1055/s-0035-1559648



Mc4 bioassay

- Souběžně s testy 3-generace Kohn vyvinul test využívající „Mc4 chiméru“, založenou na metodách chemiluminiscence 1)
- Cílem bylo měřit pouze stimulující protilátky a tím dosáhnout jasného cutoff mezi pacienty s GD a kontrolami.
- Porovnání senzitivity a specifiity v tabulce 2)
- Mc4 testy mohou být využity jako testy první volby pro pacienty s GD.

1)Tahara K, Ban T, Minegishi T, Kohn LD. Immunoglobulins from Graves' disease patients interact with different sites on TSH receptor/LH-CG receptor chimeras than either TSH or immunoglobulins from idiopathic myxedema patients. *Biochem Biophys Res Commun* (1991) 179:70–7. doi:10.1016/0006-291X(91)91335-A

2) Giuliani C, Cerrone D, Harii N, Thornton M, Kohn LD, Dagua NM, et al. A TSHr-LH/CGr chimera that measures functional TAb in Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* (2012) 97:E1106–15. doi:10.1210/jc.2011-2893



Mc4 bioassay

- Testy s M22 díky podobně specifitě a senzitivitě, ale lepší „proveditelnosti“ jsou zatím preferovanější.
- Dále jsou lepší pro prognózu GD než testy s M22 a lépe korelují s aktivitou a závažností GD orbitopatií. 2)

TRAbs assays	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Mc4 bioassay	100 ^a	98.5 ^a
CHO–wtTSHR bioassay	97.3 ^a	93.1 ^a
“Solid phase” immunoassay	86.5 ^a	97 ^a
M22 ELISA assay	97.4 ^b	99.2 ^b

1) Tahara K, Ban T, Minegishi T, Kohn LD. Immunoglobulins from Graves' disease patients interact with different sites on TSH receptor/LH-CG receptor chimeras than either TSH or immunoglobulins from idiopathic myxedema patients. *Biochem Biophys Res Commun* (1991) 179:70–7. doi:10.1016/0006-291X(91)91335-A

2) Giuliani C, Cerrone D, Harii N, Thornton M, Kohn LD, Dagia NM, et al. A TSHr-LH/CGr chimera that measures functional TSAb in Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* (2012) 97:E1106–15. doi:10.1210/jc.2011-2893



Bridge Assay

- Nová technologie využití chimérických receptorů: Mc4 a N-terminální TSHr fúsovaný s alkalickou fosfatázou. 1), senzitivita 99,8% a specifita 99,5%
- TSI – Siemens: tato metoda je založena na sendvičovém kompetitivní formátu, který se liší od klasického kompetitivní formátu komerčních IMA druhé a třetí generace 2)

1) Frank CU, Braeth S, Dietrich JW, Wanjura D, Loos U. Bridge technology with TSH receptor chimera for sensitive direct detection of TSH receptor antibodies causing Graves' disease: analytical and clinical evaluation. *Horm Metab Res* (2015) 47:880–8. doi:10.1055/s-0035-1554662

2) Tozzoli R, D'Aurizio F, Villalta D, Giovanella L (2017) Evaluation of the first fully automated immunoassay method for the measurement of stimulating TSH receptor autoantibodies in Graves' disease. *Clin Chem Lab Med* 55:58–64



Mezinárodní standard

- První mezinárodní standard připraven v r. 1995 WHO, označení 90/672. Připraven ECBS, zdroj patientská plasma
- V r. 2006 nahrazen lidskou monoklonální protilátkou M22 (NIBSC: 08/240) odkazuje na detekci S-TRAb 1)

1) Diana T1, Kanitz M, Lehmann M, Li Y, Olivo PD, Kahaly GJ. Standardization of a bioassay for thyrotropin receptor stimulating autoantibodies. *Thyroid*. 2015 Feb;25(2):169-75.



EHK – SEKK AT2/17

Celková úspěšnost: 100 %

Sada vzorků 2

(590) Anti-TSH receptor

A2	(1) Fluorescenční metody	>>>	1	Negativní	1,1 %
	(2) EIA metody	>>>	3	Negativní	3,2 %
	(4) RIA, IRMA, RRA	>>>	9	Negativní	9,5 %
	(5) LIA, ILMA	>>>	82	Negativní	86 %

———— Celkem za vzorek: n = 95 ——— Úspěšnost: 100 % —————

B2	(1) Fluorescenční metody	>>>	1	Pozitivní	1,1 %
	(2) EIA metody	>>>	3	Pozitivní	3,2 %
	(4) RIA, IRMA, RRA	>>>	9	Pozitivní	9,5 %
	(5) LIA, ILMA	>>>	82	Pozitivní	86 %

———— Celkem za vzorek: n = 95 ——— Úspěšnost: 100 % —————

Celková úspěšnost: 100 %



EHK – SEKK AT2/17

SEKK

Souhrnná statistika - kvalitativní výsledky

(Skupiny: výrobce reagentie)

Cyklus EHK: AT2/17 - Autoprotilátky u tyreopatií

Stop termin: 23.10.2017

Zkouška

Vzorek	Skupina	N	Výsledek	N _{rel}
Sada vzorků 2				
(590) Anti-TSH receptor				
A2	(24) B.R.A.H.M.S.	>>> 8	Negativní	8,4 %
	(29) Siemens (DPC)	>>> 11	Negativní	12 %
	(36) Immunotech	>>> 2	Negativní	2,1 %
	(60) Roche	>>> 69	Negativní	73 %
	(87) Euroimmun	>>> 1	Negativní	1,1 %
	(146) MEDIPAN Diagnostica	>>> 1	Negativní	1,1 %
	(149) Siemens (Dade)	>>> 1	Negativní	1,1 %
	(179) Siemens (Bayer)	>>> 2	Negativní	2,1 %
----- Celkem za vzorek: n = 95		----- Úspěšnost: 100 %	-----	
B2	(24) B.R.A.H.M.S.	>>> 8	Pozitivní	8,4 %
	(29) Siemens (DPC)	>>> 11	Pozitivní	12 %
	(36) Immunotech	>>> 2	Pozitivní	2,1 %
	(60) Roche	>>> 69	Pozitivní	73 %
	(87) Euroimmun	>>> 1	Pozitivní	1,1 %
	(146) MEDIPAN Diagnostica	>>> 1	Pozitivní	1,1 %
	(149) Siemens (Dade)	>>> 1	Pozitivní	1,1 %
	(179) Siemens (Bayer)	>>> 2	Pozitivní	2,1 %
----- Celkem za vzorek: n = 95		----- Úspěšnost: 100 %	-----	
Celková úspěšnost: 100 %				



SEKK - Dotazník

Doplňující dotazník

Účastníky tohoto cyklu jsme požádali, aby odpověděli na následující otázku:

Uveďte, zda vámi používaný test prokazuje výhradně stimulující protilátky.

Účastníci odpověděli takto:

<i>Odpověď</i>	<i>Počet</i>	<i>Relativně</i>
Neuvedeno	29	31 %
Ne	22	23 %
Ano	20	21 %
Tuto informaci nemáme k dispozici	24	25 %

Většina účastníků (56 %) buď neodpověděla, nebo nemají informaci o charakteru stanovovaných protilátek. U vzorků rozesílaných v tomto cyklu nebyl rozdíl mezi výsledky skupiny užívající stanovení výhradně stimulujících protilátek a výsledky ostatních účastníků.



EHK – SEKK AT1/13

Celková úspěšnost: 98,4 %

(590) Anti-TSH receptor

A	(2) EIA metody		1	Negativní
		>>>	8	Pozitivní
	(4) RIA, IRMA, RRA	>>>	18	Pozitivní
	(5) LIA, ILMA		1	Negativní
		>>>	53	Pozitivní
———— Celkem za vzorek: n = 81		———— Úspěšnost:	97,5 %	————

B	(2) EIA metody	>>>	8	Negativní
			1	Pozitivní
	(4) RIA, IRMA, RRA	>>>	17	Negativní
			1	Neuvedeno
	(5) LIA, ILMA	>>>	53	Negativní
			1	Pozitivní
———— Celkem za vzorek: n = 81		———— Úspěšnost:	96,3 %	————

Celková úspěšnost: 96,3 %



EHK – SEKK AT1/13

Celková úspěšnost: 98,4 %

(590) Anti-TSH receptor

A	(2) EIA metody; (49) BioVendor	>>>	1	Pozitivní
	(2) EIA metody; (60) Roche	>>>	1	Pozitivní
	(2) EIA metody; (66) DRG	>>>	3	Pozitivní
	(2) EIA metody; (87) Euroimmun		1	Negativní
		>>>	1	Pozitivní
	(2) EIA metody; (146) MEDIPAN Diagnostica	>>>	2	Pozitivní
	(4) RIA, IRMA, RRA; (24) B.R.A.H.M.S.	>>>	15	Pozitivní
	(4) RIA, IRMA, RRA; (36) Immunotech	>>>	2	Pozitivní
	(4) RIA, IRMA, RRA; (60) Roche	>>>	1	Pozitivní
	(5) LIA, ILMA; (0) výrobce neuveden	>>>	1	Pozitivní
	(5) LIA, ILMA; (24) B.R.A.H.M.S.	>>>	1	Pozitivní
	(5) LIA, ILMA; (60) Roche		1	Negativní
		>>>	51	Pozitivní
----- Celkem za vzorek: n = 81 -----		Úspěšnost:	97,5 %	-----
B	(2) EIA metody; (49) BioVendor	>>>	1	Negativní
	(2) EIA metody; (60) Roche	>>>	1	Negativní
	(2) EIA metody; (66) DRG	>>>	3	Negativní
	(2) EIA metody; (87) Euroimmun		1	Negativní
			1	Pozitivní
	(2) EIA metody; (146) MEDIPAN Diagnostica	>>>	2	Negativní
	(4) RIA, IRMA, RRA; (24) B.R.A.H.M.S.	>>>	14	Negativní
			1	Neuvedeno
	(4) RIA, IRMA, RRA; (36) Immunotech	>>>	2	Negativní
	(4) RIA, IRMA, RRA; (60) Roche	>>>	1	Negativní
	(5) LIA, ILMA; (0) výrobce neuveden	>>>	1	Negativní
	(5) LIA, ILMA; (24) B.R.A.H.M.S.	>>>	1	Negativní
	(5) LIA, ILMA; (60) Roche	>>>	51	Negativní
			1	Pozitivní



Hashimotova tyreoiditida (HT)

- HT 1) a SLE 2) byly první dvě autoimunitní onemocnění, kde se prokázala genetická asociace (geny MHC třídy II.) 70 léta
- Nicméně nebyl nalezen gen, který by spouštěl HT, nalezeny pouze geny, které přispívají k fenotypu onemocnění 3)

1) Vladutiu AO, Rose NR. Autoimmunemurine thyroiditis relation to histocompatibility (H-2) type. Science 1971;174:1137–9.

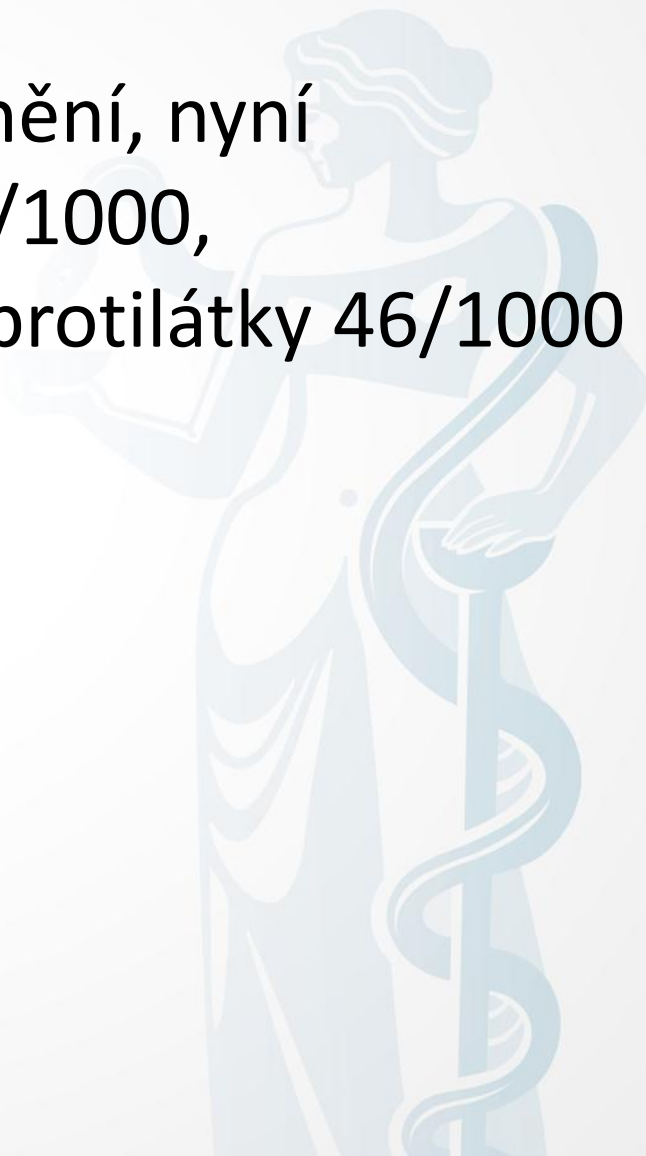
2) Grumet FC, Coukell A, Bodmer JG, Bodmer WF, McDevitt HO. Histocompatibility (HL-A) antigens associated with systemic lupus erythematosus. A possible genetic predisposition to disease. N Engl J Med 1971;285:193–6

3) Simmonds MJ, Gough SC. The search for the genetic contribution to autoimmune thyroid disease: the never ending story? Brief Funct Genomics 2011;10:77–90



Hashimotova tyreoiditida

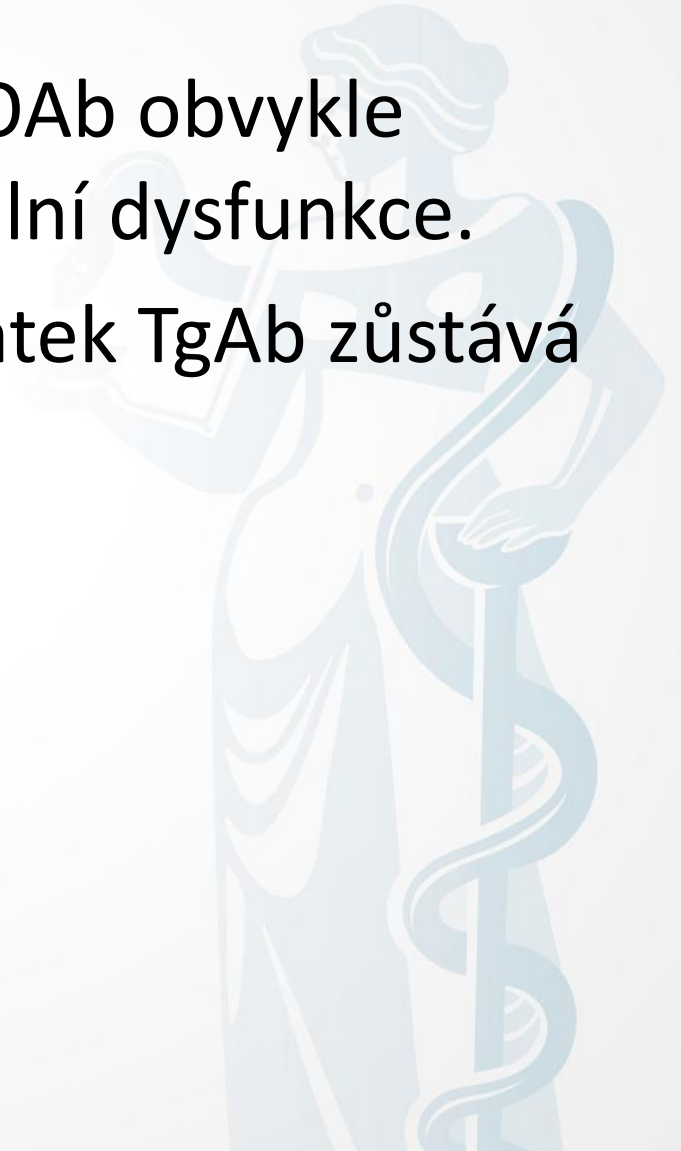
- Do 50. let raritní onemocnění, nyní nejběžnější s prevalencí 8/1000, biochemický nález + autoprotiátky 46/1000
- Ženy:muži, 8:1





a-TPO

- Přítomnost protilátek TPOAb obvykle předchází vzniku tyreoidální dysfunkce.
- Patogenetická role protilátek TgAb zůstává nejasná.





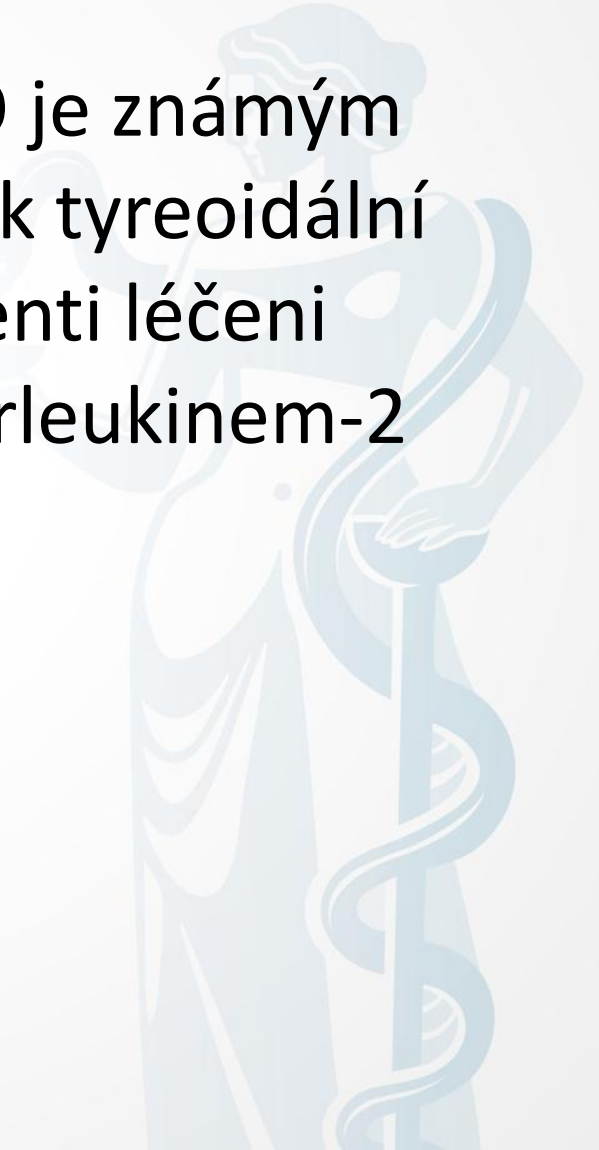
a-TPO

- Autoprotilátky TPOAb byly nejdříve popsány jako antimikrozomální autoprottilátky (AMA), neboť bylo zjištěno, že reagují s neupravenými membránami tyreoidálních buněk.
- Mikrozomální antigen byl později popsán jako TPO.
- Dříve se využívaly ke stanovení TPO metody imunofluorescenční metody a aglutinační testy s pasivním barvením erytrocytů.



a-TPO jako rizikový faktor

- Přítomnost protilátek a-TPO je známým rizikovým faktorem pro vznik tyreoidální dysfunkce, pokud jsou pacienti léčeni lithiem, amiodaronem, interleukinem-2 nebo alfa-interferonem





a-TG

- Tg vykazuje vysokou heterogenitu způsobenou rozdíly v posttranslačních modifikacích (glykosylace, jodizace, sulfatace atd.). Během syntézy tyreoidálního hormonu a jeho uvolnění je Tg polymerizován a degradován.
- Vlivem toho je imunologická struktura Tg mimořádně komplexní. Charakteristika standardů pro Tg se může lišit v závislosti na vstupní lidské tyreoidální tkáni a použitém purifikačním procesu. To vysvětluje, proč jsou testy na TgAb a také Tg tak obtížně standardizovatelné.



Titř protilátek

- Titř protilátek literárně koreluje s počtem autoreaktivních lymfocytů, které infiltrují štítnou žlázu a sonografickým obrazem 1)
- a-TG nižší senzitivita (60-80% u HT) a menší specifita (pozitivní ve větší části zdravých kontrol) než a-TPO.
- a-TG a a-TPO představují dva různé aspekty autoimunní odpovědi na štítnou žlázu. a-TG by mohly odrážet počáteční (vrozený) typ imunitní odpovědi, zatímco a-TPO by mohly charakterizovat pozdější adaptivní imunitní odpovědi 2)

1) Pandit AA, VijayWardem, Menon PS. Correlation of number of intrathyroid lymphocytes with antimicrobial antibody titer in Hashimoto's thyroiditis. Diagn Cytopathol 2003;28:63-5

2) Rose NR. Autoimmune escalation: through the crystal ball. Clin Exp Immunol 2007;147:9.



Titř protilátek

- Vyšetřovat tyreoidální autoprotilátky pro monitorování léčby AITD se obecně nedoporučuje. Tento fakt není překvapující, neboť léčba AITD se zaměřuje na následek (tyreoidální dysfunkci) a ne na příčinu onemocnění (autoimunitu).
- Nicméně změny v koncentraci autoprotilátek, dle některých autorů mohou reflektovat změnu aktivity onemocnění.



Titř protilátek

- Podobně jako u protilátek TPOAb je klinický význam nízkých koncentrací protilátek TgAb, které by ve starších aglutinačních metodách zůstaly nedetekovatelné, nejasný.
- Zdá se, že by nízké koncentrace mohly reprezentovat „přirozené“ protilátky u normálních jedinců nebo „scavenger“ protilátkovou odpověď na uvolnění antigenu po operaci štítné žlázy nebo léčbě radioaktivním jódem.
- Nízké hladiny mohou také reprezentovat skrytě probíhající AITD.
- Různé metody stanovení protilátek TgAb udávají odlišné hraniční hodnoty referenčního rozmezí



Mezinárodní standardy a-TPO, a-TG

- Standardizace testů na stanovení tyreoidálních protilátek není v současné době optimální.
- Mezinárodní referenční standardy (International Reference Preparations) MRC 65/93 pro protilátky TgAb a MRC 66/387 pro TPOAb.
- Většina současných metod na stanovení protilátek TPOAb je kvantifikována v mezinárodních jednotkách za použití referenčního standardu MRC 66/387. Použitím těchto primárních standardů se však nezmenšují rozdíly mezi metodami, které jsou patrné z velké variability hodnot citlivosti uváděných různými výrobci.
- Komerční soupravy obsahují sekundární standardy, které se pro každou metodu liší.



Děkuji za pozornost

