

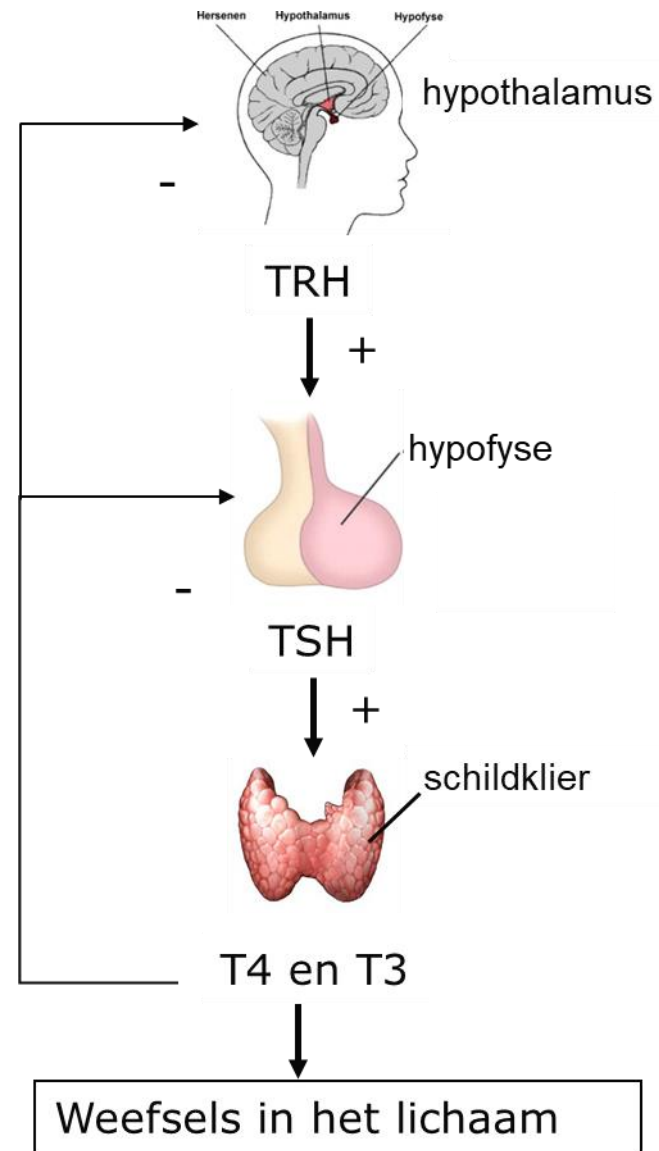
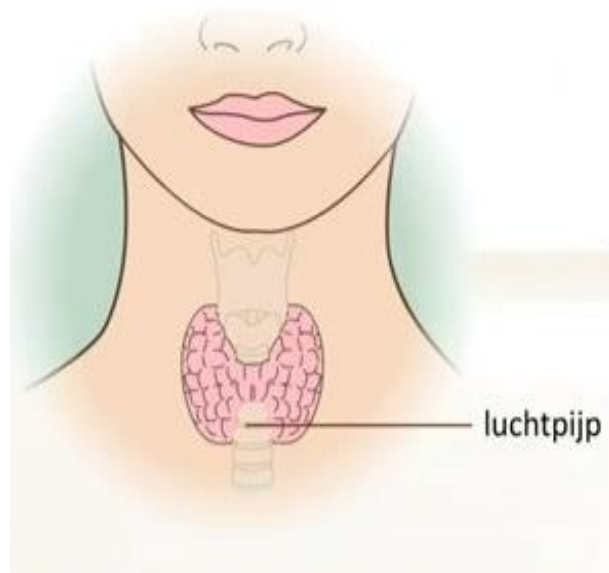
Schildklier en autoimmunititeit  
Nieuwe ontwikkelingen in assays

NVKC-SKML endo middag

Judith Emmen, klinisch chemicus

8-12-2021

# Schildklier



# Schildklier autoimmunititeit



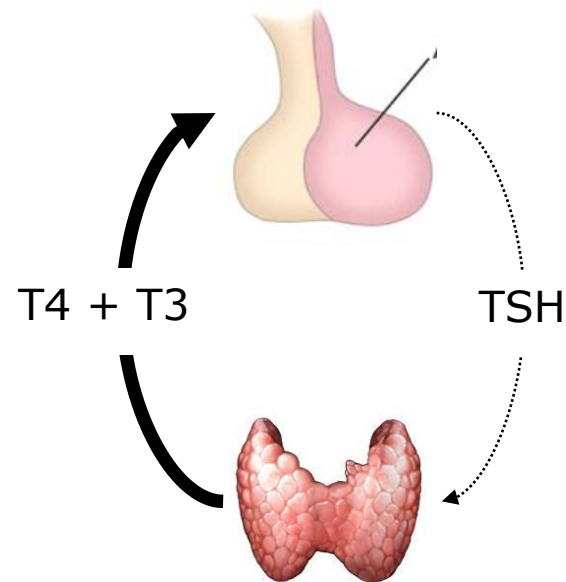
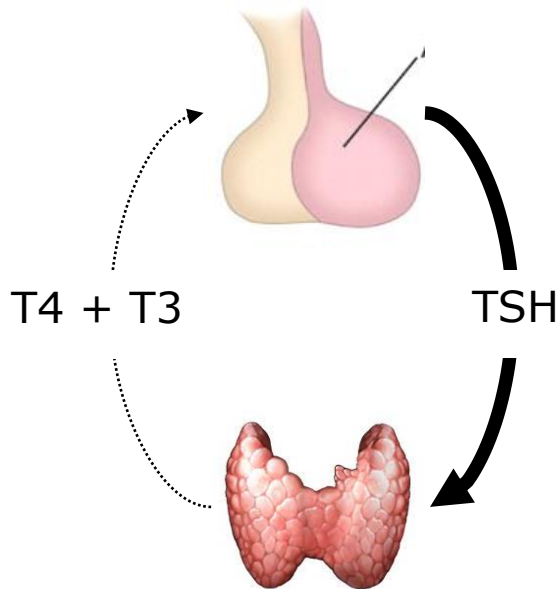
immuunrepons gericht tegen lichaamseigen cellen/weefsel  
weefselschade en/of gestoorde orgaanfunctie → autoimmuun ziekte  
twee meest voorkomende schildklier autoimmuun ziekten:

## Hashimoto thyreoïditis

hypothyreoïdie = te langzaam werkend schildklier

## Ziekte van Graves

hyperthyreoïdie = te snel werkend schildklier

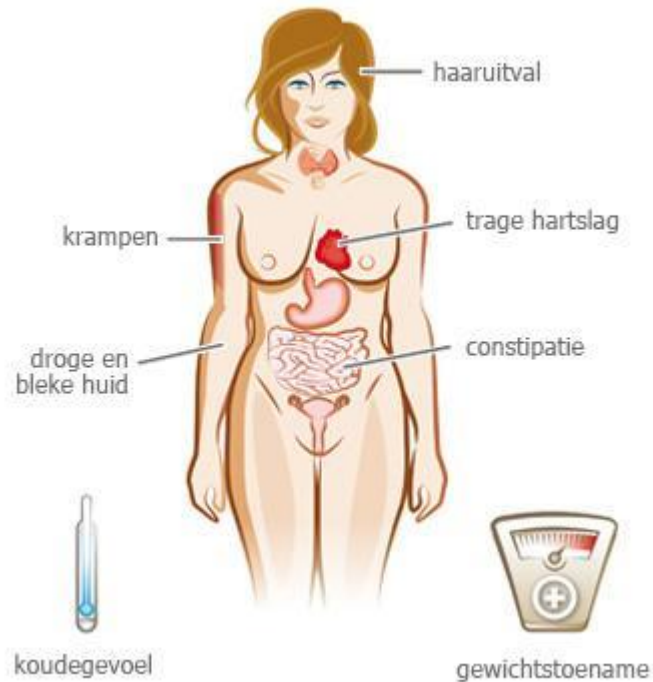


# Schildklier autoimmuuniteit



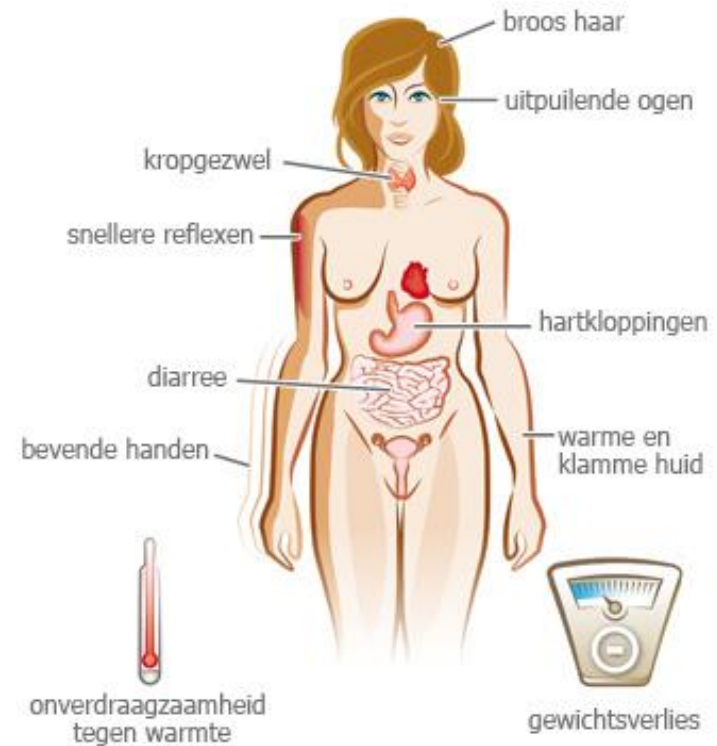
## Hashimoto thyreoïditis

hypothyreoïdie = te langzaam werkend schildklier



## Ziekte van Graves

hyperthyreoïdie = te snel werkend schildklier



# Schildklier autoimmunititeit

---



autoimmuun respons leidt tot twee tegenovergestelde pathologische processen

## Hashimoto thyreoïditis

- infiltratie van immuuncellen
- destructie van schildklierweefsel
  - voorbijgaande hyperthyreoïdie
  - progressie naar hypothyreoïdie
- productie auto-antistoffen
  - “bijverschijnsel”

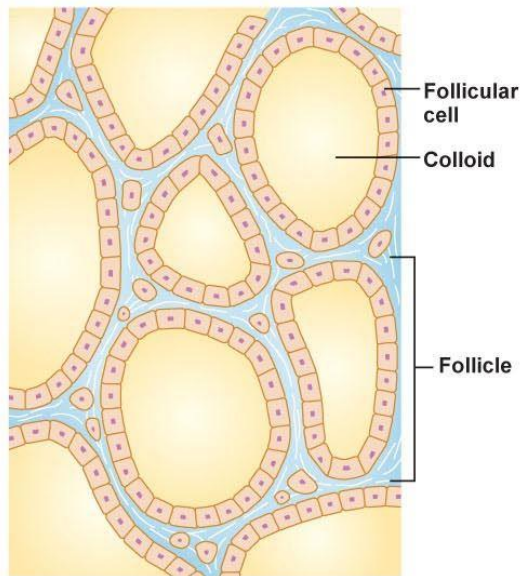
## ziekte van Graves

- infiltratie van immuuncellen
- geen destructie van schildklierweefsel
- productie auto-antistoffen
  - binding aan TSH receptoren
  - stimulerende werking, ongereguleerd
  - pathologisch

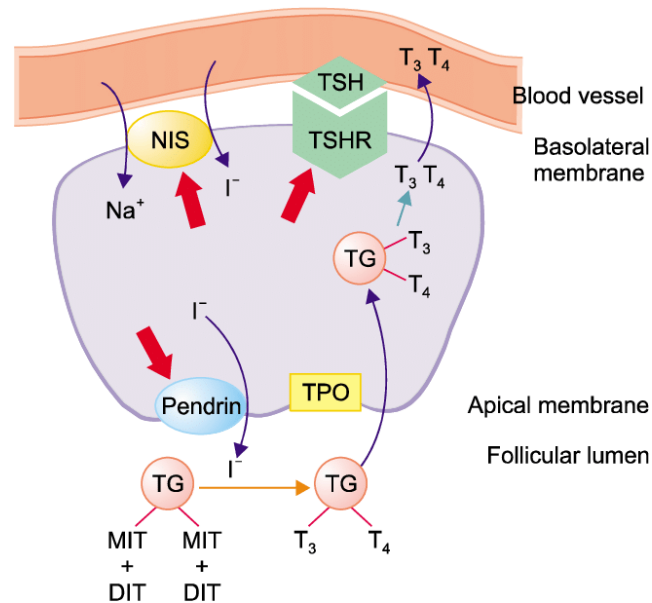
# Schildklier autoimmunititeit



	TPO antistoffen	Tg-antistoffen	TSH-R antistoffen
antigeen	thyroid peroxidase	thyreoglobuline	TSH receptor
locatie	intracellulair	intrafolliculair	extracellulair



(a) Thyroid follicles



# Schildklier autoimmunititeit



	TPO antistoffen	Tg-antistoffen	TSH-R antistoffen
antigeen	thyroid peroxidase	thyreoglobuline	TSH receptor
locatie	intracellulair	intrafolliculair	extracellulair
toegang tot antigeen	na weefseldestructie	met en zonder weefsel destructie	zonder weefsel destructie
werking	weinig	geen duidelijk werking	stimulerend, blokkerend, neutraal

# Schildklier autoimmunititeit



	TPO antistoffen	Tg-antistoffen	TSH-R antistoffen
antigeen	thyroid peroxidase	thyreoglobuline	TSH receptor
locatie	intracellulair	intrafolliculair	extracellulair
toegang tot antigeen	na weefseldestructie	met en zonder weefsel destructie	zonder weefsel destructie
werking	weinig	geen duidelijk werking	stimulerend, blokkerend, neutraal
gezonden	8-10%	7-20%	0,3%
Hashimoto thyreoïditis	90-95% hoge titer	4% hoge titer 50-70% lage titer	6-12%
Ziekte van Graves	50% hoge titer 18% lage titer	8% hoge titer 46% lage titer	95%

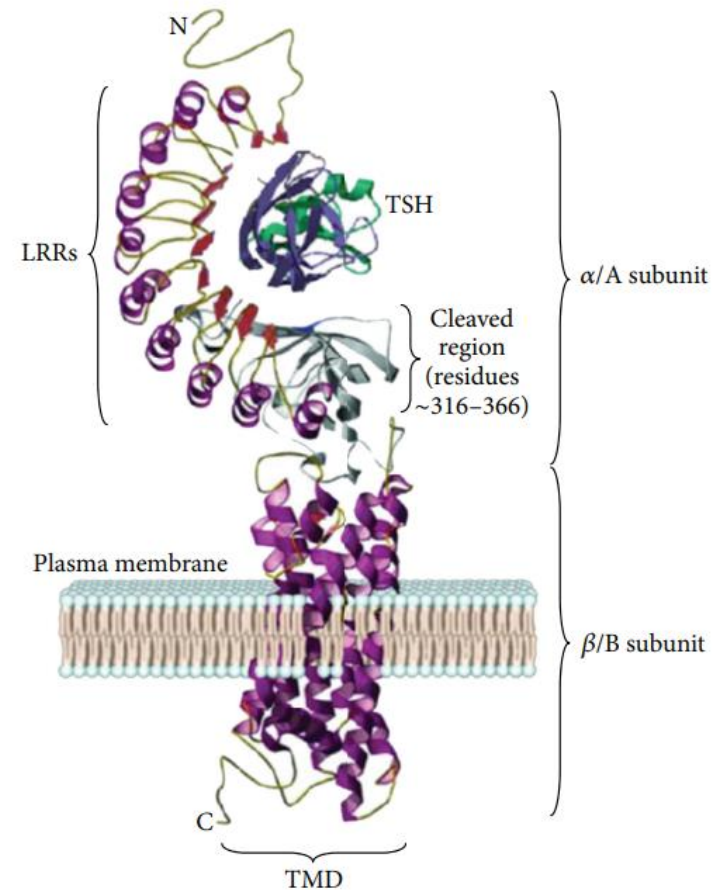


# TSH-R antistoffen



## TSH receptor

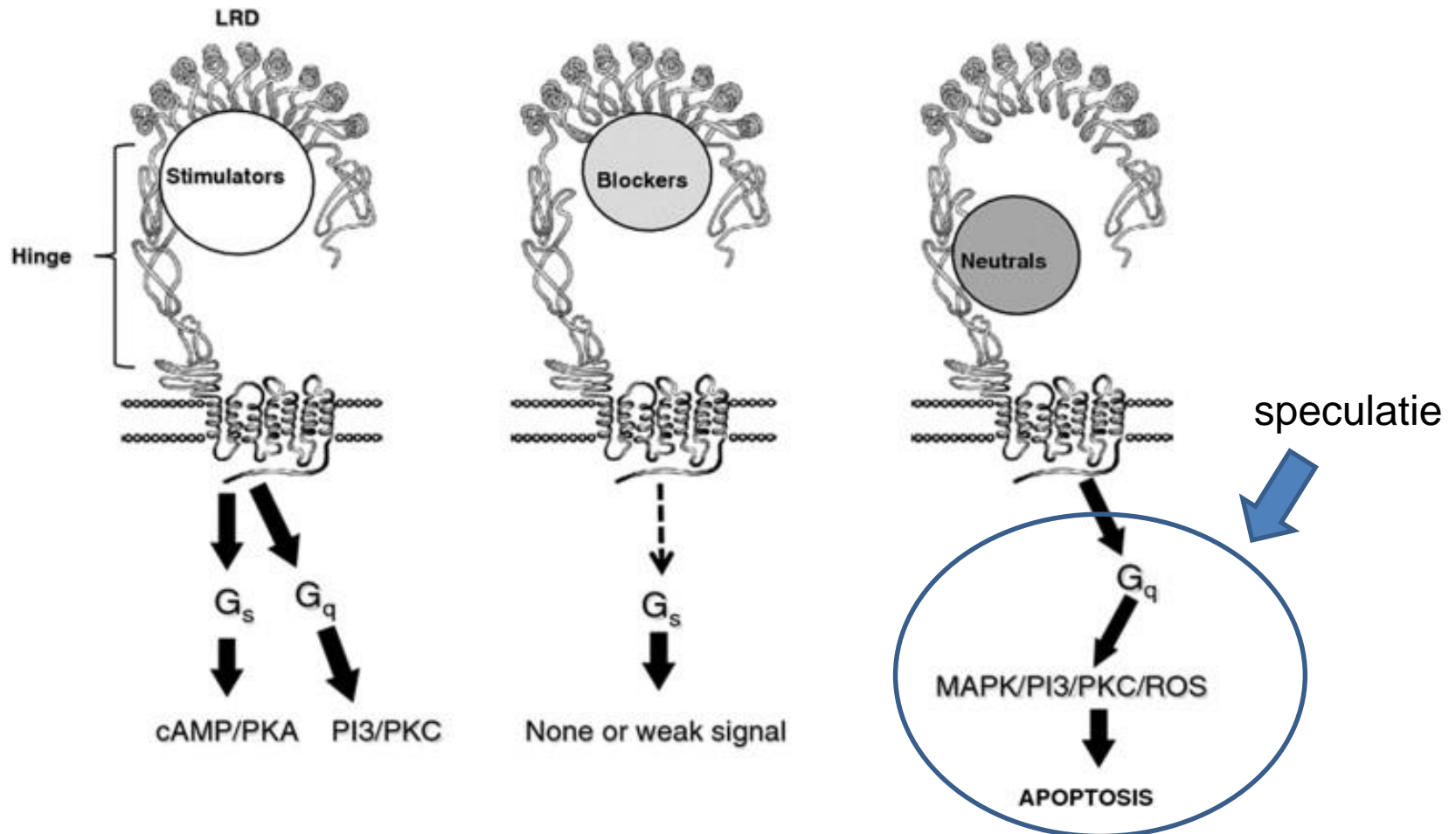
- epitheliale schildklierellen
  - hypofyse, hypothalamus, nier, vetweefsel
- groot extracellulair domein
  - alpha-subunit
  - 9 leucine-rijke repeat (LRR) domeinen
- transmembraan/intracellulair domein
  - beta-subunit
- binding van TSH
  - toename cAMP → activatie eiwitten
  - productie schildklierhormoon



# TSH-R antistoffen



## 3 typen TSH receptor (TSH-R) antistoffen



# TSH-R antistoffen

---



## nomenclatuur

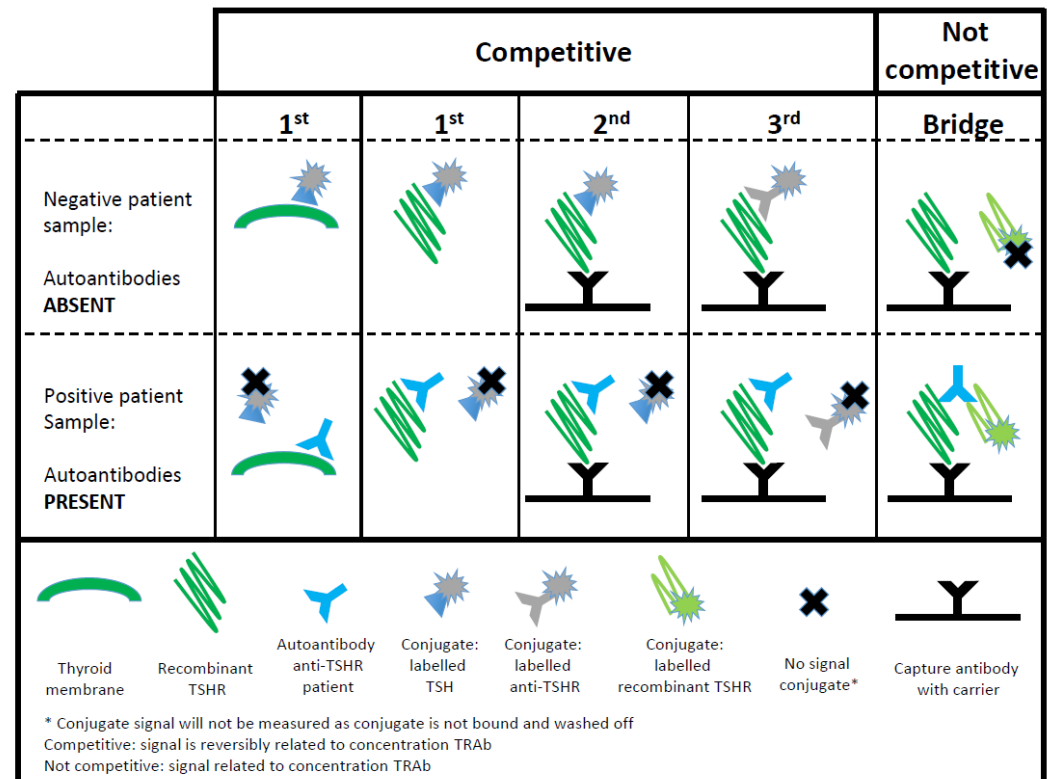
- TRAb: TSH-R antibodies
  - algemene naam voor TSH receptor (TSH-R) antistoffen (stimulerend, blokkerend of neutraal)
- TBII: TSH-R-binding inhibitory immunoglobulins
  - TSH-R antistoffen gemeten in een competitie bindingsassay
- TSI: thyroid-stimulating immunoglobulin
  - stimulerende TSH-R antistoffen
- TSAb: thyroid-stimulating antibodies
  - stimulerende TSH-R antistoffen gemeten in een bioassay
- TBI: thyroid-blocking immunoglobulin
  - blokkerende TSH-R antistoffen
- TBAb: thyroid-blocking antibodies
  - blokkerende TSH-R antistoffen gemeten in een bioassay

# TSH-R antistoffen assays



## TRAb assay

- detectie van TSH-R antistoffen (stimulerend en blokkerend)
- competitieve bindingsassay
  - TSH en TRAb binden aan dezelfde TSH receptor gebied
  - TRAb in patiëntmonster blokkeren binding van TSH aan TSH receptor preparaten (TBII)
- manuele en volledig geautomatiseerd assays



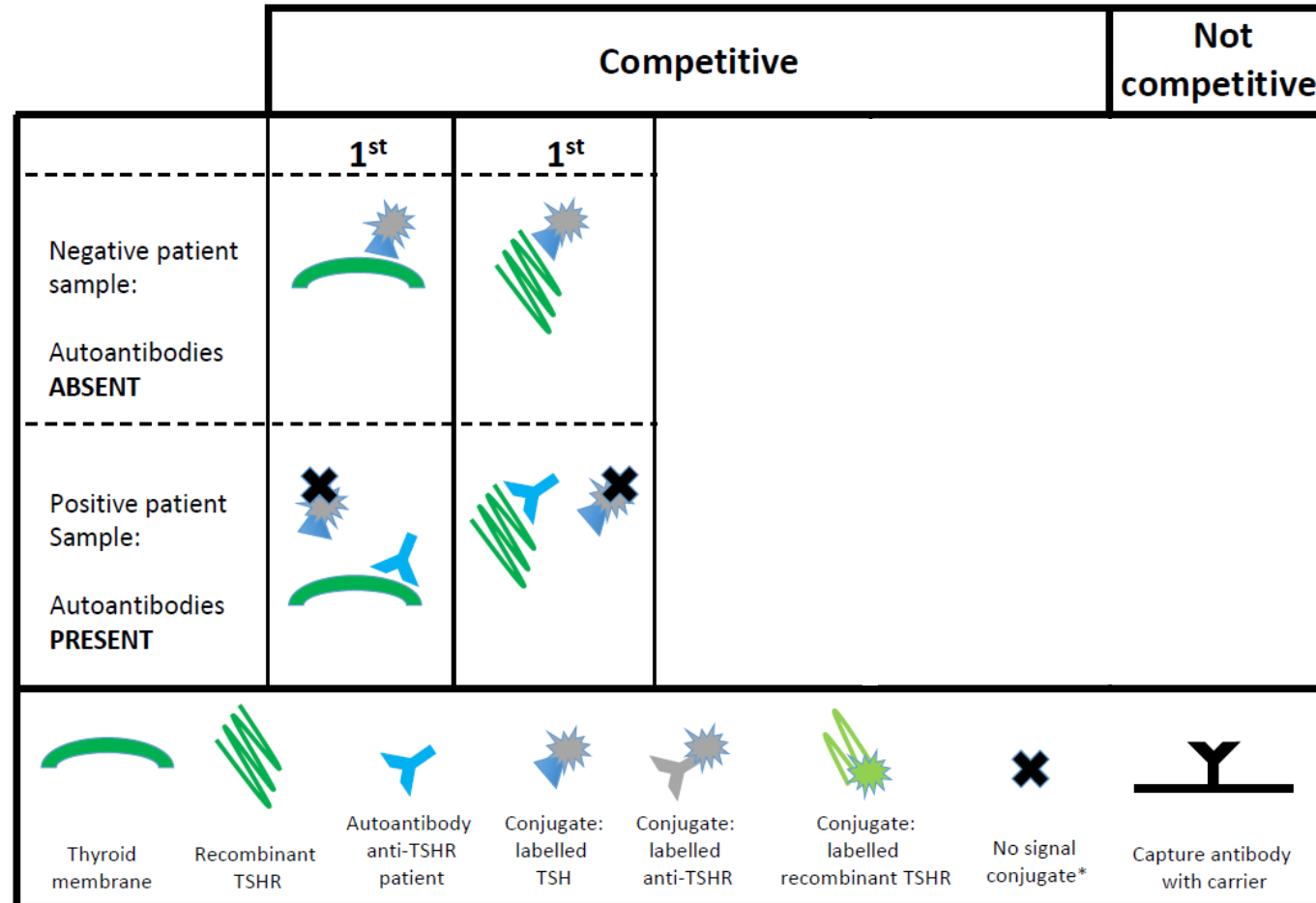
# TRAb assays



## Liquid phase assays (1<sup>st</sup>e generatie, jaren 80)

- membraan (varken) of recombinant TSH-R preparaat
- competitie TRAb in patiëntmonster met bovine TSH tracer
- in oplossing, geen wasstap mogelijk, PEG precipitatie

Smit *et al* and Kos, Neth J of Med. 2020



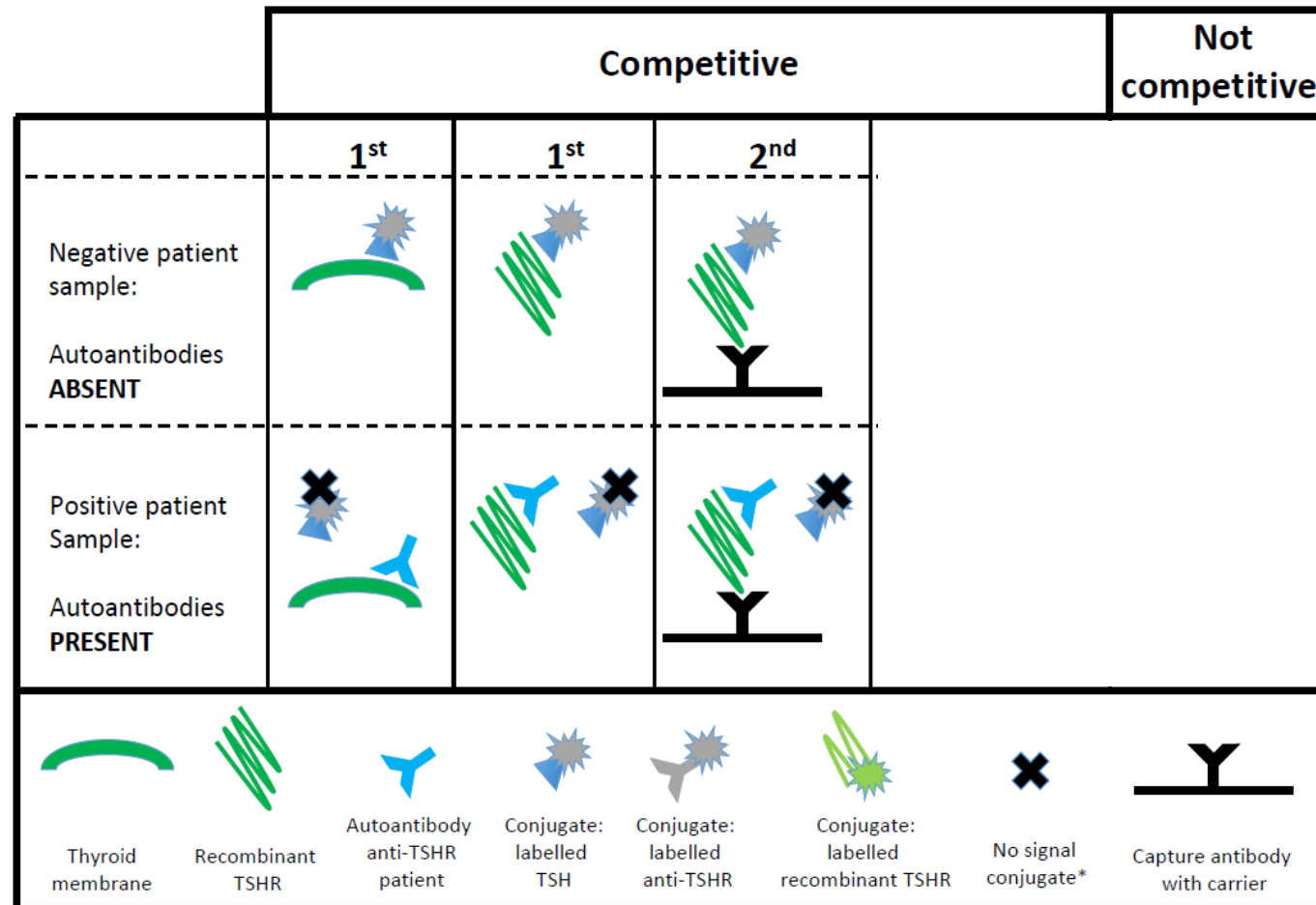
# TRAb assays



## Solid phase assays (2<sup>de</sup> generatie, eind jaren 90)

- monoclonale antistoffen tegen de TSH receptor
- immobilisatie → solid phase assay (ELISA) en automatisering
- competitie TRAb in patiëntmonster met bovine TSH tracer
- betere sensitiviteit

Smit *et al* and Kos, Neth J of Med. 2020



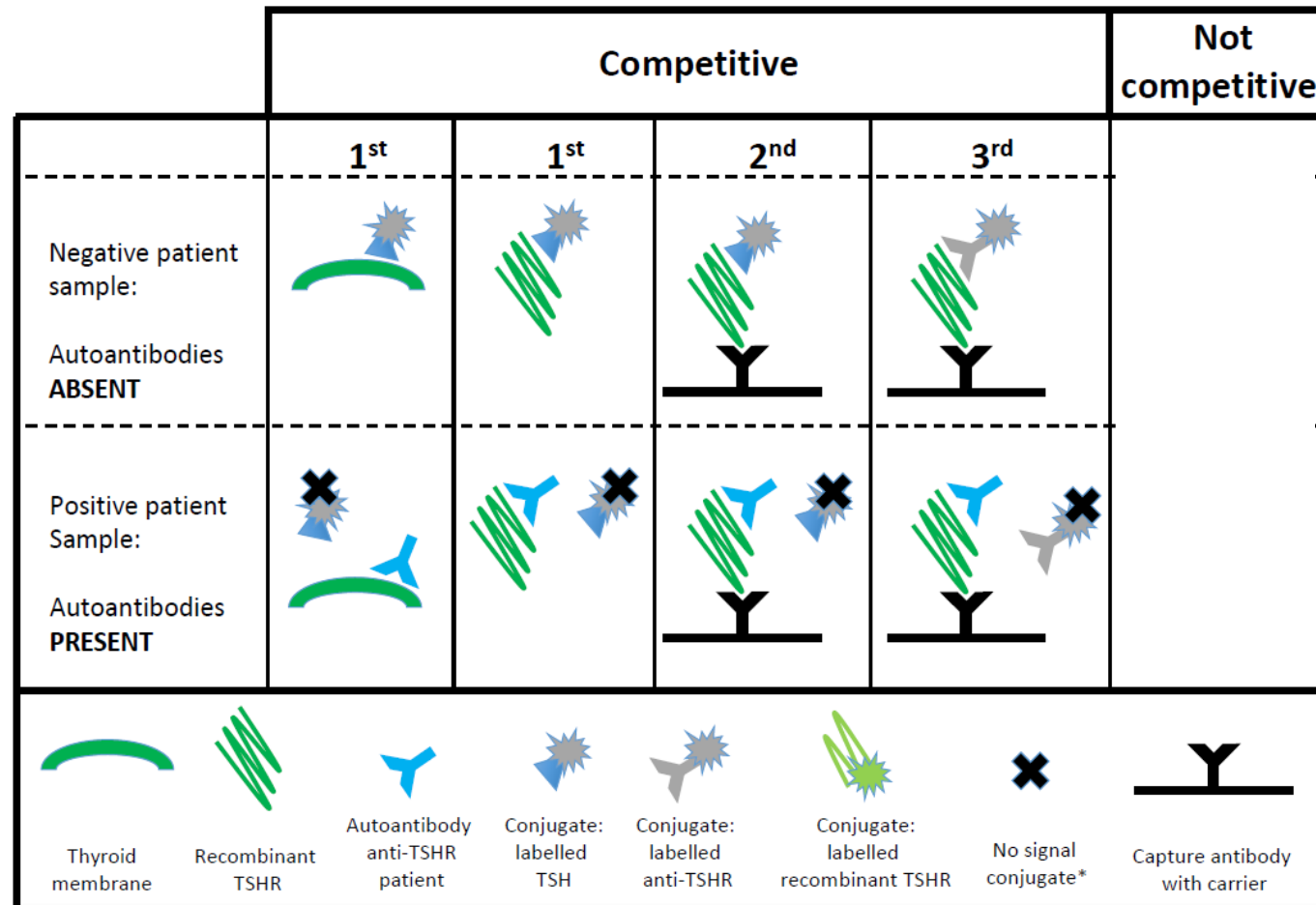
# TRAb assays



## Solid phase assays (3<sup>de</sup> generatie, vanaf 2003)

- monoonaal antistoffen vervangt bovine TSH als tracer
  - Thyroid stimulating monoclonal antibody of human origin (TSMab) M22
- competitie TRAb in patiëntmonster met deze monoclonale antistoffen
- sensitiviteit (niet altijd) beter

Smit *et al* and Kos, Neth J of Med. 2020



# TSH-R assays

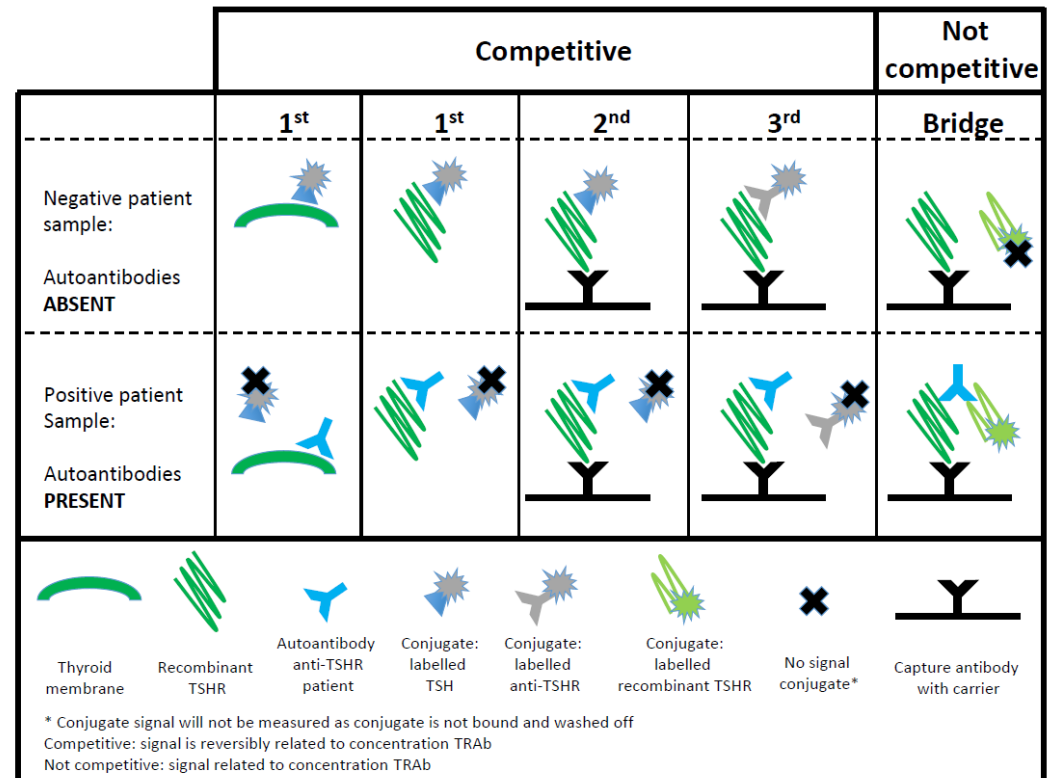


## TRAb assay

- detectie van TSH-R antistoffen (stimulerend en blokkerend)
- competitieve bindingsassay
  - TSH en TRAb binden aan dezelfde TSH receptor gebied
  - TRAb in patiëntmonster blokkeren binding van TSH aan TSH receptor preparaten (TBII)
- manuele en volledig geautomatiseerd assays

## TSI assay

- detectie van stimulerende TSH-R antistoffen
- cell-based assays/bioassays
- 1 bindingsassay (vanaf 2016)
  - niet-competitief





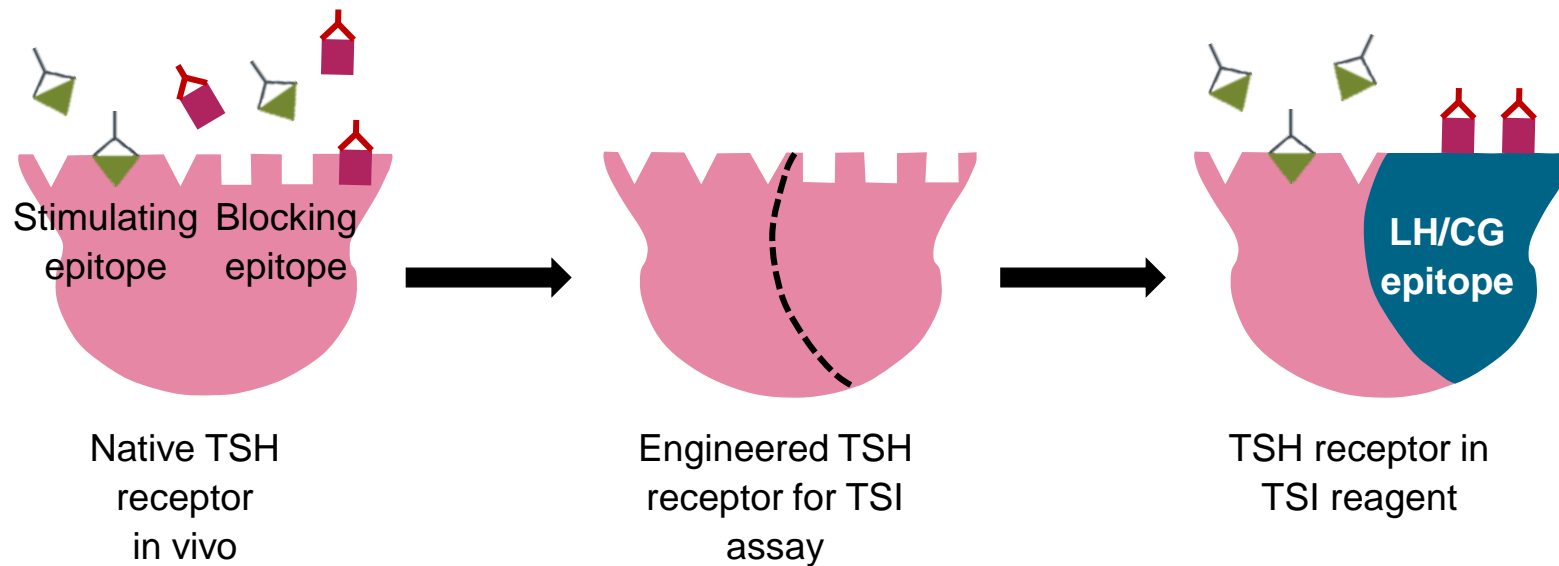
# TSI assay



## Niet-competitieve bindingsassay, “bridging” assay

detectie stimulerende TSH-R antistoffen (TSI)

- Immulite TSI assay (Siemens)
- 2 verschillende TSH-R constructen
  - capture en signaal
- capture construct



# TSI assay

---



## **Niet-competitieve bindingsassay, “bridging” assay**

detectie stimulerende TSH-R antistoffen (TSI)

- Immulite TSI assay (Siemens)
- 2 verschillende TSH-R constructen
  - capture en signaal
- capture construct

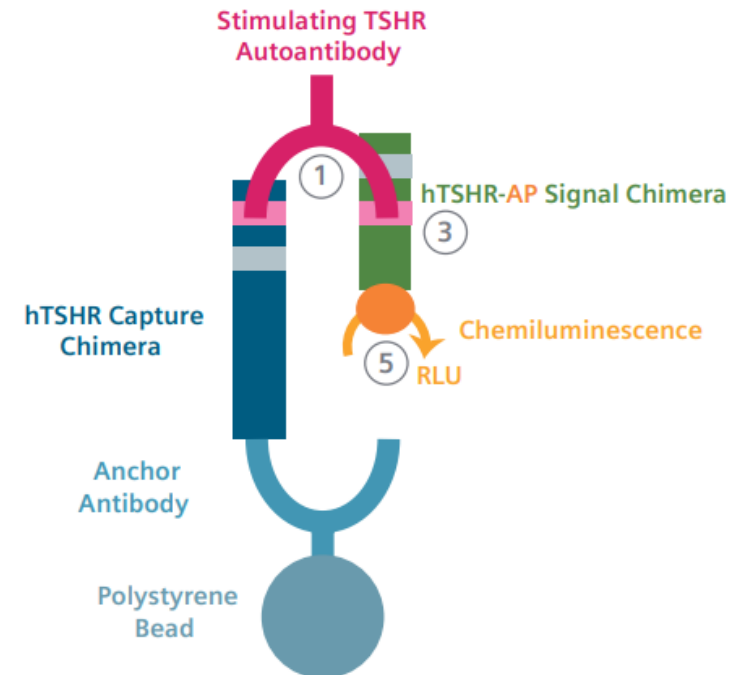
# TSI assay



## Niet-competitieve bindingsassay, “bridging” assay detectie stimulerende TSH-R antistoffen (TSI)

- Immulite TSI assay (Siemens)
- 2 verschillende TSH-R constructen
  - capture en signaal
- capture construct
  - hTSHR capture chimera
  - bevat epitoom stimulerende antistoffen
  - epitoom blockerende antistoffen is vervangen door LH/CG epitoom
- signaal construct
  - hTSHR-AP signaal chimera
  - bevat epitoom stimulerende antistoffen
  - fusie met alkalisch fosfatase
- TSI in patiëntmonster vormen een brug

### Principle of the assay



# TSI assay

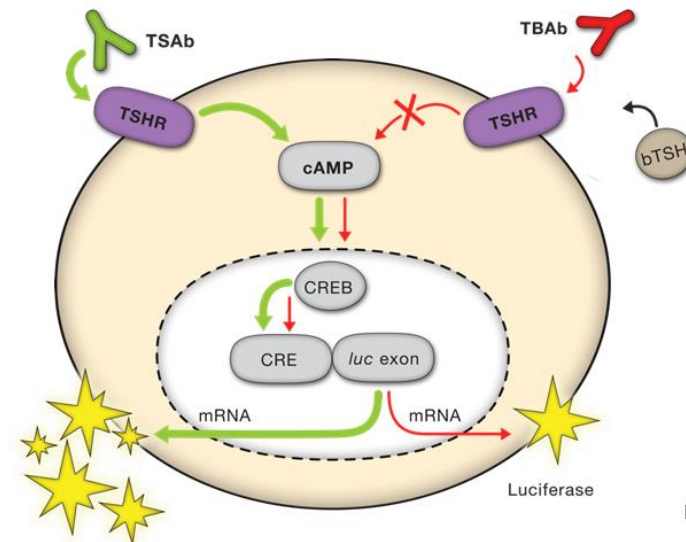


## Cell-based/bioassay

meting functionaliteit





onderscheid tussen stimulerende en blokkerende immunoglobulins (TSI)

- cellen met TSH-receptoren
- binding antistoffen aan receptoren
  - inductie cAMP door stimulerende antistoffen
  - remming cAMP door blokkerende antistoffen
- cAMP-responsieve reporter gen
  - bijvoorbeeld luciferase
- minder eenvoudig te standaardiseren
- manuele assay
- 1 CE-gemarkeerde assay beschikbaar
  - Thyretain™ TSI bioassay



Kahaly & al.,

*JCEM* 2010, *Autoimmunity Rev* 2010,  
*Thyroid* 2011, *Ophthalmology* 2012,  
*Am J Clin Pathol* 2013, *Clin Exp Immunol*  
2013, *JCEM* 2014, *Thyroid* 2015, *JCEM* 2016;  
*Clin Exp Immunol* 2017, *N Engl J Med* 2017

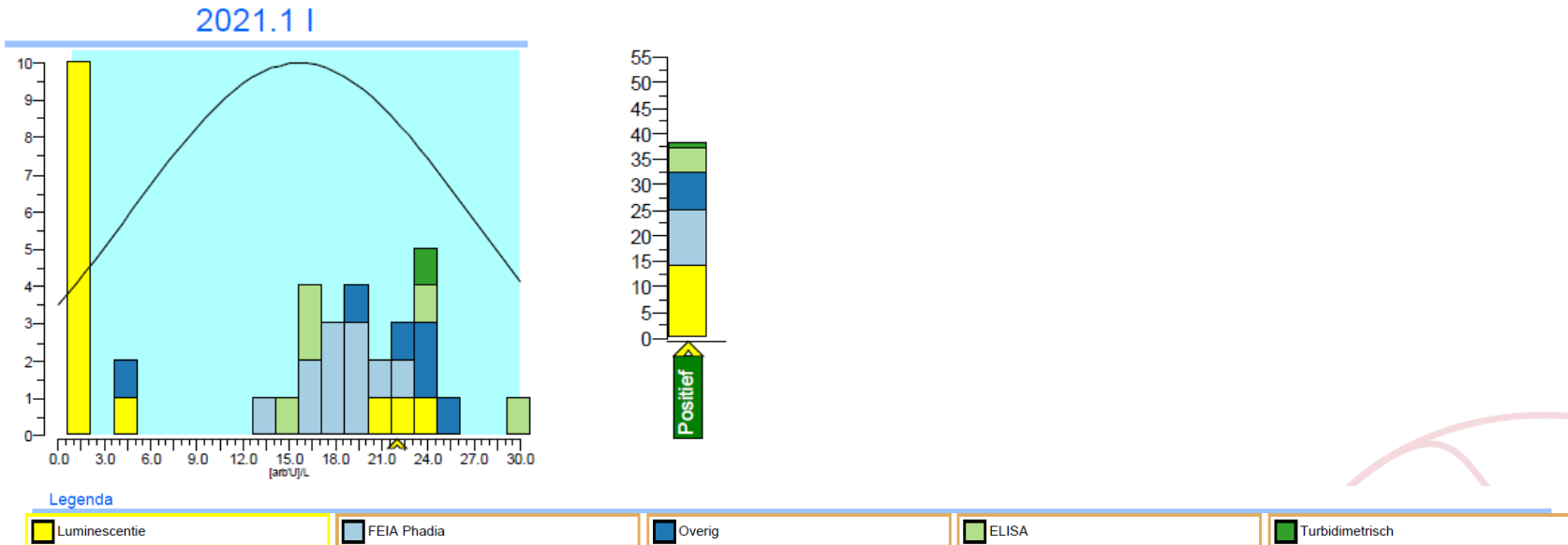
 TSHR Stimulating Autoantibody (TSAb)	 Luciferase
 TSHR Blocking Autoantibody (TBAb)	 Blocked

# Standaardisatie



## Standaardisatie 3<sup>de</sup> generatie assays

- WHO 1st international Standard (IS) 90/672
  - materiaal van zwangere patient met hoge TSH-R stimulerende antistoffen concentratie (plasmaferese)
- WHO 2nd international Standard (IS) 08/204
  - Monoklonale auto-antistoffen met schildklier-stimulerende activiteit



## Methodeverschillen

- methode afhankelijke referentiewaarden/afkapping

# Klinische toepassingen

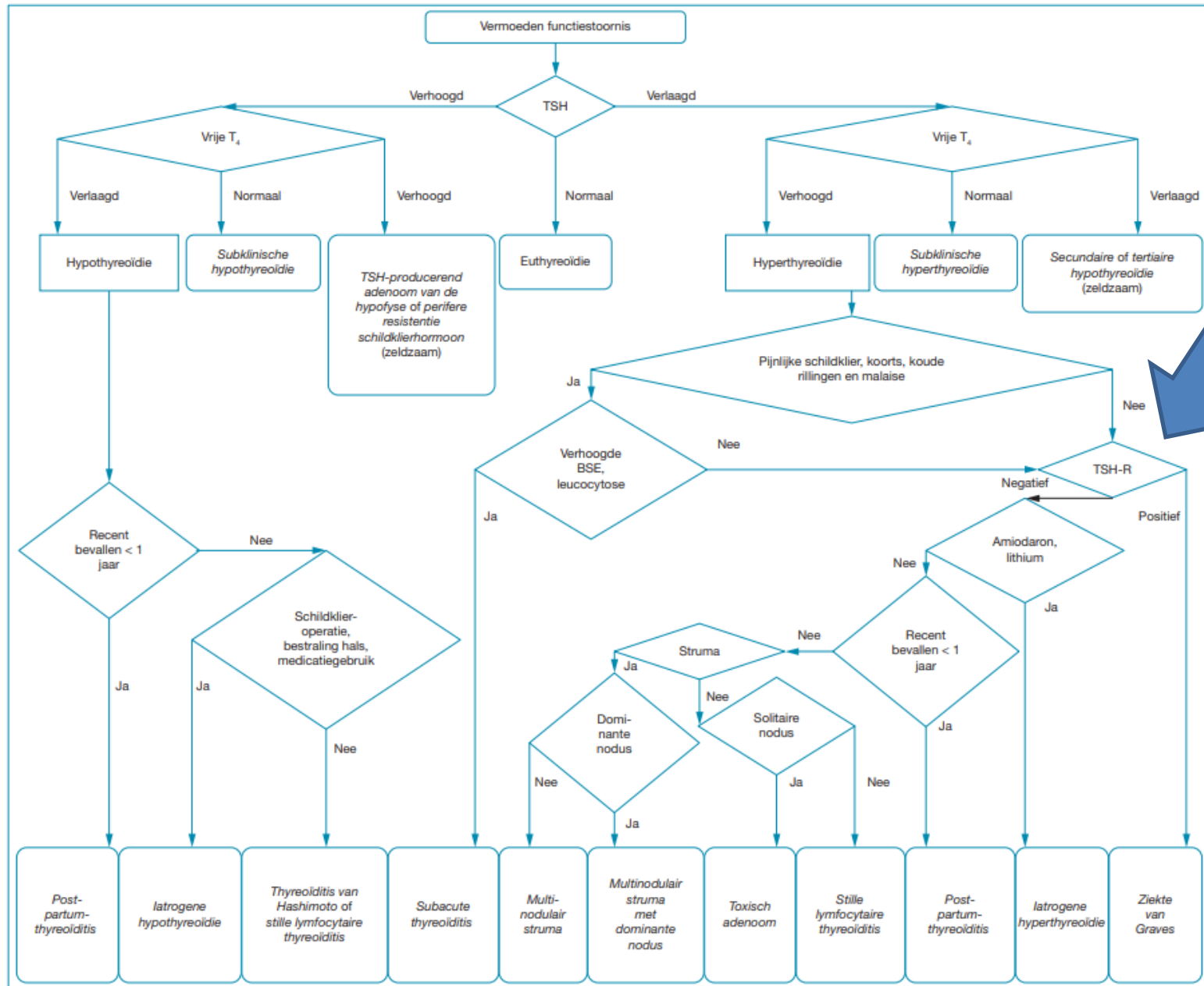
---



## Wanneer TSH-R antistoffen meten?

- diagnose ziekte van Graves en follow-up therapie
- onderscheid tussen ziekte van Graves en andere oorzaken hyperthyroïdie
  - NHG standaard schildklierandoeningen
  - diagnostische tool naast schildklierscintigrafie





# Diagnose Graves



## Welke TSH-R assay?

### TRAb assay

**Table 4** Different principles and related accuracy of immunoassay methods for measurement of TRAbs

Generation	Phase	IRP	Technology	Tracer	Clinical sensitivity, mean (range) (%)	Clinical specificity, mean (range) (%)	1st reference
1st	Liquid	MRC B65/122	RIA	Labeled TSH	79.8 (52.0–100.0)	99.2 (97.5–100.0)	Rees Smith, 1982
2nd	Solid	NIBSC 90/672	RIA, CLIA	Labeled TSH	96.4 (87.0–100)	98.1 (90.3–100.0)	Costagliola, 1999
3rd	Solid	NIBSC 90/672	CLIA, FIA	Labeled MoAb/ Labeled receptor	97.2 (95.0–100.0)	99.2 (97.3–100.0)	Hermesen, 2009

IMAs, immunoassays; IRP, international reference preparation; RIA, radioimmunoassay, CLIA, chemiluminescent immunoassay; FIA, fluoro-immunoassay; MRC, Medical Research Council; NIBSC, National Institute of Biological Standards and Controls.

Tozzoli J Lab Precis Med 2018

### TSI assay

**Table 4**

Previously published cut-off value and diagnostic performances of the TSI immunoassays.

Author	Subjects	Population	Method	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Cut-off (IU/L)
Allelein et al. [20]	30 GD-UT, 221C	Germans	A, chemiluminescent	100.0	99.0	0.55
Tozzoli et al. [9]	72 GD-UT, 311C	Italians	A, chemiluminescent	100.0	98.7	0.54
Autilio et al. [17]	46 GD-UT, 99C	Italians	A, chemiluminescent	98.0	99.0	0.57
Villalta et al. [16]	57 GD-UT, 333C	Italians	A, chemiluminescent	100.0	98.2	0.55
Cheng et al. [21]	100 GD-UT, 1003C	Chinese	A, chemiluminescent	100.0	97.1	0.42

GD-UT, untreated Graves' disease; C Control, including disease control group and healthy subjects group; A Auto

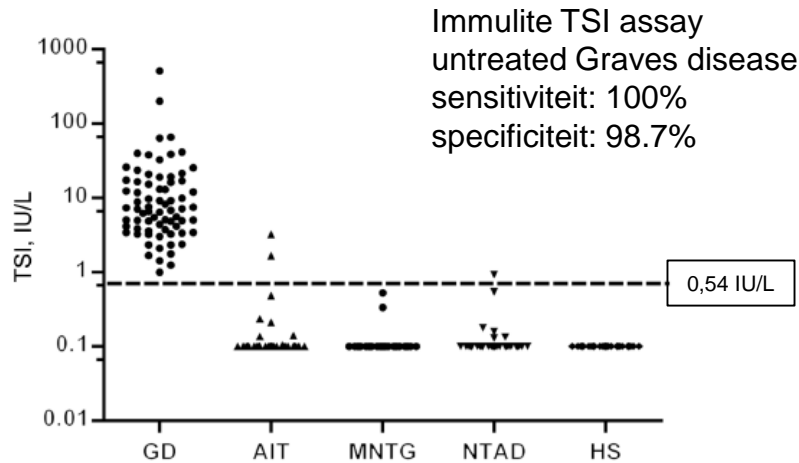
Liu Clin Biochem 2021



# Diagnose Graves



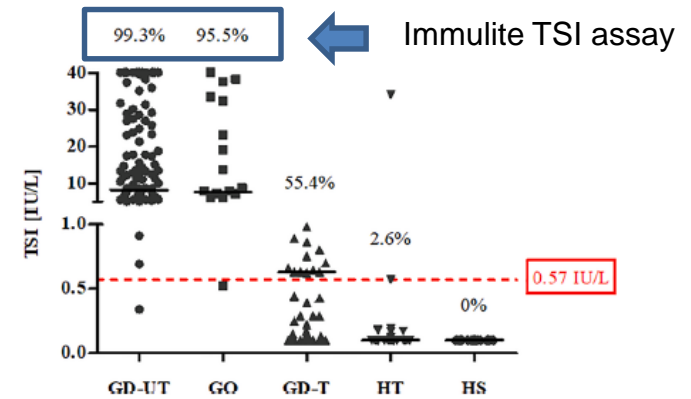
## Welke TSH-R assay?



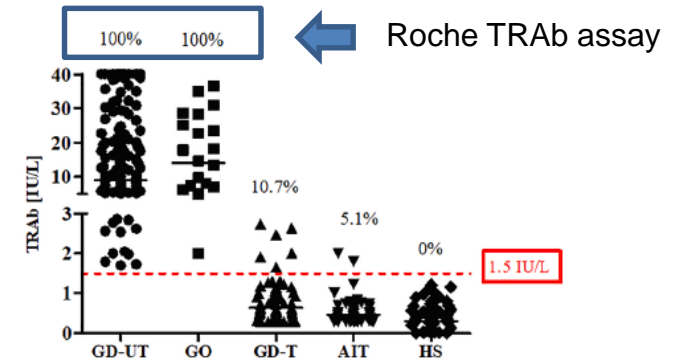
**Figure 3:** S-TRAb levels in the different groups of subjects enrolled in the study.

The dotted line indicates the experimental cut-off obtained by ROC curve (0.54 IU/L). GD, Graves' disease; AIT, autoimmune thyroiditis; MNTG, multinodular non-toxic goiter; NTAD, non-thyroid autoimmune disease; HS, healthy subjects.

Tozzoli CCLM 2016



**Fig. 2A.** TSI levels in each study group based on the Immulite™ TSI assay. %, the percentage of positive cases; TSI, Thyroid-stimulating immunoglobulins; GD-UT, untreated Graves' disease; GO, Graves' ophthalmopathy; GD-T, Graves' disease treated for > 12 months; HT, Autoimmune thyroiditis; HS, Healthy subjects.

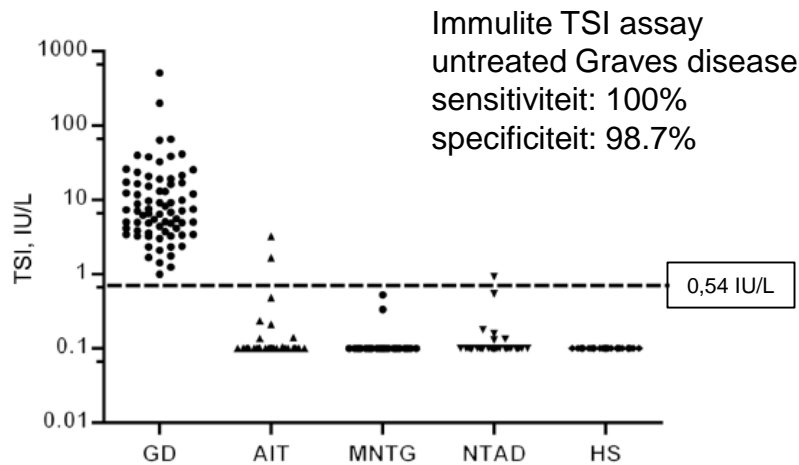


**Fig. 2B.** TRAb levels in each study group based on the Elecsys Anti-TSHR assay. %, the percentage of positive cases; TSI, Thyroid-stimulating immunoglobulins; GD-UT, untreated Graves' disease; GO, Graves' ophthalmopathy; GD-T, Graves' disease treated for > 12 months; AIT, Autoimmune thyroiditis; HS, Healthy subjects.

# Diagnose Graves



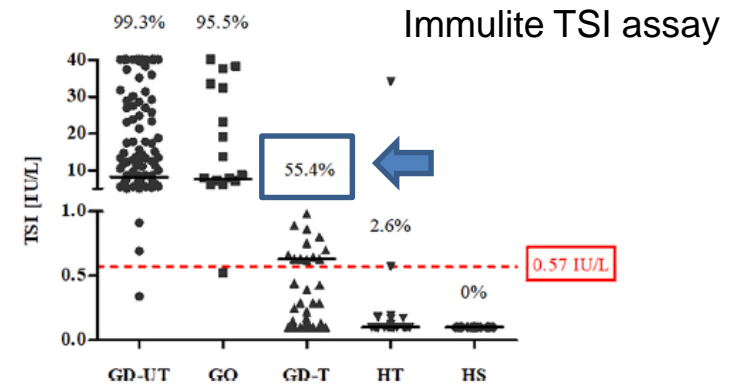
## Welke TSH-R assay?



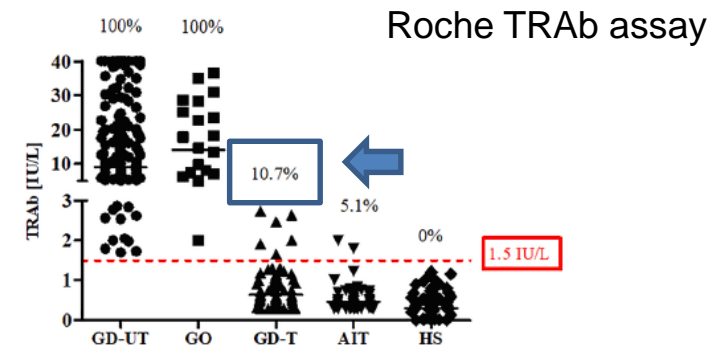
**Figure 3:** S-TRAb levels in the different groups of subjects enrolled in the study.

The dotted line indicates the experimental cut-off obtained by ROC curve (0.54 IU/L). GD, Graves' disease; AIT, autoimmune thyroiditis; MNTG, multinodular non-toxic goiter; NTAD, non-thyroid autoimmune disease; HS, healthy subjects.

Tozzoli CCLM 2016



**Fig. 2A.** TSI levels in each study group based on the Immulite™ TSI assay. %, the percentage of positive cases; TSI, Thyroid-stimulating immunoglobulins; GD-UT, untreated Graves' disease; GO, Graves' ophthalmopathy; GD-T, Graves' disease treated for > 12 months; HT, Autoimmune thyroiditis; HS, Healthy subjects.

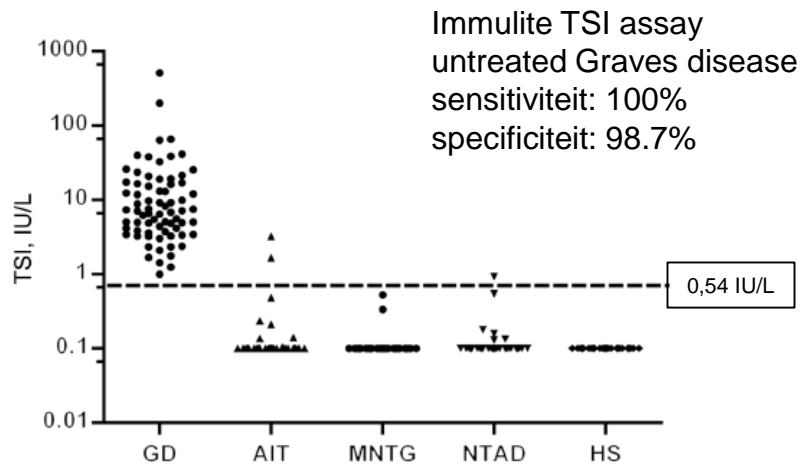


**Fig. 2B.** TRAb levels in each study group based on the Elecsys Anti-TSHR assay. %, the percentage of positive cases; TSI, Thyroid-stimulating immunoglobulins; GD-UT, untreated Graves' disease; GO, Graves' ophthalmopathy; GD-T, Graves' disease treated for > 12 months; AIT, Autoimmune thyroiditis; HS, Healthy subjects.

# Diagnose Graves

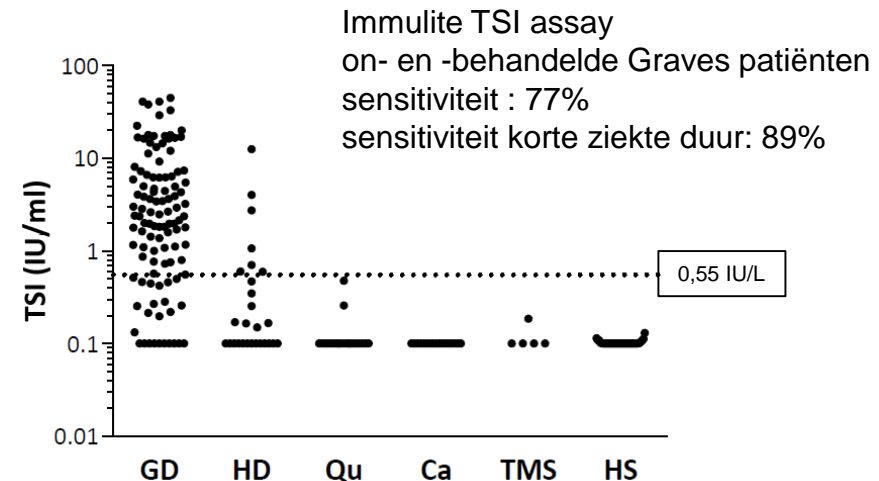


## Welke TSH-R assay?



**Figure 3:** S-TRAb levels in the different groups of subjects enrolled in the study. The dotted line indicates the experimental cut-off obtained by ROC curve (0.54 IU/L). GD, Graves' disease; AIT, autoimmune thyroiditis; MNTG, multinodular non-toxic goiter; NTAD, non-thyroid autoimmune disease; HS, healthy subjects.

Tozzoli CCLM 2016



**Figuur 6:** TSI in verschillende patiëntengroepen met schildklierziekten (GD: ziekte van Graves, HD: ziekte van Hashimoto, Qu Ziekte van Quervain, Ca: Schildklier carcinoom, TMS toxisch multinodulair struma) en gezonde controles (HS). Stippellijn weerspiegelt de grens voor positieve interpretatie (0,55 IU/ml)

Batstra, Heron, Hoedemaker  
NVML Analyse 2017

# Diagnose Graves



## welke TSH-R assay?

- huidige assays hebben goede sensitiviteit en specificiteit voor diagnose Graves
  - geldt niet voor behandelde Graves patiënten
  - veel recente artikelen met methodevergelijkingen
- diagnose ziekte van Graves: beperkte waarde onderscheid TRAb en TSI
  - patiënt met thyreotoxicose
- seronegatief  $\neq$  geen Graves
  - nieuwere assays  $\rightarrow$  minder seronegatieve
  - meting met andere assay en schildklierscintigrafie
  - mogelijk oorzaak: antistoffen beperkt tot schildklier zelf en aangrenzende lymfeklieren

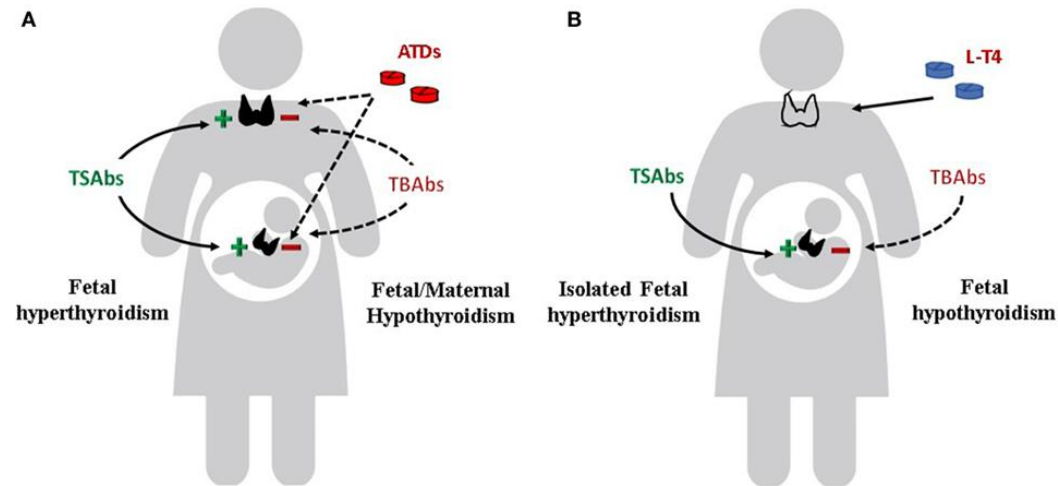


# Klinische toepassingen



## Wanneer TSH-R antistoffen meten?

- diagnose ziekte van Graves en follow-up therapie
- onderscheid tussen ziekte van Graves en andere oorzaken hyperthyroïdie
  - NHG standaard schildklierandoeningen
  - diagnostische tool naast schildklierscintigrafie
- evaluatie van een zwangere vrouw met (doorgemaakte) Graves' hyperthyreoïdie
  - foetale/neonatale hyperthyreoïdie
  - in diverse richtlijnen: NVOG, NIV, internationale verenigingen



# Foetale/neonatale hyperthyreoïdie



## Welke TSH-R assay?

### – TRAb versus TSI bindingsassay

- weinig/geen publicaties over TSI, (nog) niet in richtlijnen
- risico op neonatale hypothyreoïdie: voorkeur TRAb assay > TSI?
- functionele activiteit van TRAb is cruciaal: voorkeur bioassay > bindingsassay?

### – te gebruiken afkapwaarde

- oudere richtlijnen: absolute grenswaarde
  - bijv. NVOG 2010 → 5 U/L Brahms assay
- nieuwe richtlijnen: 3x bovengrens referentie interval
  - richtlijn NIV, internationale richtlijnen

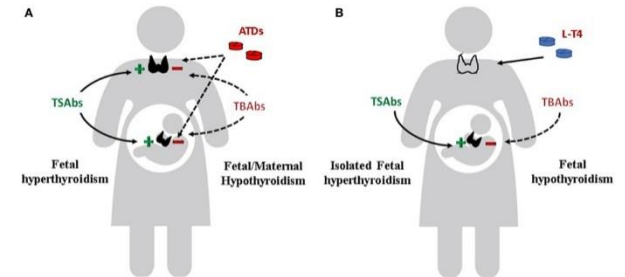
## Wanneer meten in zwangerschap?

### – rekening houden met:

- vanaf 3<sup>de</sup> trimester passage antistoffen door de placenta
- fysiologische immunosuppressie tijdens zwangerschap

### – diversiteit in richtlijnen

- NVOG: meting in 1<sup>ste</sup> of 2<sup>de</sup> trimester → te hoog dan weer in 3<sup>de</sup> trimester
- NIV: 20-24 weken zwangerschap



# Nieuwe ontwikkelingen in TSH-R assays



## Conclusie

- goede TSH-R assays beschikbaar voor
  - diagnose ziekte van Graves
  - risico inschatting foetale/neonatale hyperthyreoïdie
- methode verschillen → assay-specifiek afkapgrenzen
- bindingsassays die geen functionaliteit meten
- aanvullende toepassingen in de toekomst
  - gebruik bij Hashimoto thyreoïditis
  - voorspellen relapse of response op anti-thyroid drug in ziekte van Graves

