

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vergleich der Immunoassay-Sensitivität bei Immunthyreopathie

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Angelica Unterrainer  
aus Bozen (Italien)

Mainz, 2020

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

30. Juni 2020

Meinen Liebsten

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	4
Abkürzungsverzeichnis.....	6
Abbildungsverzeichnis.....	8
Tabellenverzeichnis.....	9
1 Einleitung.....	10
2 Literaturdiskussion.....	12
2.1 Der Morbus Basedow.....	12
2.1.1 Historisches.....	12
2.1.2 Pathophysiologie.....	12
2.1.3 Epidemiologie.....	12
2.1.4 Diagnostik.....	13
2.1.5 Klinik.....	14
2.1.6 Therapie.....	15
2.2 Der TSH-Rezeptor (TSHR).....	18
2.3 Die TSH-Rezeptor-Antikörper (TSHR-AK).....	18
2.3.1 Historisches.....	18
2.3.2 Einteilung.....	19
2.4 Indikationen für den TSHR-AK-Nachweis.....	19
2.4.1 Diagnosefindung.....	19
2.4.2 Therapiewahl.....	19
2.4.3 Vorhersage einer fetalen und neonatalen Thyreotoxikose.....	21
2.4.4 Prognosevorhersage und Diagnostik der Endokrinen Orbitopathie (EO).....	22
2.5 Nachweismethoden für TSH-Rezeptor-Antikörper.....	23
2.5.1 Einteilung.....	23
2.5.2 Kompetitive Immunoassays.....	23
2.5.3 Bioassays.....	25
2.5.4 Assays mit Brückentechnologie.....	27
2.5.5 Kompetitiver a3G-Immunoassay und Bioassay im Vergleich.....	28
3 Material und Methoden.....	29
3.1 Diagnostische Laborparameter.....	29
3.2 Patientenkollektiv: 30 unbehandelte Basedow - Patienten.....	29
3.3 Die Verdünnungsreihe.....	31
3.4 TSHR-AK-Nachweismethoden.....	32
3.4.1 Übersicht.....	32
3.4.2 Die ELISA Assays.....	34

3.4.3	Die automatisierten Immunoassays.....	36
3.5	Statistische Methoden .....	38
4	Ergebnisse .....	39
4.1	Vergleich der qualitativen Performance der Assays .....	39
4.2	Vergleich der Sensitivität der Assays .....	40
4.2.1	Statistischer Vergleich der Sensitivitäten der Assays.....	41
4.2.2	Vergleich der Sensitivitäten mit den Herstellerangaben .....	42
4.3	Vergleich der globalen Sensitivität der Assays.....	43
4.3.1	Statistischer Vergleich der globalen Sensitivität der Assays.....	47
4.4	Vergleich der quantitativen Performance der Assays.....	49
4.4.1	Zwei Beispiele: Quantitativer TSHR-AK-Nachweis .....	51
5	Ergebnisdiskussion .....	53
5.1	Ziel der Arbeit.....	53
5.2	Nutzen der Verdünnungsreihe.....	53
5.3	Vergleich der Immunoassays .....	54
5.3.1	Stichprobe .....	56
5.3.2	Studiendesign.....	56
5.3.3	Unsere Studienergebnisse.....	56
5.3.4	Unsere Studie im Vergleich zu Herstellerangaben und Literatur.....	57
5.4	Kritik an der Studie und Ideen für neue Studien.....	60
6	Zusammenfassung.....	63
7	Literaturverzeichnis.....	65
8	Anhang .....	70
9	Danksagung .....	74
10	Tabellarischer Lebenslauf .....	75

## Abkürzungsverzeichnis

1G	1. Generation
2G	2. Generation
a3G	3. Generation, automatisiert
Abb.	Abbildung
ATD	Antithyroid drugs, Thyreostatika
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of differentiation-Antigen
CHO	Chinese Hamster Ovary
CT	Computertomographie
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EO	Endokrine Orbitopathie
ETA	European Thyroid association
FRTL-5	Fischer rat thyroid cell line-5
ft3	Freies Trijodthyronin
ft4	Freies Thyroxin
GREAT-Score	Graves' Recurrent Events After Therapy-Score
H <sup>1</sup>	Alternativhypothese
HLA	Human leucocyte antigen
H <sup>0</sup>	Nullhypothese
hwt-TSHR	Humaner Wildtyp-TSH-Rezeptor
IGF1r	Insuline-like growth factor-1 receptor
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IMBEI	Institut für medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik der Universitätsmedizin Mainz
IU/L	Internationale Einheiten pro Liter
k.A.	Keine Angabe
KI	Kontraindikation
LATS	Long acting thyroid stimulator
LoB	Limit of blank
LoD	Limit of detection
LoQ	Limit of quantitation
M	Männlich
M. Basedow	Morbus Basedow
m3G	3. Generation, manuell
mAb	Monoklonaler Antikörper
Mc4	Mutant chimeric four
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
N	Menge natürlicher Zahlen
pANCA	Perinukleäre antineutrophile zytoplasmatische Antikörper
PTPN22	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22

RAI	Radiojodtherapie
RCT	Randomisierte, kontrollierte Studie
rLHR	Luteinisierendes-Hormon-Rezeptor aus Ratten
RLU	Relative light units (Relative Lichteinheiten)
SD	Standardabweichung
SRR	Specimen-to-reference-ratio
SSW	Schwangerschaftswoche
TBAb	Siehe TBI
TBI	Thyreoidea-blockierende Immunglobuline
TBII	TSHR-bindende inhibierende Immunglobuline
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TPO	Thyreoperoxidase
TRACE-Technologie	Time-Resolved Amplified Cryptate Emission-Technologie
TSAb	Siehe TSI
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon, Thyreotropin
TSHR	TSH-Rezeptor
TSHR-AK	TSH-Rezeptor-Antikörper
TSI	Thyreoidea-stimulierende Immunglobuline
TSI+	Positiver Nachweis von Thyreoidea-stimulierenden Immunglobulinen
tT3	Gesamt-Trijodthyronin
u.a.	Unter anderem
U/L	Einheiten pro Liter
V.a.	Verdacht auf
vs.	Versus
W	Weiblich

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Diagnostik bei klinischem Verdacht auf Hyperthyreose mit Endpunkt M. Basedow .....	13
Abbildung 2: Therapiealgorithmus M. Basedow .....	17
Abbildung 3: Einteilung Patientenkollektiv .....	30
Abbildung 4: Verdünnungsreihe .....	32
Abbildung 5: Der Kronus ELISA Assay .....	35
Abbildung 6: Der Dynex DS2 ELISA Assay .....	36
Abbildung 7: Der Immulite 2000 Xpi Immunoassay .....	37
Abbildung 8: Der BRAHMS TRAK human Kryptor Immunoassay .....	38
Abbildung 9: Qualitativer Nachweis der TSHR-AK .....	39
Abbildung 10: Vergleich der Sensitivitäten der Assays .....	40
Abbildung 11: Globale Sensitivität der Assays über alle Verdünnungsschritte .....	43
Abbildung 12: Globale Sensitivität der im Bioassay als niedrig TSI positiv gemessenen Proben .....	44
Abbildung 13: Globale Sensitivität der im Bioassay als moderat TSI positiv gemessenen Proben .....	44
Abbildung 14: Globale Sensitivität der im Bioassay als hoch TSI positiv gemessenen Proben .....	45
Abbildung 15: Gerundete Mittelwerte der globalen Sensitivität der Assays pro Verdünnungsschritt .....	46
Abbildung 16: Gerundete Mittelwerte der globalen Sensitivität pro Assay .....	46
Abbildung 17: Boxplot: Vergleich der quantitativen Performance der Assays über alle Verdünnungsstufen .....	49
Abbildung 18: Boxplot: Vergleich der Verdünnungsstufen zwischen den Assays .....	50
Abbildung 19: Vergleich: Quantitativer TSHR-AK-Nachweis einer sehr hoch positiven Probe in allen Assays .....	51
Abbildung 20: Vergleich: Quantitativer TSHR-AK-Nachweis einer sehr niedrig positiven Probe in allen Assays .....	52
Abbildung 21: Wertetabelle für Boxplots (Abb. 17 und 18) .....	70



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: <i>Übersicht und Prävalenz der Klinik des M. Basedow</i> .....	14
Tabelle 2: <i>Kompetitiver a3G-Immunoassay und Bioassay im Vergleich</i> .....	28
Tabelle 3: <i>Klinische Daten Patientenkollektiv</i> .....	31
Tabelle 4: <i>Technische Daten zu den eingesetzten Assays</i> .....	33
Tabelle 5: <i>Assays und Cut-off-Werte</i> .....	39
Tabelle 6: <i>Wertetabelle zu Abb. 9</i> .....	40
Tabelle 7: <i>Wertetabelle zu Abb. 10</i> .....	40
Tabelle 8: <i>Deskriptive Statistik zur Sensitivität der Assays</i> .....	42
Tabelle 9: <i>Post Hoc Tests für Cochran's Q Test</i> .....	42
Tabelle 10: <i>Vergleich der klinischen Sensitivitäten unserer Studie mit Herstellerangaben</i> ....	42
Tabelle 11: <i>Gerundete globale Sensitivitäten pro Assay und Verdünnung (Wertetabelle zu Abb. 11, 15 und 16)</i> .....	47
Tabelle 12: <i>Deskriptive Statistik zur Globalen Sensitivität der Assays</i> .....	48
Tabelle 13: <i>Post Hoc Tests des Friedman-Test</i> .....	48
Tabelle 14: <i>Wertetabelle zu Abb.19</i> .....	51
Tabelle 15: <i>Wertetabelle zu Abb. 20</i> .....	52
Tabelle 16: <i>Globale Sensitivität der im Bioassay als niedrig TSI positiv gemessenen (Wertetabelle zu Abb.12)</i> .....	73
Tabelle 17: <i>Globale Sensitivität der im Bioassay als moderat TSI positiv gemessenen (Wertetabelle zu Abb.13)</i> .....	73
Tabelle 18: <i>Globale Sensitivität der im Bioassay als hoch TSI positiv gemessenen (Wertetabelle zu Abb. 14)</i> .....	73

# 1 Einleitung

Der Morbus Basedow ist eine Autoimmunerkrankung der Schilddrüse, die durch Thyreoidea-stimulierende Antikörper (Thyreoidea-stimulierende Immunglobuline, TSI) ausgelöst wird. Diese stimulierenden Autoantikörper richten sich gegen den Thyreotropin-Rezeptor (TSHR) und gehören zu den Thyreotropin-Rezeptor-Antikörpern (TSHR-AK). Sie stimulieren die Produktion von Schilddrüsenhormonen und die Proliferation der Thyreozyten, was zur Hyperthyreose und zur Entwicklung einer Struma führt. Das klinische Beschwerdebild des M. Basedow beruht somit auf der Hyperthyreose und ist Ausdruck eines gesteigerten Grundumsatzes. Häufige Symptome sind Tachykardie, vermehrtes Schwitzen, Gewichtsabnahme und psychomotorische Unruhe. Es können außerdem extrathyreoidale Manifestationsformen, wie beispielsweise eine Augenbeteiligung mit Endokriner Orbitopathie (EO), auftreten.

Die TSHR-AK sind pathognomonisch für den M. Basedow. Ihr Nachweis ist grundsätzlich in jeder Basedow-Diagnostik sinnvoll und in klinisch uneindeutigen Fällen essentiell. Außerdem sind die TSHR-AK ein wichtiger Bestandteil der Prognoseprädiktion in Hinblick auf eine optimale Therapiewahl, sowie der Überwachung von schwangeren Patientinnen und somit der Prävention einer neonatalen Thyreotoxikose. Zusätzlich können sie in der Diagnostik und Prognoseprädiktion der EO hilfreich sein.

Der TSHR-AK-Nachweis erfolgt heute mittels Immuno- oder Bioassay. Moderne Immunoassays nutzen TSH-Rezeptoren, an die monoklonale Antikörper (mAb) binden. Diese Bindung löst meist eine messbare Farbreaktion aus. Sind TSHR-AK (beispielsweise aus Patientenserum) vorhanden, binden diese kompetitiv an die Rezeptoren, verhindern die Bindung der mAbs und somit die Entwicklung der Farbreaktion. Diese Immunoassays sind schnell durchführbar, meist wenig kostenintensiv und sehr sensitiv. Allerdings können sie nicht zwischen den verschiedenen Typen von TSHR-AK unterscheiden.

Im Gegensatz dazu werden im Bioassay lebende Zellkulturen mit Patientenserum inkubiert und zeigen direkt die Funktion der Antikörper. Dieser exaktere Nachweis ist jedoch tendenziell aufwändiger und teurer und eher für die experimentelle Forschung als für die tägliche klinische Praxis geeignet.

Der Anspruch an die moderne Medizin sollte es sein, für möglichst viele Patienten ein optimales klinisches Outcome und eine zufriedenstellende Lebensqualität zu erreichen. Dazu muss die Behandlung individualisiert und so früh wie möglich erfolgen. Dies kann nur durch eine effiziente Diagnostik und eine optimale Therapiewahl erreicht werden.

Somit ist der TSHR-AK-Nachweis als essentieller Bestandteil der Diagnostik, Prognoseprädiktion und Verlaufsbeobachtung für Basedow-Patienten ein großer Schritt in diese Richtung. Aufgrund dieser Relevanz muss der TSHR-AK-Nachweis möglichst sensitiv, zeit- und kosteneffizient erfolgen.

Diese Überlegungen inspirierten meinen Doktorvater, meine Betreuerin und mich zum Vergleich von vier Immunoassays. Da wir die Sensitivität genauer untersuchen wollten und es bis zu Beginn der praktischen Arbeit (Sommer 2016) keine Vergleiche zwischen einzelnen TSHR-AK-Immunoassays in Verdünnungsreihen gab, entwickelten sich zwei Zielstellungen der Promotion:

- 1) Vergleich der Sensitivität von vier Immunoassays (Kronus, Immulite, Kryptor, Dynex DS2)**
- 2) Vergleich der globalen Sensitivität der vier Immunoassays über die Verdünnungsreihe**

Im Folgenden möchte ich diese Fragestellungen genauer erörtern und die Ergebnisse dieser Promotion vorstellen.

## 2 Literaturdiskussion

### 2.1 Morbus Basedow

#### 2.1.1 Historisches

Robert Graves entdeckte im Jahr 1835 als einer der Ersten den Zusammenhang von Struma, Palpitationen und Exophthalmus. Nach ihm wurde der Morbus Basedow im englischen Sprachgebrauch als Graves' disease bezeichnet. Fast zeitgleich beschrieb der in Merseburg tätige Arzt Karl Adolph von Basedow die Erkrankung im Jahr 1848 ebenfalls und wurde ihr Namensgeber im deutschen Sprachraum (1).

#### 2.1.2 Pathophysiologie

In der Autoimmunerkrankung M. Basedow stimuliert die Bindung von TSI an den TSHR die Bildung von Schilddrüsenhormonen und umgeht die Kontrolle der Hypothalamus-Hypophysen-Achse.

Als ursächlich für die Krankheitsentstehung gelten genetische Prädisposition (80 %), sowie Umweltfaktoren (20 %). So hat etwa die Hälfte aller Basedow-Patienten eine positive Familienanamnese. Ausschlaggebend sind Genvarianten der Regionen, die für den TSHR, das Thyreoglobulin, das human leucocyte antigen (HLA), das cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA4), das protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 22 (PTPN22), und für CD 25 und CD 40 kodieren. Einflussreiche Umweltfaktoren sind vor allem Tabakrauch, emotionaler Stress und molekulare Mimikry nach einer Infektion mit *Yersinia enterocolitica* (2, 3).

#### 2.1.3 Epidemiologie

Der Morbus Basedow ist in Gebieten mit ausreichender Jodversorgung mit 80 % die häufigste Ursache für eine Schilddrüsenüberfunktion (3). In Jodmangelgebieten ist die Schilddrüsenautonomie hingegen häufiger.

Die Jahresinzidenz beträgt je nach Literatur 20 bis 50 Fälle pro 100.000 Personen. Das Lebenszeitrisko, an M. Basedow zu erkranken, ist für Frauen mit ungefähr 3 % deutlich höher als für Männer mit 0,5 %. Die Autoimmunerkrankung kann in allen Altersstufen auftreten, die höchste Wahrscheinlichkeit besteht jedoch zwischen 30 und 60 Jahren (2, 4).

## 2.1.4 Diagnostik

Die Diagnostik des Morbus Basedow erfolgt klinisch, biochemisch, serologisch und mittels Bildgebung. Folgende Abbildung zeigt den diagnostischen Pfad bei klinischem Verdacht auf Hyperthyreose mit Endpunkt M. Basedow:

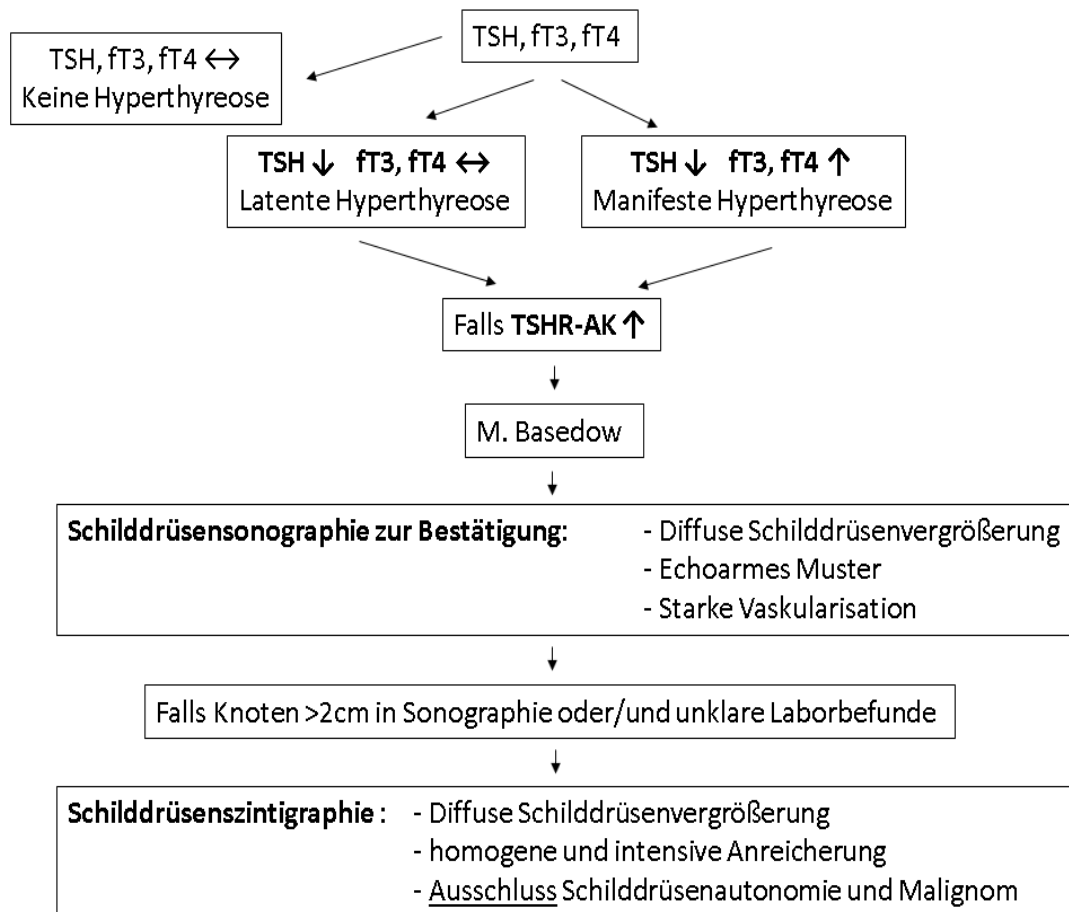


Abbildung 1: Diagnostik bei klinischem Verdacht auf Hyperthyreose mit Endpunkt M. Basedow (modif. nach Kahaly et al. 2018 European Thyroid Association Guideline for the Management of Graves' Hyperthyroidism (5) und nach Smith et al. Graves'disease (2))

Weitere diagnostische Hilfsmittel sind die Computertomographie (CT) und die Magnetresonanztomographie (MRT). Sie kommen einerseits am Hals zur Anwendung, falls es durch die wachsende Schilddrüse zu einer Einengung der Atemwege kommt, andererseits am Auge in unklaren Fällen der Endokrinen Orbitopathie (EO) (6).

Differentialdiagnostisch sind bei V.a. M. Basedow an verschiedene Erkrankungen zu denken. Dazu zählen Schilddrüsenautonomien bei Struma nodosa, eine schmerzlose Thyreoiditis, eine subakute Thyreoiditis de Quervain, eine medikamenteninduzierte Thyreoiditis (z.B. durch Iod, Thyroidhormon, Amiodaron oder Lithium), ein

Schilddrüsenkarzinom und eine Molenschwangerschaft oder Chorionkarzinom (Stimulation der Schilddrüse durch erhöhtes humanes Choriongonadotropin) (4). Außerdem sind weitere Ursachen für die klinische Symptomatik, wie eine Psychose, ein Status febrilis, Kokain- oder Amphetaminmissbrauch auszuschließen (7).

### 2.1.5 Klinik

Basedow-Patienten zeigen die Klinik einer manifesten Hyperthyreose. Die Symptome sind meist Zeichen eines gesteigerten Grundumsatzes. Außerdem können extrathyreoidale Manifestationsformen wie die Endokrine Orbitopathie mit Augenlidretraktion, Exophthalmus, Dysfunktion der extraokulären Muskeln, Schmerzen und Optikusneuropathie auftreten. Seltener kommt es zum prätibialen Myxödem oder zur Akropachie (4).

Folgende Tabelle, modifiziert nach Burch et al. (4) und nach Smith et al. (2), zeigt eine Übersicht über die häufigsten Symptome mit Prävalenz:

*Tabelle 1: Übersicht und Prävalenz der Klinik des M. Basedow, modifiziert nach Burch et al. (4) und Smith et al. (2)*

<b>System</b>	<b>Symptom</b>	<b>Prävalenz (%)</b>
ZNS	Fatigue	70
	Psychomotorische Unruhe, Schlafstörungen	40
Schilddrüse	Diffuse Struma mit Schwirren	70
Vegetativum	Tachykardie (bis zu Arrhythmien)	80
	Palpitationen	50
	Kurzatmigkeit	10
	Tremor	40
	Wärmeintoleranz und Schwitzen	45
	Haarausfall	k.A.
	Erhöhte Stuhlfrequenz	20
Metabolismus	Gewichtsverlust	60
	Gewichtszunahme	10
Extrathyreoidale Manifestationen	Augen: Endokrine Orbitopathie	50
	Haut: Prätibiales Myxödem	1-4
	Knochen: Akropachie	Selten, k.A.

Bei jüngeren Patienten ist die Klinik, mit Ausnahme von Atemnot, Gewichtsverlust und Vorhofflimmern, meist ausgeprägter als bei Patienten über 61 Jahren (8).

### 2.1.6 Therapie

Aktuell basiert die Therapie des M. Basedow auf drei Säulen (4, 9):

- **Thyreostatika** (antithyroid drugs, ATD):  
Thionamide (Carbimazol, Thiamazol/Methimazol, Propylthiouracil):  
Normalisierung des Thyroidhormonspiegels durch Hemmung der Thyroidhormonsynthese → **Rückfallquote 52,7 %**
- **Radiojodtherapie** (RAI):  
Aufnahme radioaktiven Jods (Jod-131) in die Thyreozyten, dadurch progrediente Zerstörung der Thyreozyten-DNA und somit schließlich der gesamten Schilddrüse → **Rückfallquote 15 %**
- **Totale Thyreoidektomie**:  
Operative Entfernung der Schilddrüse → **Rückfallquote 10 %**

Die symptomatische Therapie kann außerdem mit unselektiven Beta-Blockern erfolgen (4).

#### 2.1.6.1 Thyreostatika

Als initiale Therapie nach Diagnosestellung wird in Europa, Asien und Amerika üblicherweise die medikamentöse thyreostatische Therapie gewählt. In den meisten Fällen erfolgt die Therapie über 12-18 Monate entweder nach dem „Titration-Regime“ (ATD niedrig dosiert, je nach fT3- und fT4-Wert) oder nach dem „Block-replace-Regime“ (ATD hoch dosiert, zusätzlich T4-Substitution) (5). Abraham et al. fassten die Ergebnisse von 26 RCTs zusammen und favorisierten daraufhin das Titration-Regime, da es weniger Nebenwirkungen hat und sich bezüglich Rückfallquote nicht vom Block-replace-Regime unterscheidet (10).

Große Vorteile der medikamentösen Therapie sind die Nichtinvasivität, ihr geringes Risiko für eine permanente Hypothyreose und eine möglicherweise immunmodulierende Wirkung. Nachteile sind die hohe Rückfallquote, sowie das Nebenwirkungsprofil. Es reicht von harmloseren Beschwerden wie Hautausschlag und gastrointestinalen Symptomen mit einer Inzidenz von 1-5 % bis hin zu Agranulozytose und Hepatotoxizität mit 0,1-0,2 %, sowie seltener zu Leukopenie und pANCA-Vaskulitis (2, 4).

### *2.1.6.2 Radiojodtherapie*

Bei der Radiojodtherapie (RAI) wird <sup>131</sup>Jod peroral eingenommen, von den Thyreozyten aufgenommen und in die Schilddrüsenhormone eingebaut. Durch radioaktiven  $\beta$ -Zerfall wird nach und nach die gesamte Schilddrüse zerstört. Meist sind die Patienten innerhalb von wenigen Monaten hypothyreat (4). Von allen Therapieoptionen ist die RAI die günstigste (11).

Nach der RAI besteht das Risiko einer vorübergehenden Verschlechterung der Hyperthyreose. Durch eine prätherapeutisch euthyreote Stoffwechsellage kann dieses Risiko minimiert werden. So wird je nach Literatur für alle oder zumindest für einige Patientengruppen die Thyreostatikatherapie bis zur Euthyreose empfohlen (2, 4). Außerdem geht die RAI oft mit erhöhten TSHR-AK-Werten und einer Verschlechterung oder Entstehung der Endokrinen Orbitopathie einher. Bei Patienten mit präexistenter EO wird daher eine Glukokortikoidtherapie zur Prophylaxe empfohlen (12). Außerdem ist das Verfahren für schwangere und stillende Patientinnen kontraindiziert (4).

Ein großer Vorteil der Therapie ist die geringe Rückfallquote von nur 15 % (9). Da das Verfahren per se kurativ ist und zur Hypothyreose führt, ist die Substitution der Schilddrüsenhormone nötig. Entgegen vieler Befürchtungen ist die RAI nicht mit einem erhöhten Karzinomrisiko assoziiert (4).

### *2.1.6.3 Totale Thyreoidektomie*

Die totale Thyreoidektomie ist eine wichtige Therapieoption für Patienten mit großer Struma, malignomsuspekten Schilddrüsenknoten und für Patientinnen mit Kinderwunsch (4). Sie ist die teuerste Option (11). Vor der Thyreoidektomie sollte zur Verhinderung einer thyreotoxischen Krise die Euthyreose hergestellt sein. Ein großer Vorteil des Verfahrens ist die niedrige Rückfallquote und die schnelle Krankheitskontrolle. Die Thyreoidektomie hat jedoch die üblichen Operations-, sowie Anästhesierisiken und es kann zur Nervus-Recurrens-Parese oder zum Hypoparathyreoidismus kommen. Außerdem ist die Schilddrüsenhormonsubstitution nach der Therapie nötig (4).

### *2.1.6.4 Therapiewahl*

Eine Langzeit-Follow-up-Studie von Abraham-Nordling et al. zeigt, dass die Lebensqualität behandelter Basedow-Patienten im Vergleich zu einer gesunden Referenzgruppe vermindert ist. Zwischen den einzelnen Behandlungsmethoden zeigt



sich bezüglich Lebensqualität jedoch kein signifikanter Unterschied (13). So sollte die passende Therapieoption mit jedem Patienten individuell vereinbart werden.

Allgemein kann nach folgendem Schema vorgegangen werden (in Anlehnung an die 2018 European Thyroid Association Guideline for the Management of Graves' Hyperthyroidism) (5):

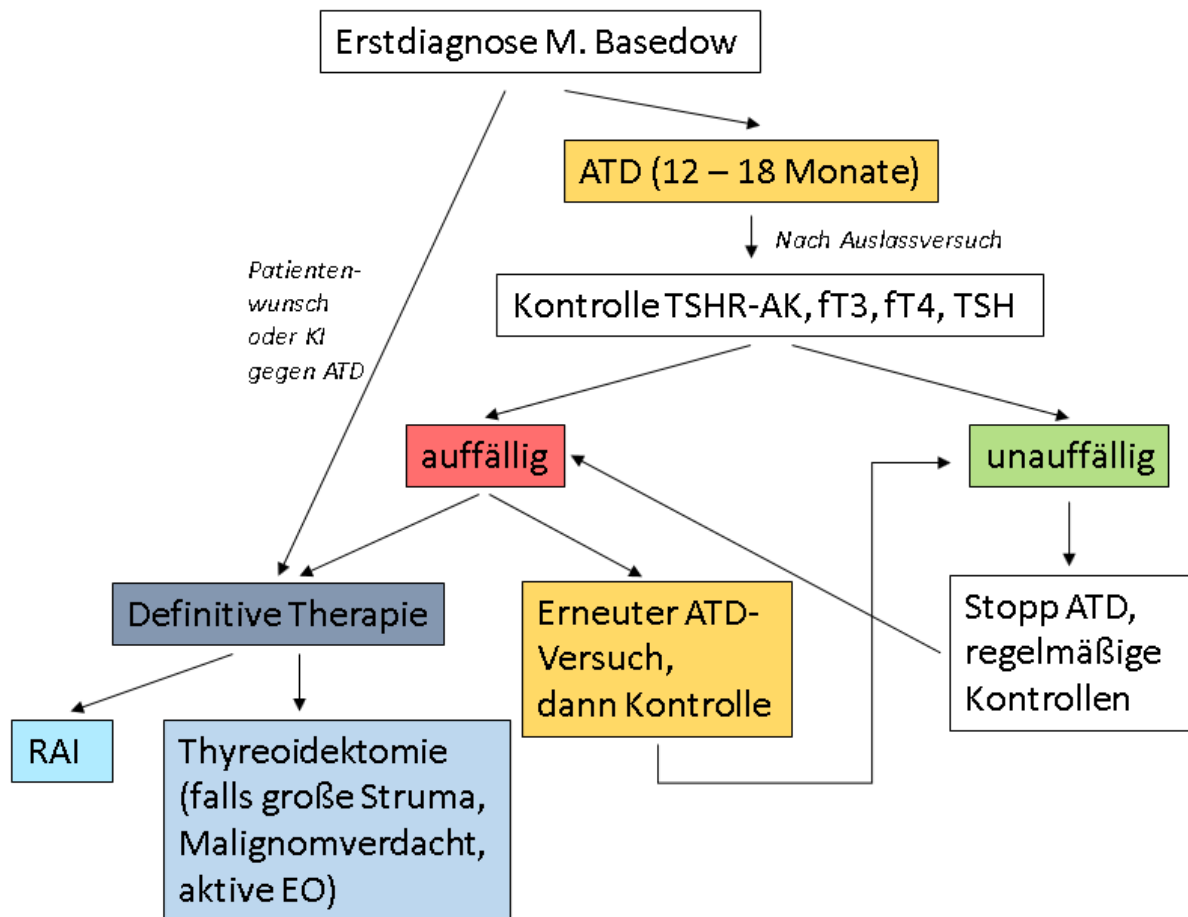


Abbildung 2: Therapiealgorithmus M. Basedow nach 2018 European Thyroid Association Guideline for the Management of Graves' Hyperthyroidism (5)

### 2.1.6.5 Zukünftige Therapien

Die drei Therapiesäulen ATD, RAI und Thyreoidektomie können den M. Basedow meist heilen oder zumindest gut kontrollieren. Trotzdem ist die Lebensqualität vieler Patienten, wie oben schon erwähnt, nicht zufriedenstellend (13). Hier ist es nötig, effiziente und wirksame Therapiestrategien zu entwickeln, die die Krankheit gezielter und nebenwirkungsärmer bekämpfen.

Diese neuen Therapieoptionen sind vor allem immunmodulatorischer Natur, z. B. wird an blockierenden Antikörpern gegen den TSHR, an Antikörpern gegen B-Zellen

und an der Förderung von regulatorischen T-Zellen geforscht. Außerdem wird die Radiofrequenzablation der Schilddrüse erprobt. Für die Therapie der EO werden monoklonale Antikörper, z.B. gegen Interleukin-6 (IL-6) und den insuline-like growth factor-1 receptor (IGF1r) erforscht (14).

Die Therapieaussichten sind vielversprechend, sie müssen sich jedoch in Studien und in der klinischen Praxis bewähren (14).

## 2.2 Der TSH-Rezeptor (TSHR)

Der TSH-Rezeptor ist das primäre Antigen, gegen den sich die TSHR-Antikörper des M. Basedow richten. Er befindet sich größtenteils auf den Thyreozyten, wurde jedoch auch auf Adipozyten und Fibroblasten der Orbita, sowie in der Nebenniere und im Thymus nachgewiesen (15).

Entdeckt wurde der Rezeptor im Jahre 1966 von Pastan et al. (16) und geklont im Jahre 1989 von Parmentier et al. (17).

Strukturell ist der TSHR ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, bestehend aus:

- einer Ektodomäne mit Cleavage- Region,  $\alpha$ - und  $\beta$ - Untereinheit,
- sieben Transmembrandomänen und
- einer G-Protein-gekoppelten Endodomäne (18).

TSH, TSI und TBI konkurrieren um Bindungsstellen auf der  $\alpha$ -Untereinheit, selten auch auf der  $\beta$ -Untereinheit, während die Cleavage- Antikörper an die Cleavage-Region binden (19, 20)

Posttranslational wird der TSHR komplex modifiziert. Diese Veränderungen können einen großen Einfluss auf seine Autoantigenität im M. Basedow haben (19).

## 2.3 Die TSH-Rezeptor-Antikörper (TSHR-AK)

### 2.3.1 Historisches

Im Jahr 1956 entdeckten Adams und Purves Proteine mit stimulierenden Effekten am TSHR, die jedoch verschieden zum TSH waren. Sie nannten diese Proteine „long acting thyroid stimulator“ (LATS) (18, 21). 1964 wurden die LATS als Antikörper vom IgG-Typ identifiziert und sechs Jahre später wurde gezeigt, dass sie, genauso wie das TSH, die Adenylatzyklase in Thyreozyten aktivieren. Kurz darauf stellte sich heraus, dass die LATS mit dem TSH um die Bindung an den TSHR konkurrieren (22).

### 2.3.2 Einteilung

Die TSHR-AK können nach ihrer Wirkung auf die Zielzellen unterteilt werden in:

- Thyreoidea stimulierende Antikörper (TSI), auch TSAb genannt
- Thyreoidea blockierende Antikörper (TBI), auch TBAb genannt, und in
- Neutrale oder Cleavage- Antikörper mit unterschiedlichen Effekten, z.B. Apoptose (19, 23).

TSI induzieren die cAMP-Bildung und fördern, ähnlich wie das TSH, das Wachstum und die Proliferation der Thyreozyten, sowie die Hormonsynthese und -sekretion. Außerdem können sie zytotoxische Signalwege unterdrücken. Sie sind für die klinische Symptomatik der Basedow-Patienten verantwortlich. TBI hingegen fungieren als schwache oder inverse Agonisten. Cleavage- Antikörper binden an die Cleavage-Region des TSHR und können zu Zellstress, Differenzierung und letzten Endes zum Zelltod führen(19).

Im Serum von Basedow-Patienten finden sich nicht nur TSI, sondern auch TBI. Das Verhältnis von TSI/TBI beeinflusst die klinische Ausprägung der Erkrankung (24).

Als TSHR-bindende inhibierende Immunglobuline (TBII) werden alle Immunglobuline bezeichnet, die mittels kompetitiven Immunoassays nachgewiesen werden. Sie entsprechen grundsätzlich der Gesamtheit der TSHR-AK, da kompetitive Immunoassays nicht zwischen den Antikörpertypen unterscheiden können (25).

## 2.4 Indikationen für den TSHR-AK-Nachweis

### 2.4.1 Diagnosefindung

Der TSHR-AK-Nachweis erfolgt aus unterschiedlichen Gründen, deren Berechtigung teils diskutiert wird. Unumstritten ist, dass TSHR-AK pathognomonisch für den M. Basedow sind und deren Nachweis somit in klinisch uneindeutigen Fällen ein wichtiger Teil der Diagnosefindung ist (26).

### 2.4.2 Therapiewahl

Die Rückfallquote nach medikamentöser thyreostatischer Therapie (ATD) bei Morbus Basedow liegt laut einer Metaanalyse von Sundaresh et al. (8 Studien und 667 mit ATD behandelte Patienten) bei 52,7 % (9). Um diese hohe Quote zu verbessern, ist es wichtig, bereits vor Therapiebeginn herauszufinden, welche Patienten durch ATD zu Langzeitremission gelangen. Patienten, die voraussichtlich nur kurzfristig von der

medikamentösen Therapie profitieren, könnten so, ohne Umweg über Langzeit-ATD, direkt ein definitives Therapieverfahren erhalten.

Aus diesem Grund ist der Bedarf an Prognosefaktoren für die Rückfallwahrscheinlichkeit nach ATD groß. Da die TSHR-AK pathognomonisch für den M. Basedow sind, werden sie seit einigen Jahren dahingehend untersucht.

Viele Studien weisen darauf hin, dass ein hoher TSHR-AK-Titer vor und nach ATD mit einer hohen Rückfallwahrscheinlichkeit einhergeht. So untersuchten Schott et al. 93 Patienten mit M. Basedow und bestimmten den TSHR-AK-Wert mit einem 2G-Bindungsassay nach ATD-Therapie über durchschnittlich 5,1 Monate. Es zeigte sich, dass TSHR-AK-Werte über 10 IU/L mit einer großen Wahrscheinlichkeit für einen Rückfall innerhalb von zwei Jahren sprechen (positiv prädiktiver Wert: 96,4 %). Im Umkehrschluss kann laut dieser Studie aber keine Rückfallprognose für TSHR-AK-Werte unter 10 IU/L getroffen werden (27). Cappelli et al. untersuchten 216 Patienten über 10 Jahre. Sie fanden heraus, dass die besten Prädiktoren für eine Langzeitremission der TSHR-AK-Wert und die TSHR-AK-Fallrate nach sechs Therapiemonaten sind (Sensitivität: 63 % und Spezifität: 88 %) (28).

Es existieren zahlreiche weitere Studien mit ähnlichen Ergebnissen. Einige davon haben jedoch die Einschränkung, dass sie nur die TSHR-AK-Messung *nach* Therapiebeginn oder *nach* Therapieende bewerten. Am relevantesten bezüglich Therapieplanung sind jedoch die Marker, die schon VOR ATD-Beginn eine Prognose geben können (29).

Struja et al. untersuchten schließlich in einer Metaanalyse 54 Studien, die von 1977 bis 2015 durchgeführt worden waren, um Faktoren zu finden, mit denen die Rückfallprognose nach ATD sicher vorausgesagt werden kann. Sie kamen zum Schluss, dass folgende Faktoren signifikant mit der Rückfallwahrscheinlichkeit korrelieren: Endokrine Orbitopathie, Rauchen, Schilddrüsenvolumen, Gesamt-Trijodthyronin (tT3), fT4, TSHR-AK und TSI. Da jeder Faktor für sich genommen jedoch laut Metaanalyse noch keine sichere Prognose stellen kann, sollten die Faktoren in einem Risikoscore zusammengefasst werden und zusätzlich neue Marker identifiziert werden (30).

Eine niederländische Forschergruppe entwickelte daraufhin im Jahr 2016 den „Graves' Recurrent Events After Therapy“ (GREAT) - Risikoscore, der auf Basis von klinischen Parametern einfach zu erfassen ist. Er berücksichtigt Alter, fT4-Spiegel,

TSHR-AK-Titer und Struma-Grad vor Therapiebeginn und teilt die Patienten in drei Risikoklassen ein. Für bestimmte Patientengruppen empfehlen die Entwickler des Scores außerdem, eine genomische Testung bezüglich HLA-Polymorphismen und PTPN22-Mutation durchzuführen (29). Struja et al. führten eine retrospektive Multicenter-Studie mit 741 Patienten durch und fanden eine gute externe Validität des Scores.

Shyamasunder et al. bewerteten den Score ebenfalls als nützlich, bemerkten jedoch die vielerorts eingeschränkte Verfügbarkeit der genomischen Testung (31, 32).

Insgesamt kann, nach Einsicht in die vorhandene Literatur, der TSHR-AK-Wert in Zusammenschau mit Klinik und Genetik als prognostisches Hilfsmittel für die Rückfallwahrscheinlichkeit nach ATD gelten.

#### 2.4.3 Vorhersage einer fetalen und neonatalen Thyreotoxikose

TSHR-AK sind als Antikörper vom IgG-Typ plazentagängig und können somit bei Feten von Müttern mit M. Basedow eine Hyperthyreose bis zur thyreotoxischen Krise auslösen. Obwohl die Schwangerschaft eine immunsuppressive Wirkung hat, kann die Antikörperzahl beträchtlich groß bleiben. Die Prävalenz der Hyperthyreose in Neugeborenen von Basedow-Patientinnen beträgt 1 % (26). Fetale thyreotoxische Krisen treten meist erst ab der zweiten Schwangerschaftshälfte auf, weil die fetale Schilddrüse erst ab der 20. Schwangerschaftswoche (SSW) auf TSH und TSHR-AK reagiert und Schilddrüsenhormone produziert. Außerdem steigt im dritten Trimenon die Anzahl an TSHR-AK, die die Plazenta passieren (26).

Bei hyperthyreoten Feten kann es zu intrauteriner Wachstumsverzögerung, Hydrops fetalis, Kraniosynostosen und intrauterinem Fruchttod kommen. Hyperthyreote Neugeborene können unter Hyperkinesie, Durchfall und Erbrechen, insuffizienter Gewichtszunahme, Ophthalmopathie, Herzinsuffizienz und Arrhythmien, systemischem und pulmonalem Bluthochdruck, Gelbsucht, Hepatosplenomegalie, Hyperviskositätssyndrom, Thrombozytopenie und Kraniosynostose leiden. Meist kommt es zu einer Remission innerhalb von 20 bis spätestens 48 Wochen (33). Die Behandlung erfolgt in der Regel mit Methimazol,  $\beta$ -Blockern und kardialer Unterstützungstherapie (5).

Der beste Prognosefaktor für die fetale und neonatale Thyreotoxikose ist der maternale TSHR-AK-Titer mit einer Vorhersagerate von 42 % laut Tamaki et al. (34). Abeillon-du Payrat et al. untersuchten 42 TSHR-AK-positive Schwangere und ihre 47

Neugeborenen. Es zeigte sich, dass TSHR-AK-Titer  $>5$  IU/L im zweiten Schwangerschaftstrimenon mit einer Sensitivität von 100 % und einer Spezifität von 43 % eine Hyperthyreose des Neugeborenen vorhersagen können. Die zusätzliche Durchführung eines TSI-Bioassays konnte die Spezifität, bei gleichbleibender Sensitivität, auf 85 % erhöhen (35).

Um das Risiko besser abschätzen zu können, sollen laut den aktuellen Leitlinien der European Thyroid Association (ETA) alle schwangeren Frauen mit Autoimmunthyreoiditis in der Vorgeschichte eine TSHR-AK-Bestimmung zu Beginn der Schwangerschaft durchführen lassen. Ein erhöhter TSHR-AK-Wert soll in der 22. bis 28. SSW nachkontrolliert werden. Falls der TSHR-AK-Wert über dem Dreifachen des cut-off-Werts liegt, sollte der Fetus auf Zeichen der Thyreotoxikose untersucht werden. Hierzu zählen das Messen der fetalen Herzfrequenz, des intrauterinen Wachstums und des fetalen Schilddrüsenvolumens, sowie gegebenenfalls die Nabelschnurpunktion zur Überwachung der fetalen Schilddrüsenfunktion (5, 33).

Die allgemeine Empfehlung der ETA für Patientinnen mit Kinderwunsch ist es, vor Schwangerschaftsbeginn eine Euthyreose anzustreben. Falls eine Schwangerschaft trotz Hyperthyreose besteht, soll mit Propylthiouracil und gegebenenfalls mit Propranolol therapiert werden, da Methimazol stärker teratogene Eigenschaften als Propylthiouracil hat. Die Schilddrüsenfunktion der Schwangeren soll regelmäßig kontrolliert werden, damit bei sinkendem TSHR-AK-Titer ein Absetzen der medikamentösen Therapie erwogen werden kann (5).

Nach Sichtung der vorhandenen Literatur hat der TSHR-AK-Nachweis in der Vorhersage der fetalen und neonatalen Thyreotoxikose einen bedeutenden Stellenwert.

#### 2.4.4 Prognosevorhersage und Diagnostik der Endokrinen Orbitopathie (EO)

50 % der Basedow-Patienten entwickeln die Endokrine Orbitopathie als extrathyreoidale Manifestationsform der Autoimmunerkrankung. Der genaue Pathomechanismus ist noch nicht geklärt. Man hat jedoch den TSHR auf Fibroblasten der Orbita von EO-Patienten gefunden und vermutet hier eine Interaktion mit den TSHR-AK. Außerdem scheint der Insulin-like growth factor 1-receptor, an den TSHR-AK ebenfalls binden, zusätzlich an der Pathogenese beteiligt zu sein (2).

Die Diagnose der EO kann meist durch die klinische Symptomatik (Exophthalmus, Augenlidretraktion) in Kombination mit der Hyperthyreose gestellt werden. 2-5 % aller EO-Patienten präsentieren jedoch eine atypische, meist nur unilaterale Symptomatik und keine Schilddrüsendysfunktion (36). In diesen Fällen ist es besonders wichtig, einen orbitalen Tumor oder eine arteriovenöse Malformation auszuschließen. Dies erfolgt meist durch Bildgebung mittels CT oder MRT und kann durch einen TSHR-AK-Nachweis ergänzt werden (2, 36).

Außerdem wird diskutiert, ob der TSHR-AK- und TSI-Nachweis zur Abschätzung von Prognose und Schweregrad der EO eingesetzt werden können. Dies ist hilfreich für die Therapieplanung, vor allem bezüglich Art und Dauer einer antiinflammatorischen Behandlung.

Seo et al. verglichen in ihrer Metaanalyse 26 Studien, die zwischen 1999 und 2018 durchgeführt worden waren. Sie kamen zum Schluss, dass der TSI-Titer grundsätzlich der bessere Prognoseprädiktor als der TSHR-AK-Titer ist. Hier zeigte sich in allen Studien eine signifikante oder mindestens sehr starke Korrelation zwischen Prävalenz und Schweregrad der EO. In behandelten Patienten hatte jedoch auch der TSHR-AK-Titer eine gute Vorhersagekraft (37).

## 2.5 Nachweismethoden für TSH-Rezeptor-Antikörper

### 2.5.1 Einteilung

TSHR-AK können heute mit Hilfe von

- Kompetitiven Immunoassays
- Bioassays und
- Assays mit Brücken-Technologie

nachgewiesen werden (38).

### 2.5.2 Kompetitive Immunoassays

Kompetitive Immunoassays messen die von TSHR-AK des Patienten verursachte Inhibition der Bindung eines Liganden an den TSHR (26). Im Gegensatz zu Bioassays sind sie nicht in der Lage, zwischen TSI, TBI und Cleavage-Antikörpern zu unterscheiden.

Die kompetitiven Immunoassays der ersten Generation (1G-Assays) wurden in den frühen 1980er Jahren u.a. von Rees Smith und Hall entwickelt und nutzen radioaktiv markiertes TSH, sowie einen, in einem Detergens gelösten, TSHR. TSHR-AK aus

Patientenserum konkurrieren mit dem markierten TSH um die Bindung an den TSHR. Die Komplexe aus radioaktiv markiertem TSH und TSHR werden durch Zentrifugieren mit Polyethylenglykol ausgefällt (39). Je mehr TSHR-AK aus Patientenserum an den TSHR binden, desto weniger radioaktive TSH-TSHR-Komplexe fallen aus.

Tozzoli et al. untersuchten 21 Studien mit insgesamt 3081 Patienten und 3795 Kontrollen und verglichen die diagnostische Genauigkeit der Assay-Generationen. Die 1G-Assays erreichen laut Tozzoli et al. eine gepoolte Sensitivität von 88,6 % (40). Laut Furmaniak et al. detektieren 1G-Assays die TSHR-AK mit einer analytischen Sensitivität von 2 IU/L (41). 20 Jahre lang waren 1G-Assays trotz ihrer technisch anspruchsvollen Durchführung und des Bedarfs an radioaktivem Material weit verbreitet (40).

Nach der Klonung des humanen TSHR begann in den 1990er Jahren die Entwicklung einer neuen Generation von Immunoassays. Es wurden nun an Plastik fixierte, hoch affine humane, porcine oder monoklonale Antikörper (mAb) genutzt, die den gelösten TSHR gezielt binden. Die Sensitivität dieser zweiten Generation der Immunoassays (2G-Assays) stieg deutlich (Tozzoli et al.: gepoolte Sensitivität 97,1 %), ohne eine starke Reduktion der Spezifität (Tozzoli et al.: gepoolte Spezifität 98,3 %). Laut Furmaniak et al. verbesserte sich die analytische Sensitivität auf 1 IU/L. Die Markierung des mit den TSHR-AK konkurrierendem TSH erfolgte nun nicht mehr zwingend radioaktiv, sondern alternativ mit Biotin oder einem Chemilumineszenz-Reagenz. Die Assays mit humanen Antikörpern entwickelten sich nun zum Gold-Standard im TSHR-Nachweis (40, 41).

Im Jahr 2003 beschrieben Sanders et al. einen monoklonalen Antikörper, der von Lymphozyten eines 19-jährigen Basedow-Patienten produziert wurde (mAb M22). Dieser hoch affine Antikörper hat eine starke stimulatorische Wirkung und konkurriert mit TSH und TSHR-AK kompetitiv um die Bindung an den TSHR (42).

Wenig später entwickelten Rees Smith et al. mit diesem mAb M22 den ersten manuellen Assay der dritten Generation der Immunoassays (m3G-Assay). Die analytische Sensitivität verbesserte sich laut Furmaniak et al. deutlich auf 0,4 IU/L, die gepoolte diagnostische Sensitivität laut Tozzoli et al. auf 97,4 % und die gepoolte diagnostische Spezifität auf 99,2 %.



Im Unterschied zu den früheren Assays bindet nun markierter mAb M22 anstelle von markiertem TSH an den TSHR und konkurriert mit den TSHR-AK um die Bindungsplätze (43). Im Vergleich zu markiertem TSH bleibt mAb M22 viel stabiler an den TSHR gebunden und eröffnet so die Möglichkeiten der Entwicklung automatisierter Immunoassays (a3G-Assays) (41, 44).

So untersuchten Schott et al. im Jahre 2009 einen voll automatischen Elektrochemilumineszenz-Immunoassay (Elecsys, Roche), und fanden eine ähnlich hohe Sensitivität und Spezifität wie in manuellen Assays (44). 2010 folgte ein voll automatischer, auf M22 basierender fluoro-enzymatischer Immunoassay (45). Hersteller wie Siemens, Kronus, Brahms Thermo Scientific, Roche und viele andere entwickelten weitere automatische Immunoassays mit durchwegs guter, jedoch unterschiedlicher diagnostischer Performance (46, 47).

Heute ist die TSHR-AK-Bestimmung mittels automatisierten Immunoassays der dritten Generation ein Standardverfahren.

### 2.5.3 Bioassays

Im Gegensatz zu den kompetitiven Immunoassays testen TSHR-Bioassays direkt die biologische Aktivität der Antikörper und deren Wirkung auf die Zielzelle. Sie können somit zwischen TSI und TBI unterscheiden.

Die ersten Bioassays, die den LATS-Nachweis zum Ziel hatten, wurden in den 1950er Jahren in vivo an Meerschweinchen und an Mäusen durchgeführt. Nach einer Iod-freien Diät wurde den Tieren radioaktiv markiertes Iod und Thyroxin injiziert. So konnte die endogene TSH-Produktion unterdrückt werden und radioaktiv markiertes Iod von den Thyreozyten aufgenommen werden. Nach Injektion von Patientenserum wurden die daraufhin produzierten radioaktiven Schilddrüsenhormone über einen Szintillationsdetektor gemessen.

Diese Bioassays waren aufwändig, langsam, fehleranfällig und ethisch umstritten bezüglich Tierwohl (48-50).

In den 1960er und 1970er Jahren wurden in vitro Bioassays an Schilddrüsengewebe und isolierten Schilddrüsenzellen von Mäusen, Schweinen, Rindern und Menschen entwickelt (51-53). Sie zielten jedoch ebenfalls auf den Nachweis von produzierten, radioaktiv markierten Schilddrüsenhormonen ab und waren somit weiterhin aufwändig und langsam. Es wurde nach einer neuen, praktischeren Nachweissubstanz gesucht.

Schließlich bestätigte sich die Theorie, dass die Bindung von TSH und LATS an den TSHR einen cAMP-Signalweg aktiviert (54, 55). Die tiefere Erforschung der Theorie führte zur Entwicklung von Bioassays mit Nachweis von radioaktivem cAMP als Endpunkt (56).

Aufgrund des steigenden Bedarfs an Schilddrüsengewebe entstanden einige Bioassays mit tierischen Zellkulturen. Eine Forschergruppe um Leonard D. Kohn entwickelte in den 1980er Jahren einen sehr bedeutenden Bioassay mit der robusten FRTL-5-Zelllinie (Fischer rat thyroid cell line-5) (57). Dieser Bioassay erreichte eine Spezifität von 97,6 % und eine Sensitivität von 90,4 % (58).

Parmentier et al. gelang mit der Klonung des humanen TSHR im Jahr 1989 ein großer Durchbruch (17). Nun konnte der TSHR in Zellen eingebracht werden, die robuster und weniger aufwändig zu kultivieren waren als die FRTL-5-Zellen. So wurde in den 1990er Jahren ein Bioassay mit Ovarzellen des chinesischen Zwerghamsters (CHO-Zellen) und humanem TSHR entwickelt. Wegen der größeren Sensitivität, der leichteren Durchführbarkeit und des humanen TSHRs löste er den FRTL-5-Bioassay ab (59).

Chimärische TSH-Rezeptoren mit speziellen Eigenschaften wurden entwickelt, wie z.B. der Mc4-TSHR, eine Kombination aus humanem Wildtyp-TSHR (hwt-TSHR) und einem Luteinisierendes-Hormon-Rezeptor aus Ratten (rLHR). Die Besonderheit des Mc4-Rezeptors besteht darin, dass TSI die cAMP-Signalkaskade ähnlich stark wie am hwt-TSHR auslöst, während TSH fünf- bis zehn-mal weniger Effekt hat und TBI sogar noch weniger Wirkung zeigt (60).

Der Nachweis von cAMP über Radioimmunoassays wurde in den 1990er Jahren eingeführt, schien jedoch noch verbesserungswürdig (61). So wurde der Chemilumineszenz-Nachweis mittels Luciferase entwickelt. Das Firefly-Luciferase Gen wird über ein Plasmid in Zelllinien eingebracht. Ein cAMP-induzierter Promoter kontrolliert die Expression des Firefly-Luciferase Gens (62).

Die Kombination aus diesen Errungenschaften führte zu einem äußerst sensitiven Bioassay mit Mc4-TSHR auf CHO-Zellen und Chemilumineszenz-Nachweis mittels Luciferase (63). Das Hauptziel dieses Bioassays war der alleinige Nachweis von TSI, ohne Einfluss von TSH, TBI und Cleavage-Antikörpern, um Basedow-Patienten besser abgrenzen zu können.

Giuliani et al. fassen in ihrem Review mehrere Studien zusammen und zeigen die höhere Sensitivität (100 %) und Spezifität (98,5 %) des Mc4-Luciferase-Bioassays im Vergleich zum CHO-hwt-TSHR-Bioassay und zum 2G-Immunoassay. Die Sensitivität dieses Bioassays ist sogar höher als die Sensitivität des M22-Immunoassays (100 % vs. 97,4 %), hat jedoch eine leicht verringerte Spezifität (98,5 % vs. 99,2 %) (64).

Der Mc4-Luciferase-Bioassay ist mittlerweile als kommerzielles Kit verfügbar und kann in weniger als 24 Stunden durchgeführt werden (61). Er wurde von Diana et al. standardisiert und ist somit zwischen verschiedenen Laboren vergleichbar (65).

Giuliani et al., sowie Lytton und Kahaly fassen in ihren Reviews mehrere Studien zusammen und zeigen die deutlichen Fortschritte in der Bioassay-Forschung, die seit 60 Jahren gemacht wurden. Sie finden eine sehr gute Performance des Mc4-Luciferase-Bioassay z.B. als Prognoseprädiktor in Basedow-Patienten (66), in Patienten mit Endokriner Orbitopathie (63, 67), oder in unbehandelten Kindern (68).

Der große Vorteil dieses Bioassays liegt, wie bereits erwähnt, im gezielten Nachweis von TSI. Außerdem ist er durch die Verfügbarkeit des kommerziellen Kits und der Standardisierung heutzutage sehr gut durchführbar. Trotzdem sind noch weitere Studien zum Zeit-Kosten-Nutzen-Verhältnis erforderlich, um den Mc4-Luciferase-Bioassay als Standarddiagnostik zu etablieren (48, 61, 64).

#### 2.5.4 Assays mit Brückentechnologie

Im Jahr 2015 entwickelten Frank et al. einen in vitro Assay, der gezielt TSI über eine Brückentechnologie nachweisen soll. Ein Mc4-TSHR wird als „capture receptor“ an einer Mikrotiterplatte verankert und bindet einen Arm des Patienten-Autoantikörpers. Der andere Arm des Autoantikörpers bindet an einen „detection receptor“, woraufhin eine Chemilumineszenz-Reaktion gemessen werden kann. Die Sensitivität beträgt 99,8 %, die Spezifität 99,1 % (69). Kurze Zeit später wurde der Assay automatisiert (70).

Es erscheint jedoch unwahrscheinlich, dass der Assay ausschließlich stimulierende Autoantikörper nachweist (46).

## 2.5.5 Kompetitiver a3G-Immunoassay und Bioassay im Vergleich

Tabelle 2: Kompetitiver a3G-Immunoassay und Bioassay im Vergleich

<b>3G-automatisierter Immunoassay</b>	<b>Bioassay</b>
Messung von TBII, keine Differenzierung zwischen TSI und TBI	Differenzierung zwischen TSI und TBI
Einfache, schnelle Durchführung	Etwas kompliziertere und langsamere Durchführung
Einfache kommerzielle Verfügbarkeit	Nur teilweise kommerzielle Verfügbarkeit

(26, 46)

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Diagnostische Laborparameter

Wie in der Literatordiskussion bereits beschrieben, ist der TSHR-AK-Nachweis für den M. Basedow in verschiedenen Situationen indiziert.

In dieser Arbeit untersuchten wir TSHR-AK-Serumspiegel mittels vier Immunoassays. Somit können die nachgewiesenen TSHR-AK auch als TBII bezeichnet werden (25).

Drei der vier Immunoassays messen in International Units pro Liter (IU/L), und Dynex DS2 in Units pro Liter (U/L).

### 3.2 Patientenkollektiv: 30 unbehandelte Basedow - Patienten

Wir untersuchten die TSHR-AK-Spiegel im Serum von 30 unbehandelten, an M. Basedow erkrankten Patienten retrospektiv in zwei ELISA-Immunoassays (Kronus und Dynex) und zwei automatisierten Bindungsimmunoassays (Immulite und Kryptor).

Die Serumproben stammen von Patienten, die in der Endokrinologischen Ambulanz der Universitätsmedizin in Mainz zwischen 2010 und 2014 in Behandlung waren. Alle Patienten erklärten sich mit der anonymisierten Verwendung ihrer Daten und der weiteren Analyse ihrer Seren einverstanden.

Die Einteilung der Patienten erfolgte anhand des TSI-Werts, der im Thyretain-Bioreporter Assay der Firma Quidel, Athens, Ohio, USA gemessen wurde. Dieser Bioassay enthält Ovar - Zellen des chinesischen Zwerghamsters (CHO-Zellen), die zur Messung von funktionellen stimulierenden TSHR-AK eine chimäre Form des humanen TSHR (Mc4-Rezeptoren) exprimieren. Wenn TSI aus Patientenserum an diese G-Protein gekoppelten Mc4-Rezeptoren binden, löst sich deren Alpha – Untereinheit und aktiviert die Adenylatzyklase, sodass cAMP gebildet wird. Das cAMP induziert einen Promotor des Luciferase-Gens. Die daraus resultierende Luciferase-Aktivität wird in relativen Lichteinheiten (RLU) mit einem Luminometer in einer enzymatischen Reaktion gemessen und mit der Luciferase-Aktivität der Referenzkontrolle verglichen (60, 71).

Der Unterschied zum Referenzwert wird als specimen-to-reference-ratio (SRR) in Prozent angegeben und wie folgt ausgerechnet:

$$\text{SRR\%} = \frac{\text{Mittelwert TSI RLU (Patient)}}{\text{Mittelwert TSI RLU (Referenzkontrolle)}} \times 100$$

Die Mittelwerte werden in relativen Lichteinheiten (RLU) angegeben und aus jeweils zwei TSI - Messungen aus Patientenserum und Referenzsubstanz bestimmt. Die Referenzsubstanz enthält bovines TSH in einer Konzentration von 0,1 IU/mL (60, 72).

Der cut-off Wert, ab dem der TSI-Nachweis als positiv gilt (TSI+), liegt bei 140 % SRR. Jeweils zehn unserer Patienten haben einen niedrigen (ein cut-off 140 - 279 SRR %), moderaten (zwei cut-offs 280 – 419 SRR %) oder hohen (drei cut-offs > 420 SRR %) TSI-Wert.

Folgende Abbildung zeigt die Einteilung des Patientenkollektivs:

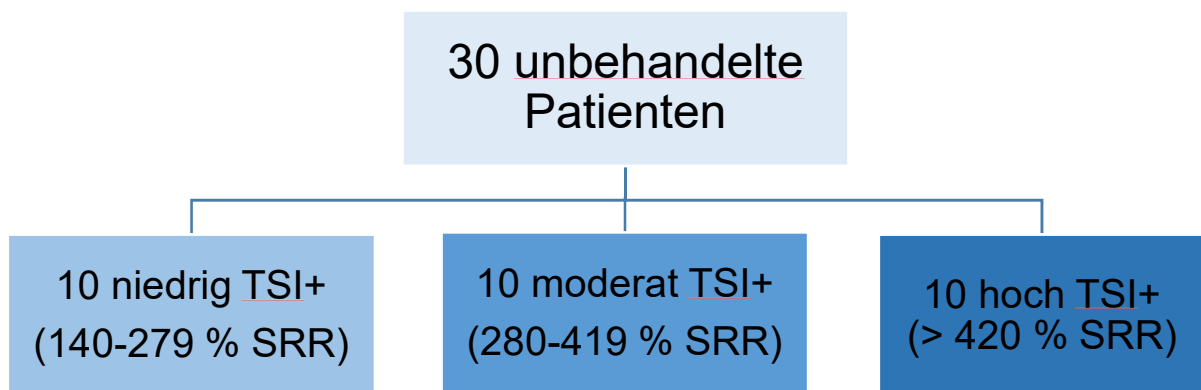


Abbildung 3: Einteilung Patientenkollektiv

Folgende Tabelle mit Legende zeigt klinische Daten der 30 Patienten:

Tabelle 3: Klinische Daten Patientenkollektiv

	<b>TSI 140 - 279 % SRR</b>	<b>TSI 280 - 419 % SRR</b>	<b>TSI &gt; 420 % SRR</b>
<b>Anzahl (N)</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
<b>W (N) / M (N)</b>	8 / 2	7 / 3	8 / 2
<b>Alter zum Zeitpunkt der Blutentnahme MW ± SD (Jahre)</b>	39,2 (±13,9)	40,1 (± 13,7)	47,1 (±13,9)
<b>Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung M. Basedow MW ± SD (Jahre)</b>	35,1 (± 14,5)	37,4 (±13,3)	42,4 (±16,8)
<b>EO (%)</b>	10		50
<b>Raucher (%)</b>	20	50	60
<b>Allergien (%)</b>	40	50	30
<b>Neurodermitis (%)</b>		10	
<b>Urtikaria (%)</b>			10
<b>Vitiligo (%)</b>			10
<b>Psoriasis (%)</b>			10

*Legende:*

- N* = Anzahl
- W* = weiblich
- M* = männlich
- MW* = Mittelwert
- SD* = Standardabweichung
- EO* = Endokrine Orbitopathie
- SRR%* = Specimen-to-reference-ratio

### 3.3 Die Verdünnungsreihe

Aus jedem Patientenserum wurde mit der jeweiligen Messmethode zuerst unverdünnt der TSHR-AK-Wert (IU/L) bestimmt. Dann wurde jedes Serum jeweils 1:3 mit TSHR-AK-negativem Serum verdünnt bis der TSHR-AK-Wert unter dem für den jeweiligen Assay vom Hersteller festgelegten cut-off Wert lag. Um diesen Punkt zu erreichen, wurden Verdünnungen von 1:3, 1:9, 1:27, 1:81 und je nach Bedarf von 1:243 angefertigt.

Folgende Abbildung zeigt die Verdünnungsreihe:

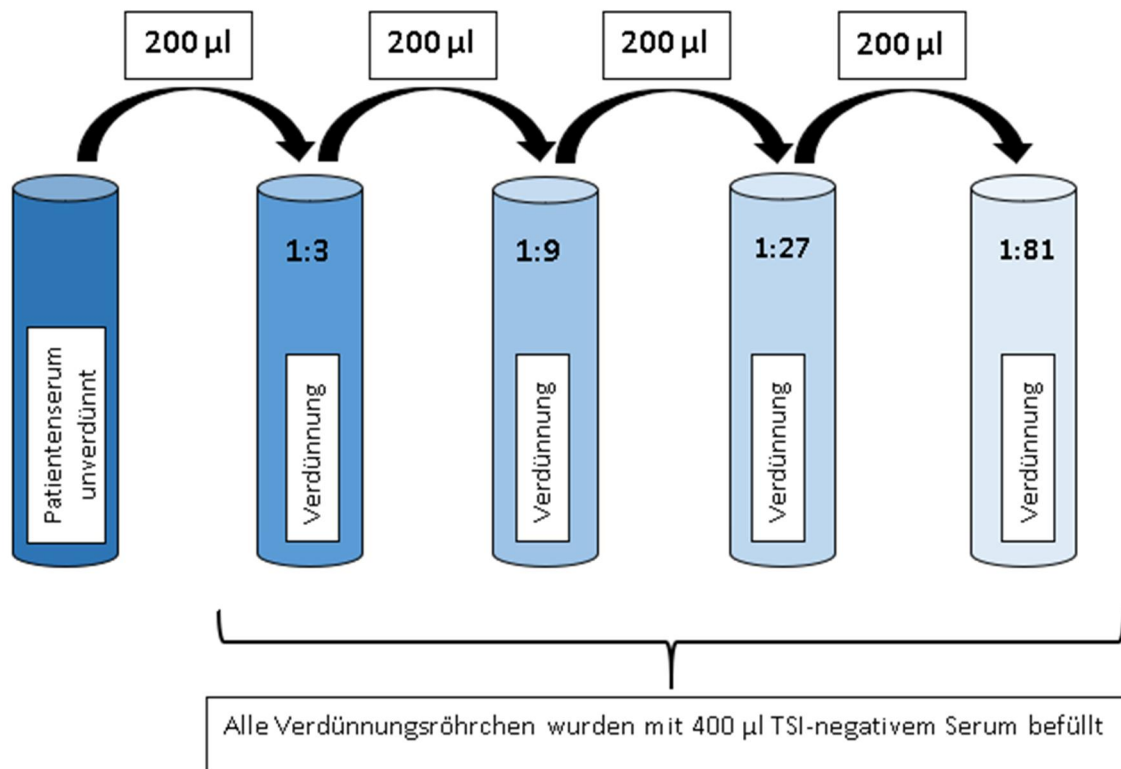


Abbildung 4: Verdünnungsreihe

### 3.4 TSHR-AK-Nachweismethoden

#### 3.4.1 Übersicht

Alle TSHR-AK-Nachweismethoden wurden laut Herstellerangaben durchgeführt.

Folgende Tabelle zeigt eine Übersicht über technische Details der Assays laut Informationen aus den Packungsbeilagen. Leere Felder in der Tabelle stehen für fehlende Herstellerangaben.



Tabelle 4: Technische Daten zu den eingesetzten Assays

	Ziel des Assays	Generation	Cut-off (IU/L)	LoD (IU/L)	LoQ (IU/L)	Analytische Sensitivität (IU/L)	Klinische Sensitivität (%)	Klinische Spezifität (%)
<b>BINDUNGSASSAYS</b>								
<b>ELISA-Kits</b>								
<b>Kronus</b>	Semiquantitativer TRAK-Nachweis über monoklonalen Antikörper M22 und Absorptionsmessung nach Zugabe von Farbsubstrat	m3G	1	0,06	0,56	0,06	85	100
<b>DS2 Dynex (Tecommedical)</b>	Quantitativer TRAK-Nachweis über Biotin-markiertes TSH und Farbreaktion mit Enzymkonjugat	2G	2 U/L	0,25 U/L			98	99
<b>Automatisierte Immunoassays</b>								
<b>Immulite 2000 Xpi (Siemens)</b>	Quantitativer TSH-Nachweis durch Chemilumineszenz über Brückentechnologie von Bindungs- und Signal-TSH-Rezeptoren	Automatisiert Brücken-Technologie	0,55	0,06	0,10		98,3	99,7
<b>Kryptor (Thermofisher)</b>	Quantitativer TRAK-Nachweis durch Immunofluoreszenz über monoklonale Antikörper (TRACE-Technologie)	a3G	1,8	0,27	0,89		96,3	98,1
<b>BIOASSAY</b>								
<b>Thyretain (Quidel)</b>	Qualitativer TSH-Nachweis über CHO-Zellen und Mc4-TSH-Rezeptor durch Luciferase-Aktivität	-	140 SRR%	89 SRR%			92,0	99,4

Begriffserklärung zur Tabelle:

- *Cut-off*: TSHR-AK-Werte unterhalb des cut-offs sind laut Herstellerangaben als negativ für M. Basedow anzunehmen.
- *LoD und LoQ*: Das Limit of detection (LoD) und das Limit of Quantitation (LoQ) können über das Limit of Blank (LoB) bestimmt werden. Dabei kann das LoB nach mehrmaligem Messen von Leerwertproben berechnet werden. Es wird definiert als die höchste Analytkonzentration, die in einer Probe gemessen wird, die keinen Analyten enthalten soll. Das LoD ist die niedrigste Konzentration, bei der eine Methode einen Analyten qualitativ noch nachweisen kann. Im Gegensatz zum LoD beschreibt das LoQ die Konzentration, bei der ein Analyt mit einer gewissen Zuverlässigkeit nicht nur nachgewiesen, sondern auch quantifiziert werden kann. Das LoQ ist genauer als das LoD und muss daher mindestens so groß oder größer sein als das LoD (73).
- Die *analytische Sensitivität* ist der kleinste Konzentrationsunterschied einer Substanz, der gerade noch zuverlässig unterschieden werden kann (74).
- Die *klinische Sensitivität* beschreibt den Anteil der als richtig positiv erkannten Proben an allen in Wirklichkeit positiven Proben. Eine hohe Sensitivität spricht also für einen sicheren Nachweis einer Erkrankung (74).
- Die *klinische Spezifität* beschreibt den Anteil der als richtig negativ erkannten Proben an allen in Wirklichkeit negativen Proben (74).

### 3.4.2 Die ELISA Assays

#### 3.4.2.1 Der Kronus ELISA Assay

Mit dem TSH-Rezeptor Antikörper ELISA Kit der Firma Kronus, Star, Idaho, USA werden TSHR-AK aus Serum semiquantitativ nachgewiesen. In diesem ELISA-Assay sind die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit TSH-Rezeptoren beschichtet. TSHR-AK aus Kalibratoren, Kontrollen und Patientenserum interagieren mit den TSH-Rezeptoren und binden daran. Ein Thyreoidea-stimulierender humaner monoklonaler Antikörper (M22-Peroxidase) wird hinzugegeben, der an die noch freien TSH-Rezeptoren bindet. Der semiquantitative Nachweis der M22-Peroxidase erfolgt nun nach Zugabe eines Farbsubstrats, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB), durch Ablesen der Absorption bei Licht der Wellenlänge 450 nm. Eine niedrige Absorption spricht hier für wenig gebundenes TMB und M22 und somit für das Vorhandensein

von TSHR-AK in der Probe. Für ein exakteres Ergebnis liefert der Hersteller eine Negativkontrolle, eine Positivkontrolle und vier Kalibratoren mit vier jeweils genau definierten Konzentrationen an TSHR-AK (75).

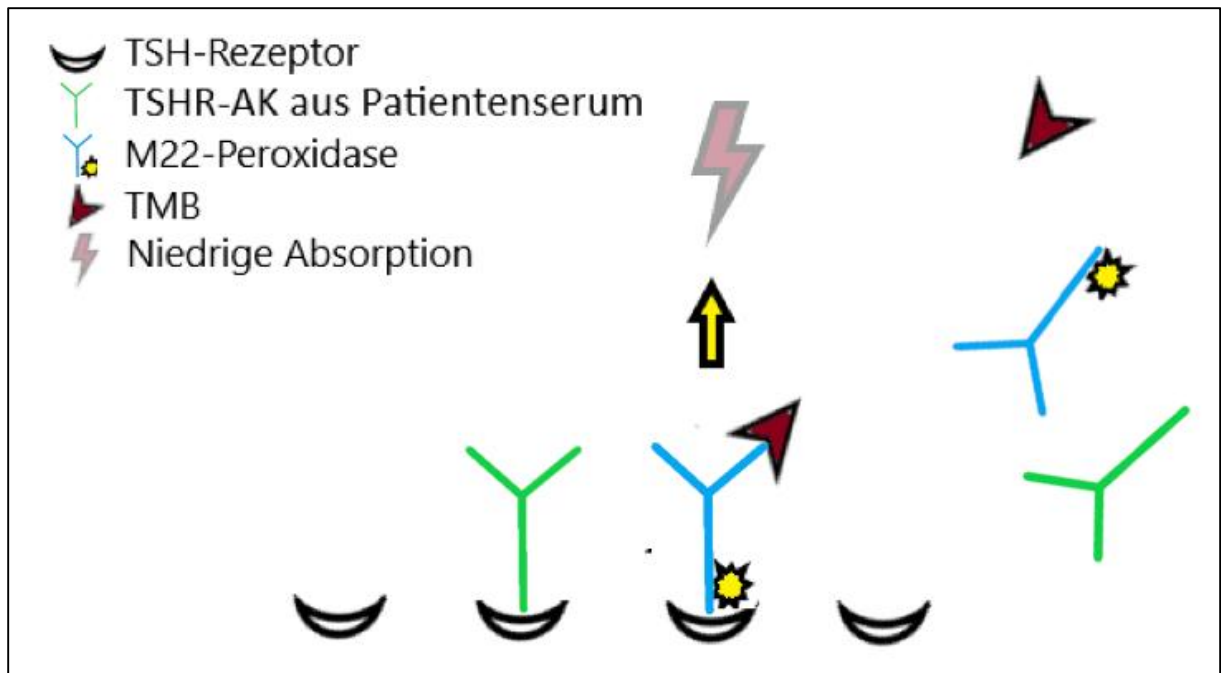


Abbildung 5: Der Kronus ELISA Assay

#### 3.4.2.2 Der Dynex DS2 ELISA Assay

Mit dem Dynex DS2 ELISA Assay der Firma Tecomedical, Bünde, Deutschland werden TSHR-AK quantitativ nachgewiesen. Die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte sind mit porcinen TSH-Rezeptoren beschichtet, an die kompetitiv TSHR-AK aus Patientenserum oder Biotin-markiertes TSH binden. Enzymmarkiertes Streptavidin bindet an Biotin-markiertes TSH und eine Farbreaktion wird katalysiert. Je mehr TSHR-AK aus Patientenserum vorhanden sind, desto geringer ist die sich entwickelnde Farbintensität (76).

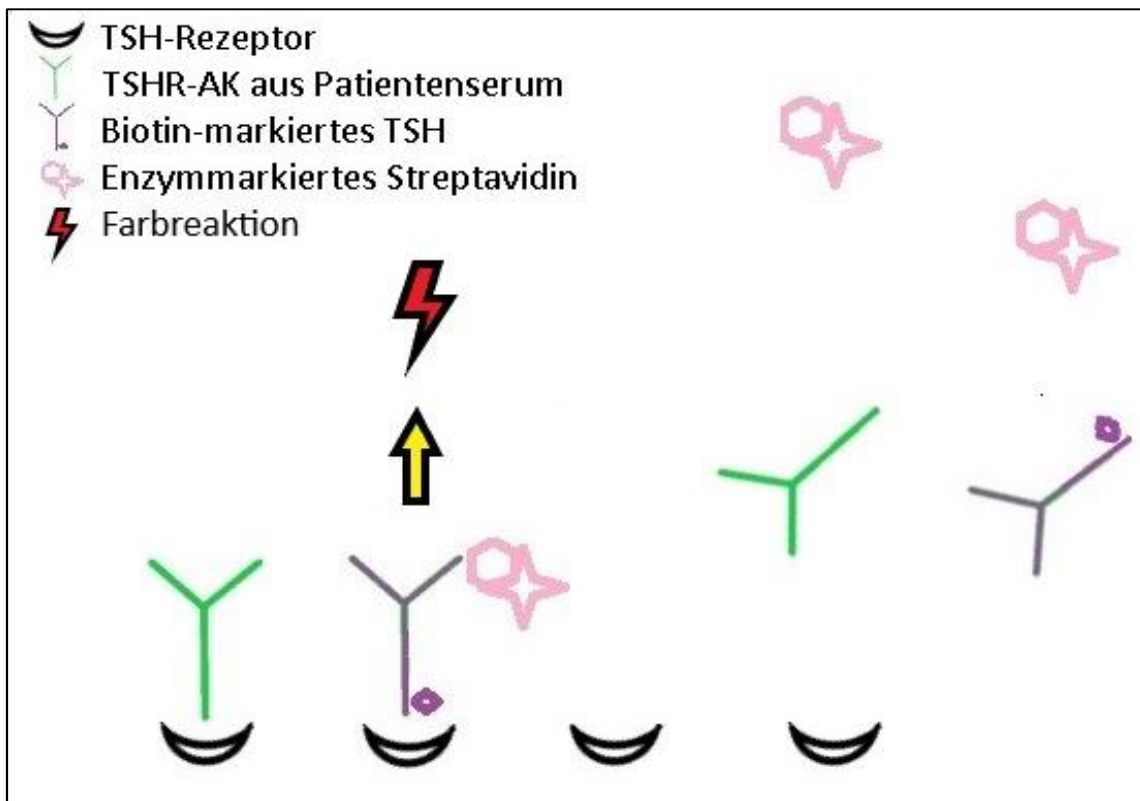


Abbildung 6: Der Dynex DS2 ELISA Assay

### 3.4.3 Die automatisierten Immunoassays

#### 1.4.3.1 Der Immulite 2000 Xpi Immunoassay

Der Immulite 2000 Xpi Immunoassay wird von der Firma Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland, hergestellt und ist der einzige der vier untersuchten Assays, der angibt, gezielt stimulierende Antikörper (TSI) nachweisen zu können. Laut einer Studie von Diana et al. von 2016 gelingt es Immulite jedoch nicht, TSI und TBI zuverlässig voneinander zu unterscheiden, sodass Immulite als klassischer Bindungsimmunoassay gesehen werden kann (46).

Der Antikörpernachweis in diesem Chemilumineszenz-Immunoassay erfolgt über eine Brücken-Technologie zwischen Bindungs- und Signalrezeptor mit TSI. TSI aus der Patientenprobe bindet an den Bindungsrezeptor. Komplextiertes TSI bindet mit seinem freien Arm an den mit alkalischer Phosphatase markierten Signalrezeptor und bildet somit eine Brücke zwischen den Rezeptoren. Das zugegebene Chemilumineszenzsubstrat erzeugt ein Signal, das proportional zur TSI-Menge in der Probe ist (69, 77).

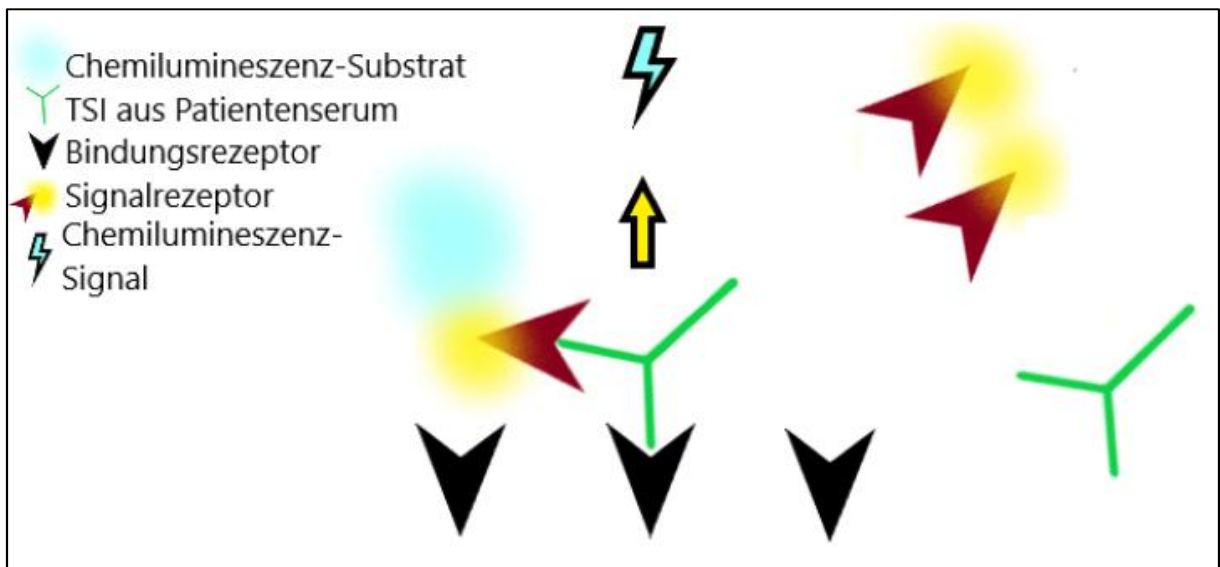


Abbildung 7: Der Immulite 2000 Xpi Immunoassay

#### 1.4.3.2 Der BRAHMS TRAK human Kryptor Immunoassay

Der BRAHMS TRAK human Kryptor Immunofluoreszenzassay wird von der Firma Thermo Scientific, Henningsdorf, Deutschland gefertigt. Er zeichnet sich durch die Time-Resolved Amplified Cryptate Emission (TRACE)-Technologie aus, die auf einem Energietransfer zwischen Donor und Akzeptor beruht.

- Akzeptor: Komplex aus humanem TSH-Rezeptor mit monoklonalem Antikörper (22A), gekoppelt an fluoreszierenden Akzeptor
- Donor: Monoklonaler Maus-TSI (mAB9), gekoppelt an fluoreszierenden Donor

In Abwesenheit von Patienten-TSHR-AK bindet der Donor-Komplex an den Akzeptor-Komplex. Nach Bestrahlung der Probe mit einem Stickstofflaser wird ein emittiertes Fluoreszenzsignal amplifiziert und verlängert. Sind TSHR-AK vorhanden, konkurrieren diese mit dem Donor-Komplex kompetitiv um die noch freie Bindungsstelle am Akzeptorkomplex. Je mehr TSHR-AK binden, desto weniger wird das Fluoreszenzsignal amplifiziert und verlängert. Somit ist dieses Signal umgekehrt proportional zur TSHR-AK-Konzentration der Patienten (78).

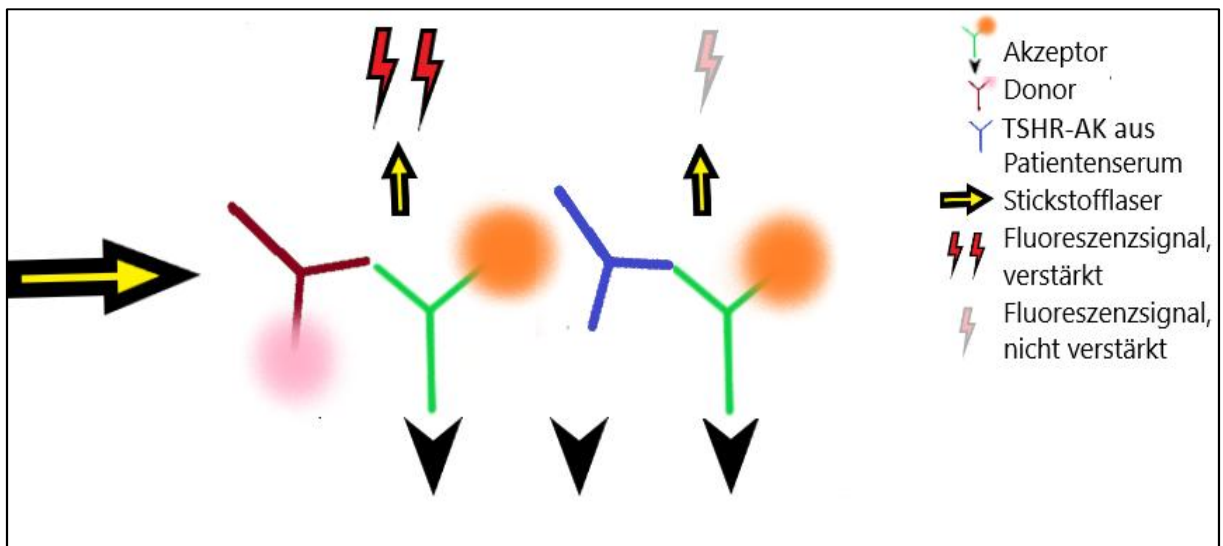


Abbildung 8: Der BRAHMS TRAK human Kryptor Immunoassay

### 3.5 Statistische Methoden

Die statistischen Berechnungen erfolgten mittels SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp mit Unterstützung des Instituts für medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik der Universitätsmedizin Mainz (IMBEI).

Die statistische Signifikanz der Sensitivitätsunterschiede zwischen den Assays wurde mittels Cochran's Q Test untersucht. Hierfür verwendeten wir die Messwerte für unverdünntes Serum, da die Assay-spezifischen Sensitivitäten nur für unverdünnte Proben gelten.

Um die Signifikanzunterschiede zwischen den Positivitätsraten der einzelnen Assays über die Verdünnungsreihen zu bestimmen (globale Sensitivität), wurde der Friedman-Test für verbundene Stichproben und paarweise Vergleiche verwendet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Vergleich der qualitativen Performance der Assays

Die Unterschiede in der qualitativen Performance der Assays zeigen sich im Vergleich der TSHR-AK-positiv detektierten Proben in den verschiedenen Verdünnungen. Als positiv gelten all jene Proben, die über dem vom Hersteller festgelegten Cut-off-Wert liegen.

Table 5: Assays und Cut-off-Werte

Assay	Cut-off
Kronus	< 1 IU/L
Immulate	< 0,55 IU/L
Kryptor	< 1,8 IU/L
Dynex DS2	< 2 U/L

Folgendes Diagramm zeigt jenen Anteil an den insgesamt 30 Proben, der in der jeweiligen Verdünnung vom jeweiligen Assay als positiv detektiert wird.

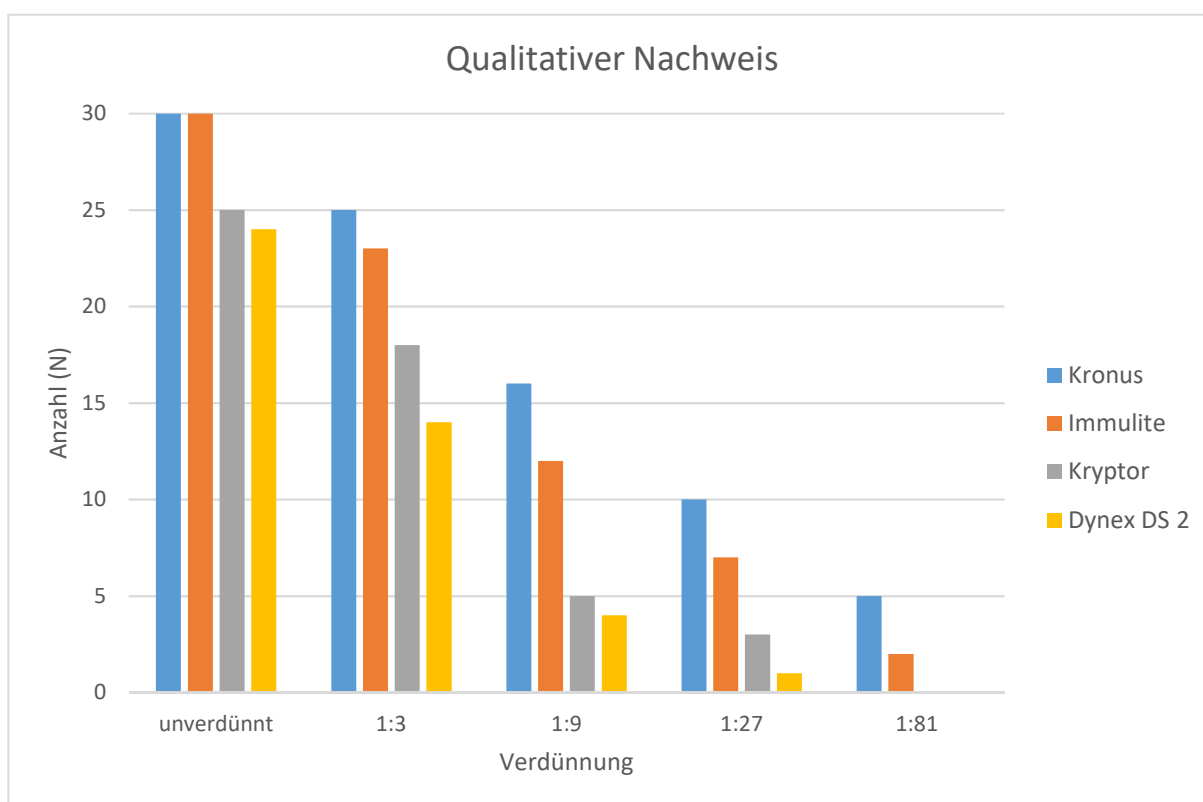


Abbildung 9: Qualitativer Nachweis der TSHR-AK

Tabelle 6: Wertetabelle zu Abb.9

	Positive Proben (N)			
	Kronus	Immulate	Kryptor	Dynex DS2
unverdünnt	30	30	25	24
1:3	25	23	18	14
1:9	16	12	5	4
1:27	10	7	3	1
1:81	5	2	0	0

## 4.2 Vergleich der Sensitivität der Assays

Die Sensitivität eines Assays entspricht der relativen Anzahl (%) der als richtig positiv detektierten unverdünnten Serumproben. Je sensitiver ein Assay, desto mehr in Wahrheit Kranke werden auch als krank erkannt.

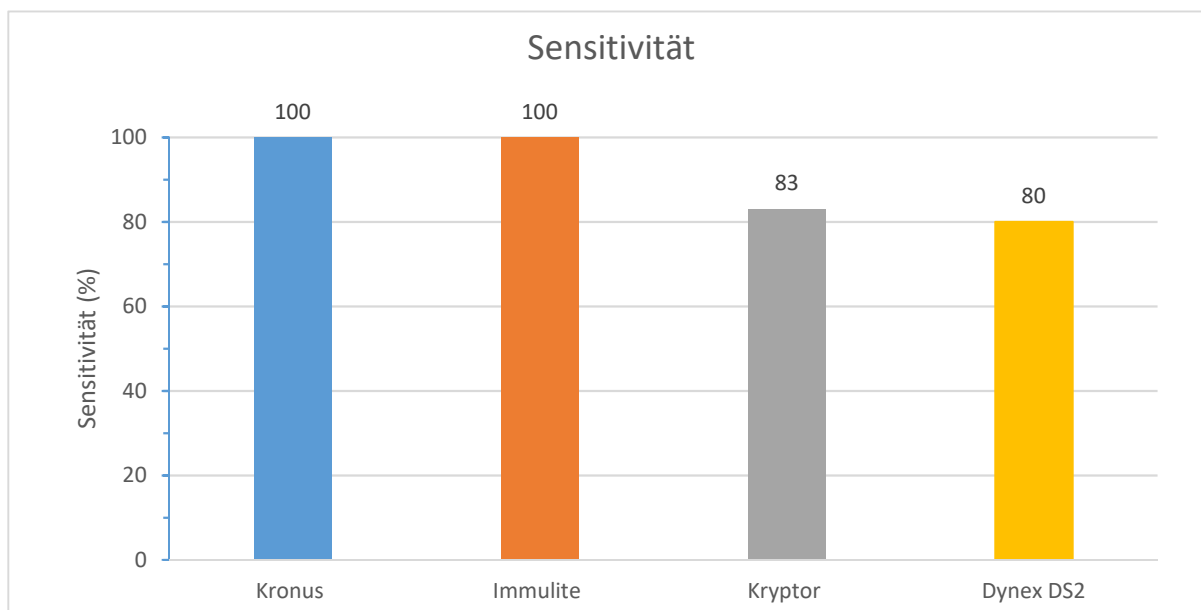


Abbildung 10: Vergleich der Sensitivitäten der Assays

Tabelle 7: Wertetabelle zu Abb. 10

	Kronus	Immulate	Kryptor	Dynex DS2
Sensitivität (%)	100	100	83	80



#### 4.2.1 Statistischer Vergleich der Sensitivitäten der Assays

Im Vergleich der Sensitivitäten wird ersichtlich, dass es deutliche Unterschiede zwischen den Assays gibt. Um diese Unterschiede auf statistische Signifikanz zu prüfen, wird eine statistische Testung in Zusammenarbeit mit dem IMBEI durchgeführt.

Als Nullhypothese ( $H^0$ ) wird angenommen, dass zwischen den Assays kein signifikanter Sensitivitätsunterschied in der TSHR-AK-Detektion in unverdünntem Serum besteht und folglich, dass die einzelnen Positivitätsraten keinen signifikanten Unterschied aufweisen.

Die Alternativhypothese ( $H^1$ ) hingegen geht von einem signifikanten Sensitivitätsunterschied, und folglich von einem signifikanten Unterschied in den Positivitätsraten zwischen den Assays aus.

$$H^0: \mu_{Kronus} = \mu_{Immulate} = \mu_{Kryptor} = \mu_{Dynex}$$

$$H^1: \mu_{Kronus} \neq \mu_{Immulate} \neq \mu_{Kryptor} \neq \mu_{Dynex}$$

Die Nullhypothese wird zum Signifikanzniveau  $\alpha$  von 5 % verworfen.

$$\alpha = 0,05$$

Als Einflussgröße oder unabhängige Variable wird der *Assaytyp* festgelegt. Es handelt sich um eine kategoriale, nominale Variable mit vier Ausprägungen: Kronus, Immulate, Kryptor, Dynex.

Als Zielgröße oder abhängige Variable wird der positive (1) oder negative (0) *TSHR-AK-Nachweis* festgelegt. Es handelt sich um eine binäre, kategoriale Variable.

Die Stichprobengröße entspricht  $N=30$  Serumproben.

Weitere Eigenschaften:

- Es besteht keine Normalverteilung zwischen den Werten, sodass ein nicht parametrischer Test angewandt werden muss.
- Die Testung erfolgt zweiseitig, da vor Testung unklar ist, ob ein signifikanter Unterschied zwischen den Assays besteht und falls ja, in welche Richtung.
- Es handelt sich um eine verbundene Stichprobe, da in jedem Assay und in jedem Verdünnungsschritt dieselben Patientenproben gemessen wurden.

Für diese statistische Fragestellung eignet sich der Cochran's Q Test am besten. Es handelt sich um einen nicht parametrischen Test für binäre Variablen.

#### 4.2.1.1 Ergebnisse des Cochran's Q Test

Tabelle 8: Deskriptive Statistik zur Sensitivität der Assays

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
Kronus	30	1,00	1,00	1,0000	,00000
Dynex	30	,00	1,00	,8000	,40684
Immulite	30	1,00	1,00	1,0000	,00000
Kryptor	30	,00	1,00	,8333	,37905
Gültige Werte (Listenweise)	30				

Tabelle 9: Post Hoc Tests für Cochran's Q Test

Stichprobe1-Stichprobe2	Test-statistik	Std. Fehler	Standard Test-statistik	Sig.	Angep. Sig.
Dynex-Kryptor	-,033	,071	-,471	,637	1,000
Dynex-Kronus	,200	,071	2,828	,005	,028
Dynex-Immulite	-,200	,071	-2,828	,005	,028
Kryptor-Kronus	,167	,071	2,357	,018	,111
Kryptor-Immulite	,167	,071	2,357	,018	,111
Kronus-Immulite	,000	,071	,000	1,000	1,000

Jede Zeile testet die Nullhypothese, dass die Verteilungen von Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind.  
 Asymptotische Signifikanzen (2-seitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.  
 Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.

Der Cochran's Q Test ergibt, dass sowohl Kronus, als auch Immulite TSHR-AK signifikant besser detektieren als Dynex.

#### 4.2.2 Vergleich der Sensitivitäten mit den Herstellerangaben

Folgende Tabelle zeigt den Vergleich unserer Studie mit den Herstellerangaben bezüglich der klinischen Sensitivität in unverdünnten Proben:

Tabelle 10: Vergleich der klinischen Sensitivitäten unserer Studie mit Herstellerangaben

	Sensitivität laut Studie (%)	Sensitivität laut Hersteller (%)
Kronus	100	85
Immulite	100	98,3
Kryptor	83,33	96,3
Dynex	80	98

### 4.3 Vergleich der globalen Sensitivität der Assays

Wir definieren die globale Sensitivität eines Assays als die Sensitivität über alle Verdünnungsschritte von 1:1 bis 1:81. Im Unterschied zur herkömmlichen Sensitivität eines Assays berücksichtigt sie nicht nur den Nachweis in unverdünntem Serum.

Folgendes Diagramm zeigt die globale Sensitivität der Assays:

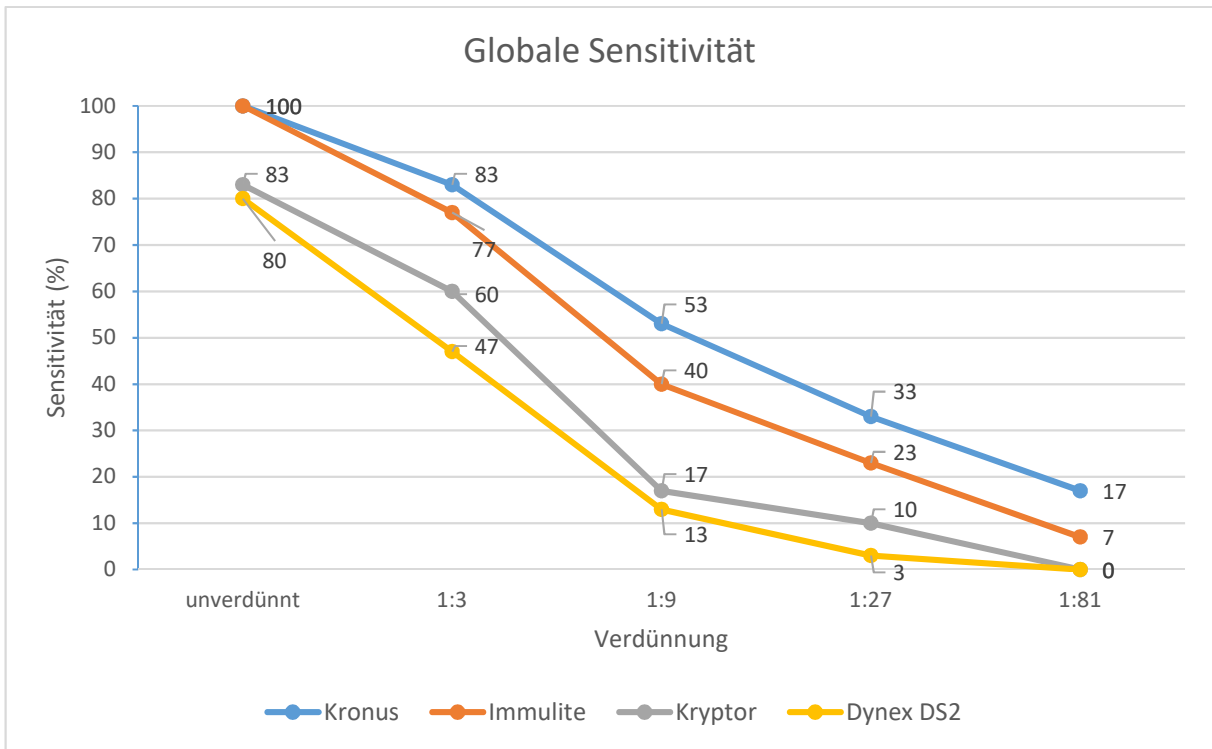


Abbildung 11: Globale Sensitivität der Assays über alle Verdünnungsschritte

Die globale Sensitivität hängt vom TSHR-AK-Titer und vom Assay-Typ ab. Sie nimmt mit steigender Verdünnung und daraus folgend sinkendem TSHR-AK-Titer in allen Assays ab. In Patienten mit bereits im Bioassay gemessenen niedrigen TSI-Titern zeigt sich diese Sensitivitätsabnahme besonders deutlich, wie die folgenden drei Diagramme zeigen. Die Wertetabellen sind im Anhang aufgelistet.

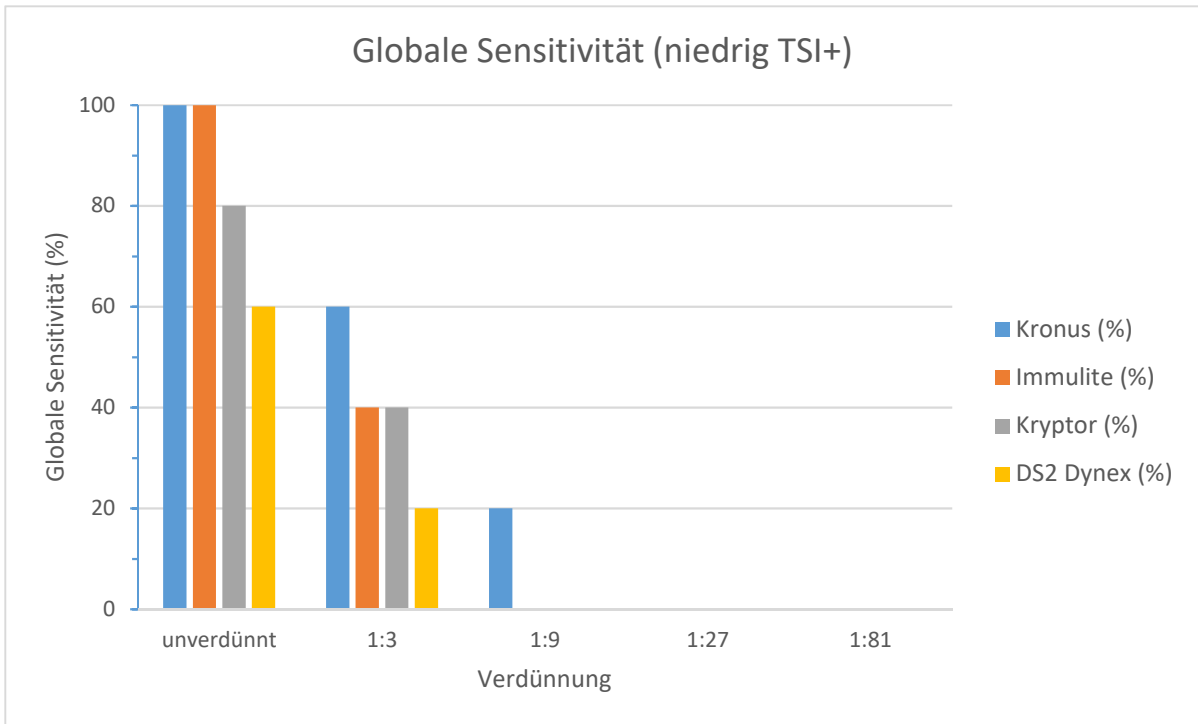


Abbildung 12: Globale Sensitivität der im Bioassay als niedrig TSI positiv gemessenen Proben

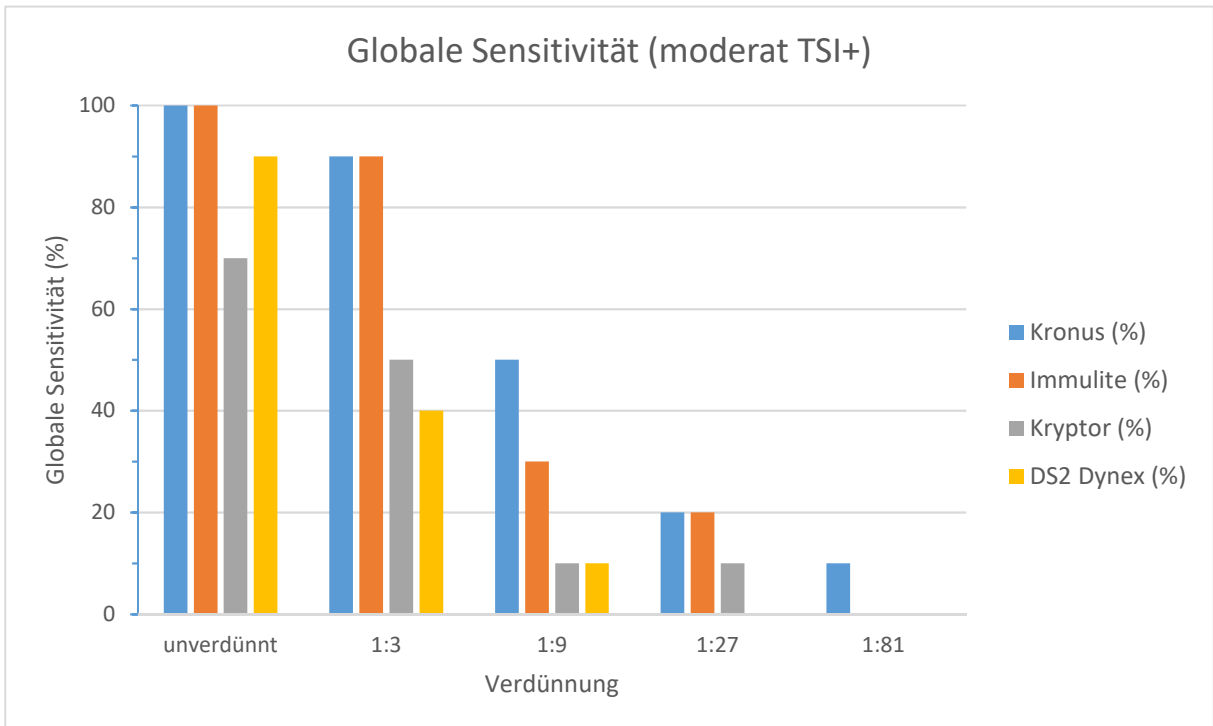


Abbildung 13: Globale Sensitivität der im Bioassay als moderat TSI positiv gemessenen Proben

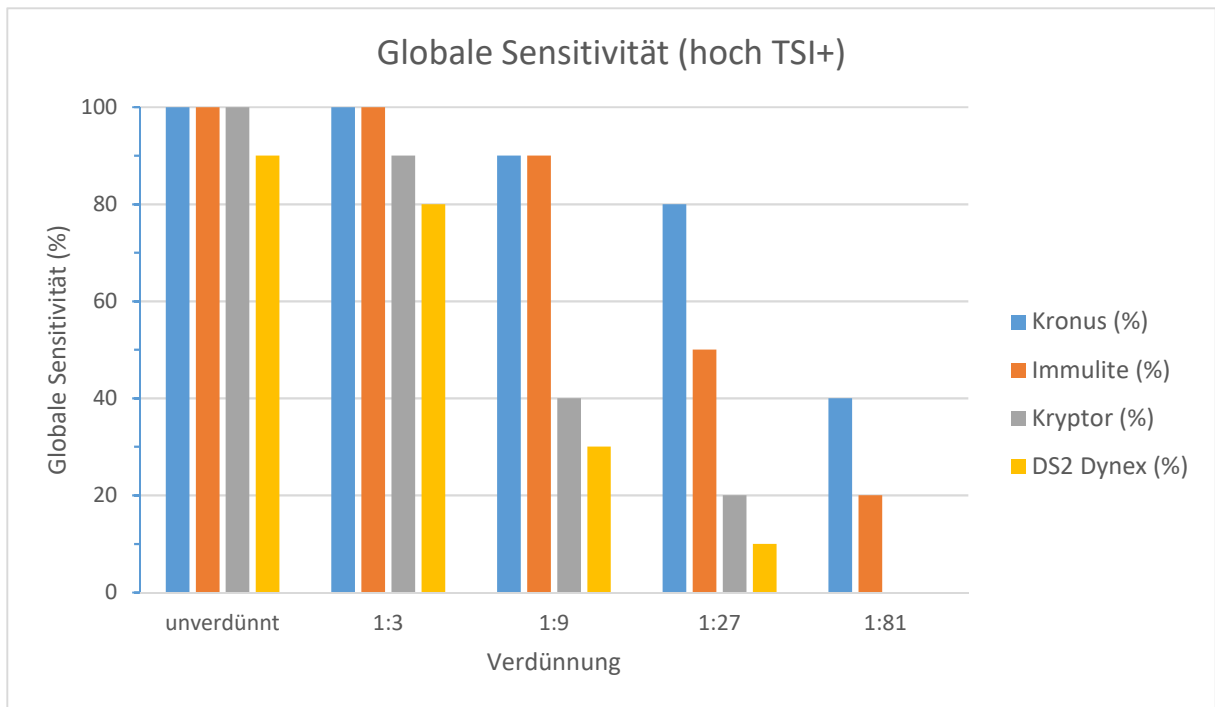


Abbildung 14: Globale Sensitivität der im Bioassay als hoch TSI positiv gemessenen Proben

Die Diagramme zeigen, dass die Globale Sensitivität der hoch TSI positiven Proben über alle Assays am höchsten ist.

Außerdem wird ersichtlich, dass Kronus die höchsten Positivitätsraten in allen Patientengruppen hat. Darauf folgen zuerst Immulite, dann Kryptor und zuletzt Dynex. Diese Reihenfolge ist immer zutreffend, außer in unverdünnten moderat TSI-positiven Proben. Hier detektiert Dynex 20 % mehr Proben im Vergleich zu Kryptor.

Folgendes Diagramm zeigt den gerundeten Mittelwert der globalen Sensitivität aller Assays zusammen im jeweiligen Verdünnungsschritt. Je größer die Konzentration an TSHR-AK, und folglich je weniger verdünnt die Probe, desto sensitiver sind die Assays.

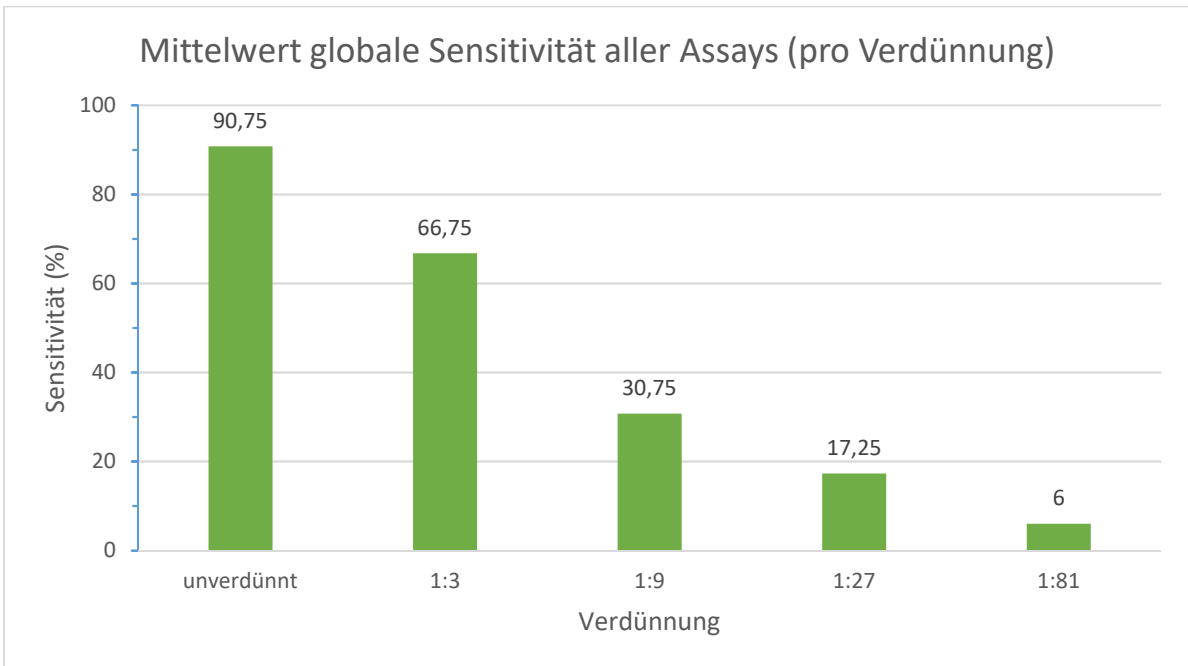


Abbildung 15: Gerundete Mittelwerte der globalen Sensitivität der Assays pro Verdünnungsschritt

Folgendes Diagramm zeigt den globalen Sensitivitäts-Mittelwert für jeden Assay. Hier wird ersichtlich, dass der Kronus-Assay im Mittel die höchsten TSHR-AK-Positivraten hat. Besonders deutlich zeigt sich der Sensitivitätsunterschied mit einer Differenz von 28,6 % zwischen Dynex und Kronus.

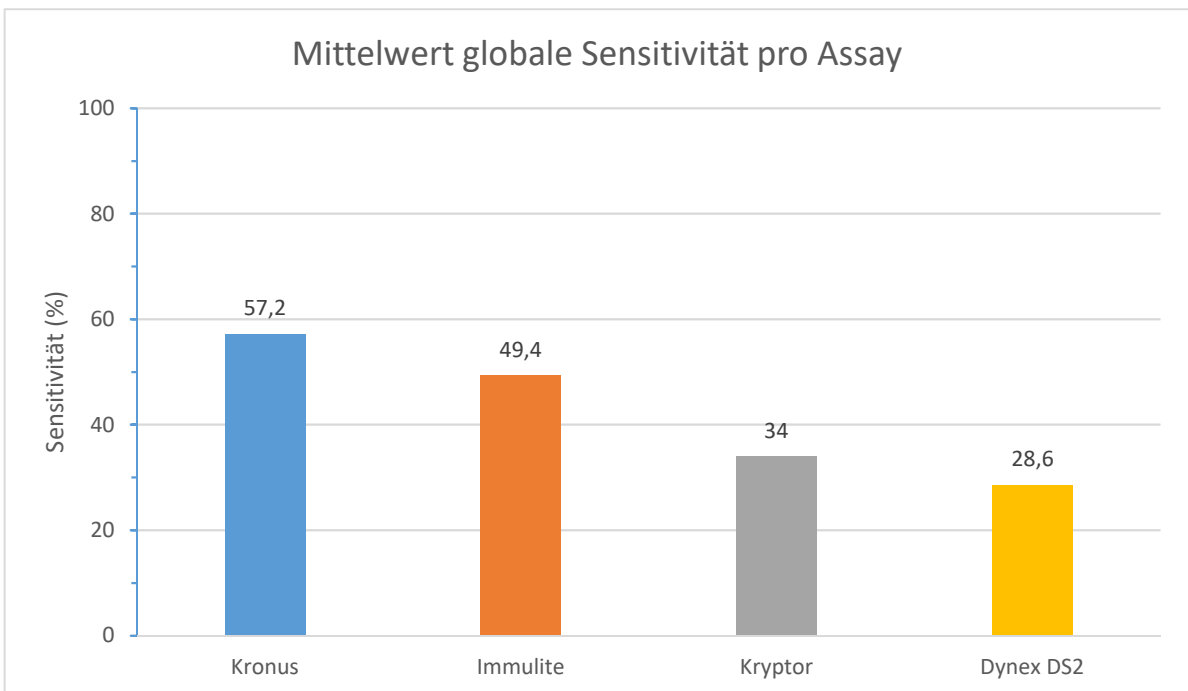


Abbildung 16: Gerundete Mittelwerte der globalen Sensitivität pro Assay

Tabelle 11: Gerundete globale Sensitivitäten pro Assay und Verdünnung (Wertetabelle zu Abb. 11, 15 und 16)

	Globale Sensitivität				
	Kronus (%)	Immulate (%)	Kryptor (%)	Dynex DS2 (%)	Mittelwert (pro Verdünnung) (%)
unverdünnt	100	100	83	80	90,75
1:3	83	77	60	47	66,75
1:9	53	40	17	13	30,75
1:27	33	23	10	3	17,25
1:81	17	7	0	0	6
Mittelwert (pro Test) (%)	57,2	49,4	34	28,6	

#### 4.3.1 Statistischer Vergleich der globalen Sensitivität der Assays

Im Vergleich der globalen Sensitivitäten der Assays detektiert der Kronus Assay sowohl absolut die meisten Serumproben, als auch am längsten über die Verdünnungsreihe als TSHR-AK positiv. Es stellt sich die Frage, ob der Detektionsunterschied zwischen den Assays statistisch signifikant ist. In Zusammenarbeit mit dem IMBEI wird eine statistische Testung durchgeführt.

Als Nullhypothese ( $H^0$ ) wird angenommen, dass zwischen den Assays kein signifikanter globaler Sensitivitätsunterschied in der TSHR-AK-Detektion über unverdünntes Serum und alle weiteren Verdünnungsstufen besteht. Dies bedeutet, dass die einzelnen Positivitätsraten in unverdünntem Serum sowie in den jeweiligen Verdünnungsschritten keinen signifikanten Unterschied aufweisen.

Die Alternativhypothese ( $H^1$ ) hingegen geht von einem signifikanten globalen Sensitivitätsunterschied, und folglich von einem signifikanten Unterschied in den Positivitätsraten in der TSHR-AK-Detektion zwischen den Assays aus.

$$H^0: \mu_{\text{Kronus}} = \mu_{\text{Immulate}} = \mu_{\text{Kryptor}} = \mu_{\text{Dynex}}$$

$$H^1: \mu_{\text{Kronus}} \neq \mu_{\text{Immulate}} \neq \mu_{\text{Kryptor}} \neq \mu_{\text{Dynex}}$$

Die Nullhypothese wird zum Signifikanzniveau  $\alpha$  von 5 % verworfen.

$$\alpha = 0,05$$

Als Einflussgröße oder unabhängige Variable wird der Assaytyp festgelegt. Es handelt sich um eine kategoriale, nominale Variable mit vier Ausprägungen: Kronus, Immulate, Kryptor, Dynex.

Als Zielgröße oder abhängige Variable wird die *Anzahl der TSHR-AK-positiven Serumproben für jeden Patienten*, aufgeschlüsselt auf die Assays, festgelegt (N=0-5). Es handelt sich um eine metrische Variable.

Die Stichprobengröße entspricht N=30 Serumproben.

Die weiteren Eigenschaften entsprechen jenen des Vergleichs der herkömmlichen Sensitivität.

Der statistische Test wird auf Basis der oben genannten Faktoren ausgewählt. Am besten eignet sich der Friedman-Test, der mehr als zwei verbundene, mindestens ordinalskalierte Stichproben miteinander vergleicht.

#### 4.3.1.1 Ergebnisse des Friedman-Tests

Tabelle 12: Deskriptive Statistik zur Globalen Sensitivität der Assays

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Kronus	30	2,8667	1,35782	1,00	5,00	2,0000	3,0000	4,0000
Immulate	30	2,4667	1,22428	1,00	5,00	1,7500	2,0000	3,2500
Kryptor	30	1,7000	1,14921	,00	4,00	1,0000	2,0000	2,0000
Dynex	30	1,4333	1,04000	,00	4,00	1,0000	1,0000	2,0000

Tabelle 13: Post Hoc Tests des Friedman-Test

Stichprobe1-Stichprobe2	Test-statistik	Std. Fehler	Standard Test-statistik	Sig.	Angep. Sig.
Dynex-Kryptor	,467	,333	1,400	,162	,969
Dynex-Immulate	1,600	,333	4,800	,000	,000
Dynex-Kronus	2,067	,333	6,200	,000	,000
Kryptor-Immulate	1,133	,333	3,400	,001	,004
Kryptor-Kronus	1,600	,333	4,800	,000	,000
Immulate-Kronus	,467	,333	1,400	,162	,969

Jede Zeile testet die Nullhypothese, dass die Verteilungen von Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind.

Asymptotische Signifikanzen (2-seitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.

Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.

Es zeigen sich signifikante Unterschiede von Dynex zu Kronus und Immulate, sowie von Kryptor zu Kronus und Immulate.



#### 4.4 Vergleich der quantitativen Performance der Assays

Im Boxplot sind die TSHR-AK- Messwerte der Assays für alle Serumproben in IU/L (außer Dynex in U/L) über alle Verdünnungsstufen aufgetragen. Eine Wertetabelle dazu ist im Anhang aufgelistet.

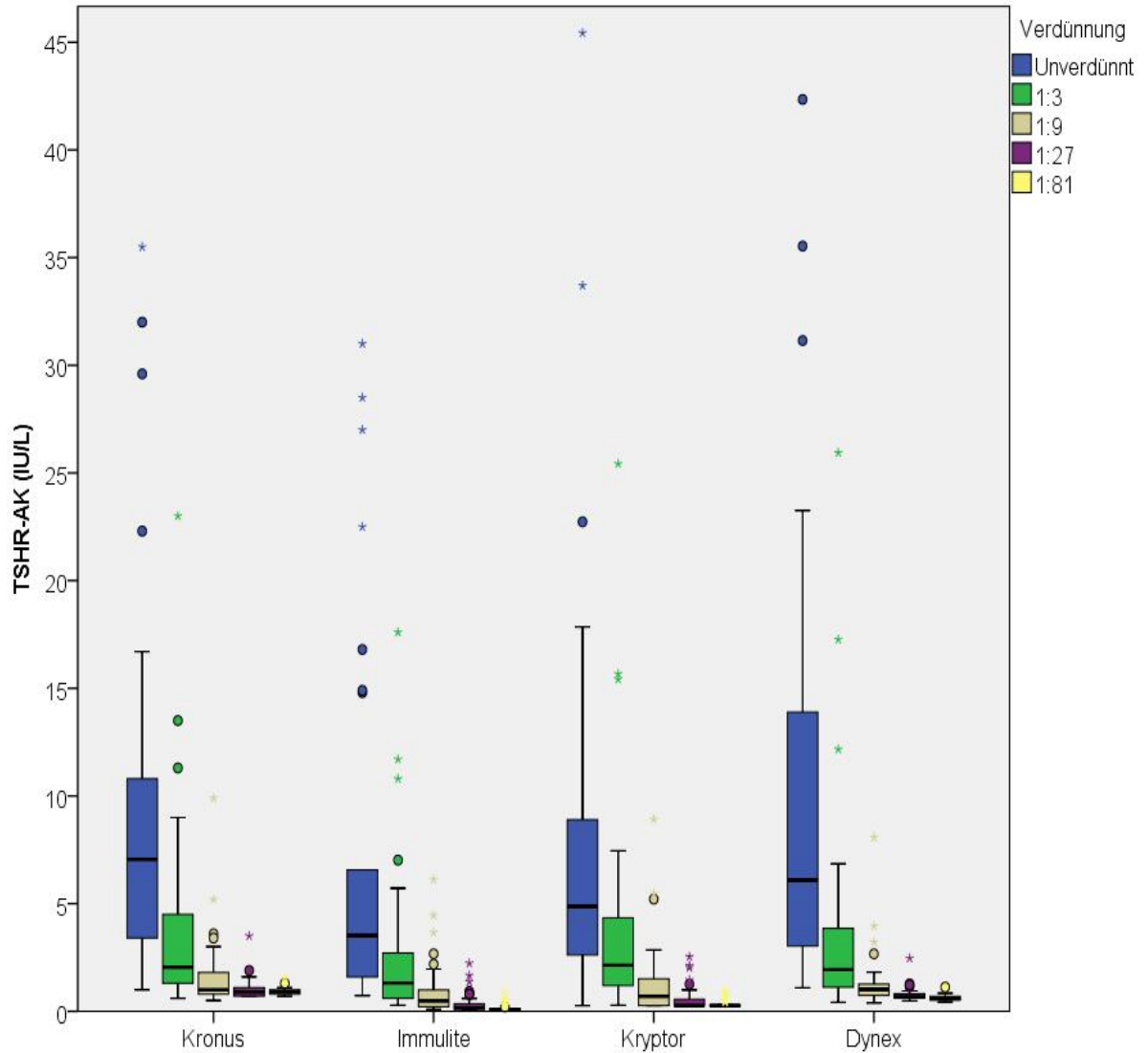


Abbildung 17: Boxplot: Vergleich der quantitativen Performance der Assays über alle Verdünnungsstufen

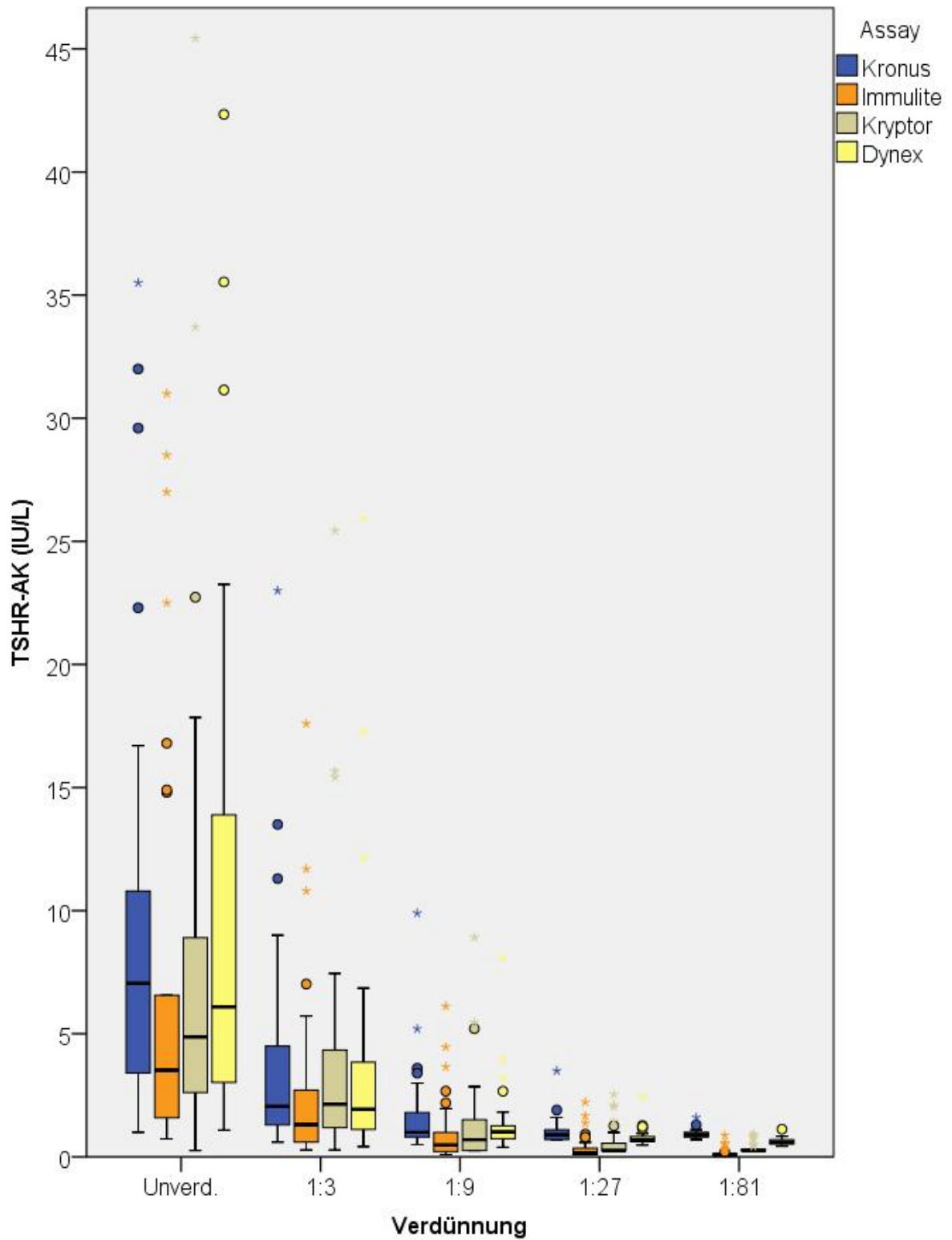


Abbildung 18: Boxplot: Vergleich der Verdünnungsstufen zwischen den Assays

#### 4.4.1 Zwei Beispiele: Quantitativer TSHR-AK-Nachweis

Vergleichend dargestellt wird im Folgenden der quantitative TSHR-AK-Nachweis zwischen einer sehr hoch positiven und einer sehr niedrig positiven Probe. Das Textfeld „unter cut-off“ und der schwarze Pfeil markieren den Verdünnungsschritt, ab welchem der nachgewiesene Wert unter dem cut-off liegt und somit als negativ gesehen wird. Die rote Linie in der Wertetabelle zeigt die cut-off-Grenze an.

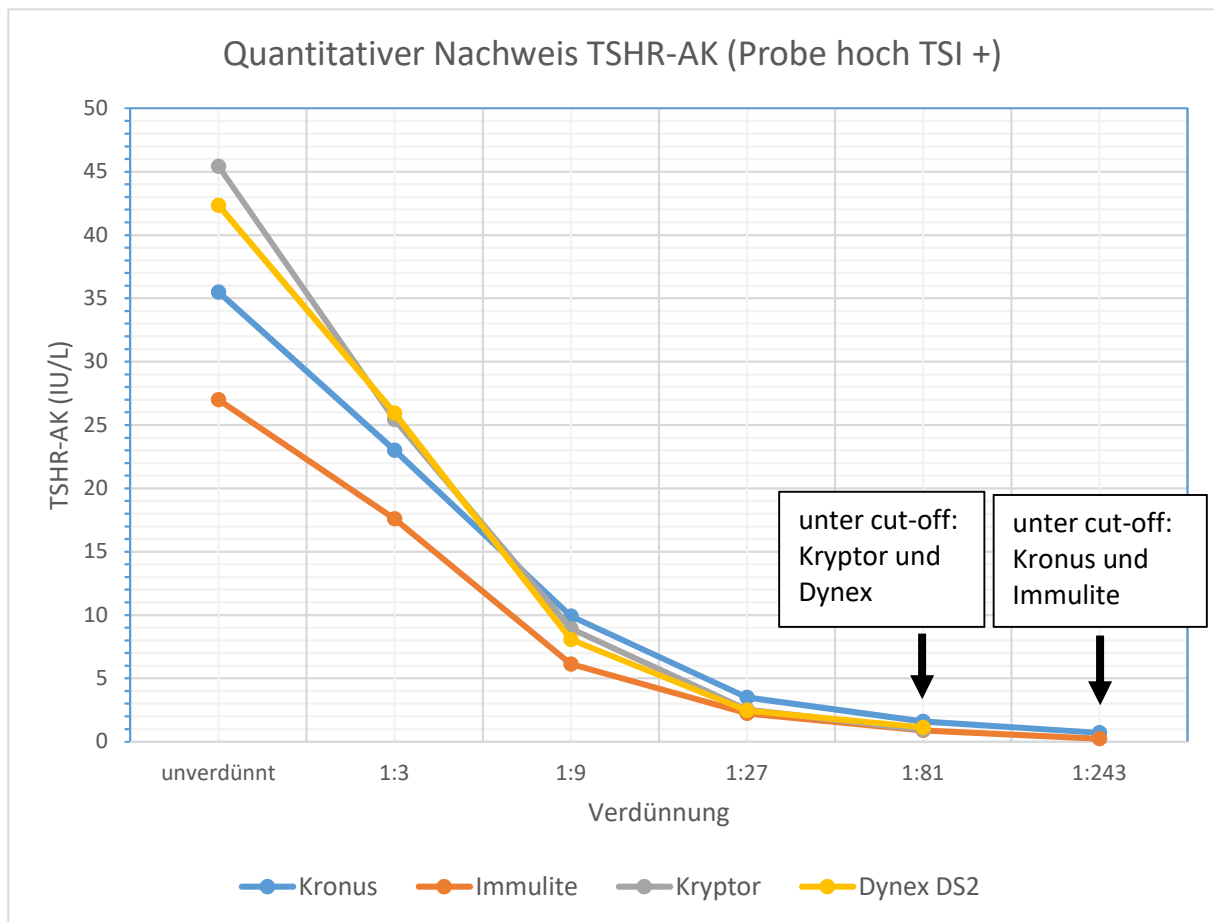


Abbildung 19: Vergleich: Quantitativer TSHR-AK-Nachweis einer sehr hoch positiven Probe in allen Assays

Tabelle 14: Wertetabelle zu Abb. 19

	Kronus (IU/L)	Immulite (IU/L)	Kryptor (IU/L)	Dynex DS2 (U/L)
unverdünt	35,5	27	45,43	42,343
1:3	23	17,6	25,43	25,935
1:9	9,9	6,12	8,914	8,078
1:27	3,5	2,23	2,537	2,463
1:81	1,6	0,877	0,94	1,124
1:243	0,7	0,239		

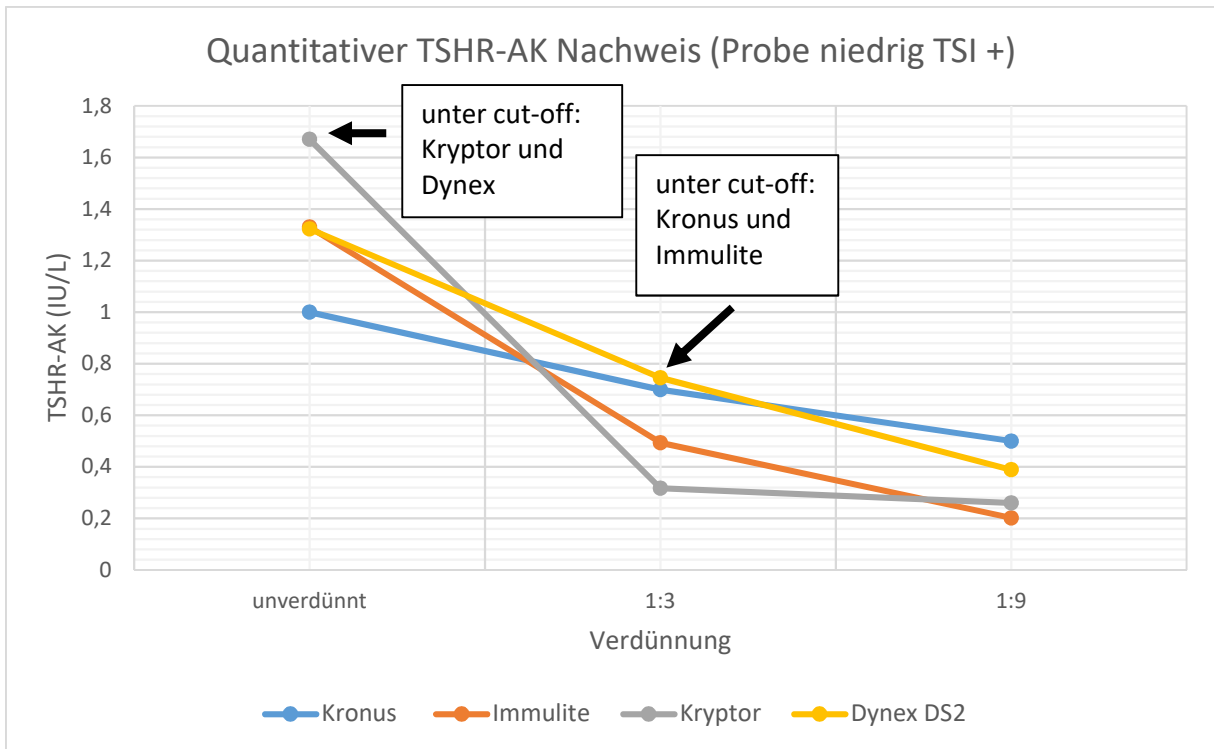


Abbildung 20: Vergleich: Quantitativer TSHR-AK-Nachweis einer sehr niedrig positiven Probe in allen Assays

Tabelle 15: Wertetabelle zu Abb. 20

	Kronus (IU/L)	Immulite (IU/L)	Kryptor(IU/L)	Dynex DS2 (U/L)
unverdünnt	1	1,33	1,67	1,323
1:3	0,7	0,494	0,3177	0,745
1:9	0,5	0,202	0,26	0,389

Der Vergleich der TSHR-AK-Titer in beiden Proben zeigt, dass Dynex DS2 und Kryptor tendenziell initial einen hohen Wert messen, dann jedoch schneller negativ werden als Kronus und Immulite.

## 5 Ergebnisdiskussion

### 5.1 Ziel der Arbeit

Stimulierende TSHR-AK sind pathognomonisch für den M. Basedow und in vielen Indikationen äußerst sinnvoll. Im Folgenden werden die Forschungsergebnisse zu den beiden Fragestellungen dieser Arbeit diskutiert:

- 1) Vergleich der Sensitivität der vier Immunoassays
- 2) Vergleich der globalen Sensitivität der vier Immunoassays in der Verdünnungsreihe

### 5.2 Nutzen der Verdünnungsreihe

Viele Studien, die Assays miteinander vergleichen, arbeiten mit unverdünnten Proben, in denen Antikörper bestimmt werden (46, 79, 80). Dies ist natürlich zielführend, da argumentiert werden kann, dass die Patientenproben normalerweise nicht verdünnt werden, bevor sie in einem Assay bestimmt werden. So detektieren in unserer Studie fast alle Assays die im Bioassay TSI-hoch positiven Proben als TSHR-AK-positiv.

Das Problem stellt sich jedoch, sobald eine geringe Antikörperkonzentration vorliegt. Dies ist im Fall von Basedow-Patienten beispielsweise denkbar in einem frühen Krankheitsstadium, nach oder während Therapie, in einer euthyreoten Variante der Endokrinen Orbitopathie oder in klinisch uneindeutigen Fällen (81). Gerade diese Situationen sind jedoch wichtige Indikationen für den TSHR-AK-Nachweis. Hier ergibt sich der Bedarf an Assays, die Antikörper auch in geringen Konzentrationen, beispielsweise in Konzentrationen, die nur leicht über dem cut-off liegen, nachweisen.

Um diese geringen Analytkonzentrationen mit einer gewissen Genauigkeit zu erstellen und zu reproduzieren, ist die Verdünnungsreihe ein wichtiges Hilfsmittel. Die Performance eines Assays kann über die einzelnen Verdünnungsstufen hinweg untersucht und mit anderen verglichen werden.

Außerdem kann die „Aktivität“ der Antikörper eines Serums für den Einzelfall bestimmt und verglichen werden. Eine hohe Serumaktivität wird hier definiert als die Fähigkeit eines TSHR-AK-positiven Serums, trotz zunehmender Verdünnung weiterhin als positiv erkannt zu werden. Damit hängt auch ein langsames oder schnelleres Sinken des TSHR-AK-Spiegels zusammen. So gibt es Seren, die trotz

Verdünnung und initial nicht außerordentlich hohem TSHR-AK-Titer länger positiv bleiben als andere Seren mit initial vergleichsweise höherem TSHR-AK-Titer. Die Gründe für diese unterschiedliche Aktivität und ihre klinische Relevanz sollten in weiteren Studien erforscht werden.

Ein Nachteil von Verdünnungsreihen ist, dass es zu fehlerhaften Verdünnungen kommen kann und somit die Performance eines Assays, sowie die Aktivität eines Serums fälschlicherweise über- oder unterschätzt werden kann. Diese Fehler können einerseits zufällig auftreten und durch menschliches oder technisches Versagen bedingt sein. Andererseits können sie systematisch auftreten, beispielsweise durch eine defekte Pipette. Durch große Achtsamkeit, wie sie vom gesamten Team in der Versuchsdurchführung praktiziert wurde, können relevante systematische und zufällige Fehler weitgehend reduziert werden.

Im Allgemeinen muss jedoch angenommen werden, dass sich alle Verdünnungen, die dieselben Konzentrationen an TSHR-AK enthalten sollen, minimal voneinander unterscheiden.

Weitere Arbeiten mit Verdünnungsreihen wurden beispielsweise von Rees Smith et al. durchgeführt. Wie in der Literatordiskussion schon erwähnt, entwickelten Rees Smith et al. den ersten manuellen M22-Biotin-basierten 3G-ELISA-Assay (Sensitivität 95 %) und verglichen ihn mit einem TSH-Biotin-basierten 2G-ELISA-Assay (Sensitivität 89 %) (43). Sie fertigten Verdünnungsreihen von Präparationen mit Standardmengen von TSHR-AK an, um diese dann im Assay zu untersuchen. Der neu entwickelte Assay wurde von Kamijo et al. ebenfalls untersucht, jedoch ohne Verdünnungsreihen, und es resultierte eine Sensitivität von 99,6 % (82).

### 5.3 Vergleich der Immunoassays

Für die klinische Praxis ist die exakte Angabe der Sensitivität eines Messinstruments von großer Bedeutung. Die Sensitivität hilft, ein Messergebnis adäquat einzuschätzen und als Entscheidungshilfe zu nutzen, sowie die Plausibilität zu prüfen. Unsere Studie leistet einen Beitrag dazu und untersucht darüber hinaus die globale Sensitivität in Verdünnungsreihen.

Wie eingangs bereits erwähnt, finden sich vor Beginn dieser Arbeit im Sommer 2016 in unserer Literaturrecherche keine Arbeiten, welche die hier untersuchten Immunoassays miteinander vergleichen. Außerdem gibt es sehr wenige

Assayvergleiche in Verdünnungsreihen. Die Literaturrecherche wurde selektiv mit MEDLINE durchgeführt und von einer Referenzrecherche ergänzt.

In unserer Studie untersuchten wir zwei 3G-Assays (Kronus ELISA und Kryptor), einen Brückenassay (Immulite), sowie einen 2G-Assay (Dynex ELISA).

Für den statistischen Vergleich der Assays ergeben sich zwei Möglichkeiten:

1. Vergleich von absoluten Messwerten der TSHR-AK-Titer in IU/L zwischen den Assays
2. Vergleich von positivem oder negativem TSHR-AK-Nachweis und von Sensitivitäten zwischen den Assays

Die erste Möglichkeit erscheint sehr genau, da exakte Messwerte miteinander verglichen werden können. Dies kann in Zusammenschau mit Vorbefunden beispielsweise bei der Evaluation des Therapieerfolgs oder als EO-Prädiktor von Nutzen sein.

Wie jedoch besonders die beispielhaften Vergleiche von zwei Patientenproben im Ergebnisteil zeigen, misst jeder Assay in derselben Patientenprobe unterschiedliche Werte in IU/L bzw. der Dynex Assay in U/L. Außerdem unterscheiden sich die cut-offs, ab denen eine Probe als positiv gilt. Somit sind die absoluten Messwerte zwischen den einzelnen Assays schlecht vergleichbar. Es ist daher ratsam, ausschließlich Proben miteinander zu vergleichen, die im selben Assay untersucht wurden.

Außerdem ist für viele klinische Fragestellungen nicht der absolute Messwert relevant, sondern die Frage, ob der TSHR-AK-Nachweis positiv oder negativ ist und die Sensitivität eines Assays.

Die genannten Gründe zeigen, dass sich die erste Möglichkeit in unserer Studie nicht für einen statistischen Vergleich eignet. Es wurden diesbezüglich jedoch im Ergebnisteil dieser Arbeit Boxplots angefertigt und die Messwerte von zwei Serumproben exemplarisch verglichen.

Somit wurde die zweite Möglichkeit auf statistisch signifikante Unterschiede getestet: Es erfolgte ein Vergleich der herkömmlichen, sowie der globalen Sensitivität der Assays.

### 5.3.1 Stichprobe

Die Basedow-Patienten (N=30) wurden so ausgewählt, dass jeweils zehn davon im Bioassay als hoch, mittel und niedrig positiv gemessen wurden. Dies sollte eine gleichmäßige Verteilung der TSHR-AK-Werte ermöglichen und die Studie somit repräsentativer machen. Dies ist auch gelungen, jedoch wurde damit auf eine zufällige Probenauswahl verzichtet und das Risiko eines Selektions-Bias in Kauf genommen.

Insgesamt ergeben sich 150 Werte (30 Proben x 5 Verdünnungen), die in Positiv oder Negativ eingeteilt werden können, was einer angemessenen Stichprobengröße entspricht. Es ergeben sich jedoch nicht 150 TSHR-AK-Messwerte in IU/L, da wir Proben, die schon vor der 1:81 Verdünnung negativ waren, in den höheren Verdünnungen meist nicht weiter untersuchten. In diesen Fällen gingen wir davon aus, dass die darauffolgenden Verdünnungen ebenfalls negativ sein mussten. Dies kann eine Fehlerquelle sein, falls eine frühe Verdünnung fälschlicherweise negativ war.

Unsere Stichprobe enthält mehr Frauen als Männer, was der realen Verteilung des M. Basedow entspricht.

Um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den Patienten herzustellen, wurden nur unbehandelte Patienten in unsere Studie eingeschlossen, da sich die medikamentöse Therapie auf den TSHR-AK-Titer auswirkt.

### 5.3.2 Studiendesign

Das Studiendesign ist retrospektiv, da schon vorhandene, tiefgefrorene Serumproben von Basedow-Patienten untersucht wurden.

### 5.3.3 Unsere Studienergebnisse

#### 5.3.3.1 Vergleich der Sensitivität

Kronus und Immulite erzielen die höchste Sensitivität (100 %). Darauf folgt zunächst Kryptor (83,33 %) und dann Dynex (80 %).

Kronus und Immulite detektieren signifikant sensitiver als Dynex (beide  $p=0,028$ ).

#### 5.3.3.2 Vergleich der globalen Sensitivität

Insgesamt erzielt Kronus die höchsten Positivitätsraten über die Verdünnungsreihen, dann folgen in absteigender Reihenfolge Immulite, Kryptor und Dynex.



Kronus und Immulite detektieren signifikant sensitiver als Dynex (beide  $p=0,000$ ) und ebenso als Kryptor (Kronus:  $p=0,000$  und Immulite:  $p=0,004$ ).

### 5.3.3.3 Vergleich der quantitativen Performance

Der quantitative Vergleich der Assays zeigt einen Abfall der Antikörperkonzentration der Proben über die Verdünnungsreihen. Interessanterweise unterscheiden sich die gemessenen Antikörperspiegel zwischen den Assays teils erheblich.

Im Boxplot und im Vergleich der Beispieleren fällt auf, dass Dynex unverdünnt eine größere Spannbreite und teilweise höhere Werte misst als die anderen Assays. In der Verdünnungsreihe nimmt die Spannbreite, sowie die Höhe der Werte, schnell ab. Trotz der hohen Anfangswerte ist die Sensitivität vergleichsweise schlecht.

Kryptor misst, wie aus dem Vergleich der Beispieleren ersichtlich, ebenfalls hohe Anfangswerte, was keine Sensitivitätsverbesserung zur Folge hat.

Die Messwerte des Kronus fallen tendenziell langsamer ab als die Messwerte der anderen Assays.

Die gemessenen Werte des Immulite sind im Vergleich zu den anderen Assays niedriger und weisen eine geringere Spannbreite auf. Nichtsdestotrotz ist die Sensitivität sehr gut.

Es ist kritisch anzumerken, dass die Aussagekraft der Boxplots aufgrund fehlender Messwerte eingeschränkt sein kann. Wie bereits erwähnt, wurde jedes Serum nämlich zuerst unverdünnt, dann in den weiteren Verdünnungsstufen von jedem Assay mindestens solange untersucht, bis das Ergebnis TSHR-AK-negativ wurde. Dies hat zur Folge, dass einige Messwerte fehlen. Für die fehlenden Werte wurden leere Felder in die Wertetabelle im Anhang eingetragen.

### 5.3.4 Unsere Studie im Vergleich zu Herstellerangaben und Literatur

Die Ergebnisse bezüglich klinischer Sensitivität unserer Studie unterscheiden sich teils erheblich zu den Herstellerangaben. So ergab unsere Studie eine deutlich größere Sensitivität des m3G-Kronus Assays (100 vs. 85 %) und einen geringen Unterschied in der Sensitivität des Immulite Assays mit Brückentechnologie (100 vs 98,3 %). Die Sensitivitäten des a3G-Kryptor Assays (83,33 vs. 96,3 %) und des 2G-Dynex Assays (80 vs. 98 %) fielen deutlich schlechter aus als vom Hersteller angegeben.

#### 5.3.4.1 *Der m3G Kronus ELISA Assay*

Die Sensitivität des Kronus Assays ist in unserer Studie mit 100 % etwas höher als die von Tozzoli et al. in einer Metaanalyse ermittelte gepoolte Sensitivität für m3G-Assays (97 %) (40). Da eine 100%-ige Sensitivität aus Plausibilitätsgründen fast ausgeschlossen ist, liegt unser Ergebnis wahrscheinlich an einer zu kleinen Stichprobe.

Ein deutlicher Sensitivitätsunterschied ist im Vergleich mit den Herstellerangaben (85 %) zu finden. Auch dies könnte daran liegen, dass unsere Stichprobe mit N=30 Serumproben deutlich kleiner ausfiel, als die N=261 vom Hersteller untersuchten Serumproben. Außerdem untersuchte der Hersteller neben gesunden Kontrollen auch Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen oder anderen Schilddrüsenerkrankungen. Es könnte sein, dass hier Interferenzen auftraten, die in unserer Studie fehlen.

Die sehr gute Performance in der globalen Sensitivität in höheren Verdünnungen und in niedrig-TSI-positiven Proben spricht dafür, dass die an die Mikrotiterplatten gebundenen TSHR die Antikörper auch in kleinen Konzentrationen gut binden und dass auch der darauffolgende Nachweis mittels M22, Peroxidase und TMB adäquat funktioniert.

#### 5.3.4.2 *Der Brückenassay Immulite TSI*

Der Hersteller des Immulite Assays untersuchte insgesamt N=236 an M. Basedow erkrankte, teils behandelte, teils unbehandelte Patienten und kam auf ein ähnliches Ergebnis bezüglich klinischer Sensitivität.

Mehrere Studien von verschiedenen Forscherteams wurden zur Brückentechnologie des Immulite (auch nach Beginn unserer Arbeit) durchgeführt (47, 70, 80, 83-87). Die meisten Studien ergaben eine Sensitivität von mindestens 94 % in unbehandelten Basedow-Patienten. Nur Allelein et al. fanden 2019 eine Sensitivität von 84,1 % in 151 GD-Patienten (84). Kemble et al. spezifizierten die Sensitivität nicht genau (87). Keine der in der Literaturrecherche gefundenen Studien konnte beweisen, dass der Immulite Assay nicht nur in der zweifellos vielversprechenden Theorie, sondern auch in der Praxis zwischen TSI und TBI unterscheiden kann.

#### 5.3.4.3 Der 2G-Dynex ELISA Assay

Die Sensitivität des Dynex-Assays ist mit 80 % deutlich geringer als die von Tozzoli et al. in einer Metaanalyse ermittelte gepoolte Sensitivität von 97,1 % für alle 2G-Assays (40).

Der Unterschied zur Herstellerangabe ist ebenfalls deutlich. Der Hersteller basiert die angegebene Sensitivität von 98 % auf eine Stichprobe von N=50 Proben. Er detektierte davon 49 positiv und eine im Graubereich.

Das abweichende Ergebnis unserer Studie könnte daran liegen, dass wir einen Anteil von 10 Patienten (33 %) mit im Bioassay nur gering erhöhten TSHR-AK-Werten hatten. Aus diesen niedrig positiven Patientenproben erkannte Dynex nämlich bereits vier unverdünnte Proben fälschlicherweise als TSHR-AK-negativ. Von den restlichen zwei negativ detektierten Proben war eine Probe vom Bioassay als moderat positiv und eine als hoch positiv eingeteilt. In der 1:9-Verdünnung wurde keine der niedrig positiven Proben und nur eine der moderat positiven Proben als positiv erkannt. Somit zeigt unsere Studie eine niedrige Sensitivität des Dynex Assays besonders im niedrig-positiven Bereich.

Ein Grund dafür könnte die Beschichtung der Mikrotiterplatten mit porcinen TSHR sein, die wahrscheinlich im Vergleich zu beispielsweise humanen TSHR eine geringere Bindungsaffinität aufweisen. Diese Eigenschaft wirkt sich besonders bei schwach positiven Proben auf den Nachweis aus.

Zweifellos spielt der im Vergleich zu den anderen Assays relativ hoch angesetzte cut-off von 2 U/L eine Rolle in der schlechten Performance.

Interessant ist die Tatsache, dass der Dynex Assay für unverdünnte Proben, wenn er sie als positiv erkennt, hohe TSHR-AK-Werte misst, dann jedoch tendenziell schneller abfällt als die anderen Assays.

Trotz der genannten Gründe verwundert das deutlich schlechtere Ergebnis dieses ELISA Assays im Vergleich zum Kronus ELISA Assay und im Vergleich zu Herstellerangaben.

Eine ausführliche Literaturrecherche ergab keine Studien, in denen der Dynex Assay untersucht wurde.

#### 5.3.4.4 Der a3G-Kryptor Assay

Die Sensitivität des Kryptor Assays ist mit 83,3 % deutlich tiefer als die von Tozzoli et al. in einer Metaanalyse ermittelte gepoolte Sensitivität für a3G-Assays allgemein (97,6 %) (40). Auch zu den Herstellerangaben, der die Sensitivität an N=295 unbehandelten Basedow-Patienten untersuchte, ist der Unterschied groß.

Hier ergibt sich die Frage, ob der Sensitivitätsunterschied unserer Studie der deutlich kleineren Stichprobengröße geschuldet war. Es zeigte sich eine eingeschränkte Performance im Bereich mit niedrigen TSHR-AK-Titern. Drei der im Bioassay moderat positiven und zwei der niedrig positiven Proben wurden vom Kryptor Assay als negativ detektiert. Eine der Proben (Pat. 15) war dabei so niedrig, dass es sich auch um einen Mess- oder Verdünnungsfehler handeln könnte. In der 1:9-Verdünnung waren nur noch fünf Proben positiv (davon keine niedrig, eine moderat und vier hoch positive Proben).

Wie bereits im Dynex Assay, könnte die schlechte Performance im niedrigen Bereich auch dem hohen cut-off von 1,8 IU/L geschuldet sein. Außerdem scheint die Bindung der TSHR-AK an den Akzeptorkomplex nicht immer zu funktionieren, was sich besonders in schwach positiven Proben zeigt.

Eine Studie von Struja et al. mit insgesamt 332 Patienten ergab für den Kryptor-Assay eine Sensitivität von 86,7 %, was ähnlich ist zu unserer Sensitivität von 83,33 % (80).

#### 5.4 Kritik an der Studie und Ideen für neue Studien

Die Stichprobengröße von 30 Patientenproben ist angemessen. Nichtsdestotrotz wäre unsere Studie mit einer größeren Stichprobe noch aussagekräftiger. Außerdem wären auch anzweifelbare Ergebnisse, wie Sensitivitäten von 100 %, dadurch wahrscheinlich zu vermeiden gewesen.

Ein retrospektives, und somit nicht randomisiertes Design ist im Vergleich zu randomisierten, kontrollierten Studien (RCTs), anfällig für Verzerrungen im Allgemeinen, besonders für den Selektionsbias.

Ein großer Nachteil unserer Studie ist das Fehlen einer gesunden oder anders (nicht an M. Basedow) erkrankten Kontrollgruppe. Diese wäre nötig gewesen, um die Spezifität der Nachweisemethoden zu bestimmen. In einer künftigen Studie sollte die Sensitivität und Spezifität der Assays im Vergleich zu gesunden Probanden bestimmt

werden. Außerdem wäre es interessant zu untersuchen, ob es den Assays gelingt, Basedow-Patienten von Patienten mit anderen Schilddrüsenerkrankungen (z.B. Erkrankte an Hashimoto Thyreoiditis, Schilddrüsenautonomen usw.) oder anderen Autoimmunerkrankungen (z.B. Systemischer Lupus erythematoses) zu unterscheiden.

Das Messen der TSHR-AK erfolgte für den Dynex Assay in U/L, für die anderen Assays hingegen in IU/L. Die Vergleichbarkeit zwischen den absoluten Zahlenwerten der Assays ist dadurch nur eingeschränkt möglich.

Ein weiterer Kritikpunkt unserer Studie ist, dass nur Patienten der Mainzer Universitätsmedizin untersucht wurden. Hier könnten regionale Besonderheiten zu einem geographischen Bias geführt haben.

In unserer Studie war jedes unverdünnte Patientenserum in mindestens einem Assay TSHR-AK positiv. Dies könnte zum Schluss führen, dass TSHR-AK in allen Basedow-Patienten vorkommen. Von manchen Autoren wird jedoch beschrieben, dass es jedoch Basedow-Patienten ohne TSHR-AK, sogenannte seronegative Patienten, gibt (88, 89).

Vos et al. untersuchten nämlich im Jahr 2008 in einer prospektiven Observationsstudie 259 unbehandelte Patienten mit unabhängig vom TSHR-AK-Spiegel diagnostiziertem M. Basedow. Sie führten die Studie mit einem 2G-Assay durch und erzielten in 5,4 % der Patienten einen negativen TSHR-AK-Nachweis. Diese seronegativen Patienten hatten im Allgemeinen eine geringere klinische, sowie biochemische Ausprägung der Erkrankung, unterschieden sich ansonsten jedoch nicht signifikant bezüglich demographischer Daten von der seropositiven Gruppe. Für die Seronegativität könnte es unterschiedliche Gründe geben:

- Falsch gestellte Diagnose (unwahrscheinlich)
- Geringe Sensitivität des 2G-Assays
- Von Schilddrüse und Lymphknoten gebildete TSHR-AK, die noch nicht ins Blut übergetreten sind
- M. Basedow mit unterschiedlicher Pathogenese als bisher bekannt (88).

Es war keine Zielsetzung unserer Studie, die Gründe für diese Seronegativität zu untersuchen, da ausschließlich Patienten mit positivem TSI-Nachweis im Bioassay in unsere Studie aufgenommen wurden. Somit waren seronegative Patienten von vornherein ausgeschlossen. Aus unserer Studie lässt sich folglich keine sichere

Aussage über das Vorhandensein von TSHR-AK in der Gesamtheit der Basedow-Population treffen. Es sollte jedoch zur besseren Ursachenforschung eine prospektive Observationsstudie mit einem 3G-Assay oder einem Bioassay erfolgen.

Eine interessante Fragestellung, die den Rahmen dieser Dissertation sprengt, wäre, den Einfluss der Höhe des TSHR-AK-Titers auf die klinische Symptomatik zu untersuchen.

## 6 Zusammenfassung

**Einleitung:** Der Morbus Basedow ist eine Autoimmunerkrankung der Schilddrüse, die durch stimulierende Autoantikörper gegen den Thyreotropin-Rezeptor (TSHR) ausgelöst wird. Diese Thyreoidea-stimulierenden Antikörper (TSI) gehören zur Gruppe der TSH-Rezeptor-Antikörper (TSHR-AK) und führen zu einer Hyperthyreose mit den klinischen Symptomen eines gesteigerten Grundumsatzes. Hierzu zählen beispielsweise Tachykardie, vermehrtes Schwitzen, Gewichtsverlust und psychomotorische Unruhe. Es können außerdem extrathyreoidale Manifestationsformen auftreten, wie die Augenbeteiligung als Endokrine Orbitopathie. Als ursächlich für die Erkrankung wird eine genetische Prädisposition mit Umweltfaktoren als Auslöser vermutet. Frauen sind von der Erkrankung häufiger betroffen als Männer.

**Ziel der Arbeit:** Der TSHR-AK Nachweis kann im Immunoassay oder im Bioassay erfolgen und ist für Basedow-Patienten in vielen Indikationen sinnvoll. Dazu zählen hauptsächlich die Diagnostik, die Prognoseprädiktion und Verlaufskontrolle, die Überwachung von schwangeren Patientinnen, sowie die Entscheidungshilfe in der optimalen Therapiewahl.

Aus den genannten Indikationen ergibt sich die große klinische Relevanz einer sensitiven, zeit- und kosteneffizienten Nachweismethode. Dies führte zu den Zielstellungen dieser Promotionsarbeit:

- 1) Vergleich der Sensitivität von vier Immunoassays (Kronus, Immulite, Kryptor, Dynex DS2)
- 2) Vergleich der globalen Sensitivität der vier Immunoassays über die Verdünnungsreihe

**Material und Methoden:** Die TSHR-AK-Serumspiegel (in IU/L und Dynex: U/L) von 30 unbehandelten, an M. Basedow erkrankten Patienten, wurden retrospektiv in zwei ELISA-Immunoassays (Kronus und Dynex) und zwei automatisierten Bindungsimmuoassays (Immulite und Kryptor) untersucht.

Um ein ausgewogenes Kollektiv zu erhalten, erfolgte die Einteilung und Auswahl der Patienten anhand des in einem Bioassay gemessenen TSI-Werts:

- 10 niedrig TSI+ Patienten (ein cut-off über der Positivitätsgrenze)
- 10 moderat TSI+ Patienten (zwei cut-offs über der Positivitätsgrenze)
- 10 hoch TSI+ Patienten (ab drei cut-offs über der Positivitätsgrenze)

Alle Patientenserumproben wurden jeweils in Dreierschritten verdünnt: 1:3, 1:9, 1:27, 1:81 und ggf. 1:243. Jedes Serum wurde zuerst unverdünnt, dann in den weiteren Verdünnungsstufen von jedem Assay mindestens so lange untersucht, bis das Ergebnis TSHR-AK-negativ wurde.

Die statistische Auswertung erfolgte für die erste Zielstellung mittels Cochran's Q-Test und für die zweite Fragestellung mittels Friedman-Test.

## **Ergebnisse und Diskussion:**

### **1) Vergleich der Sensitivität:**

Insgesamt erzielen Kronus und Immulite die höchste Sensitivität (100 %). Darauf folgt zunächst Kryptor (83,33 %) und dann Dynex (80 %).

Kronus und Immulite detektieren signifikant sensitiver als Dynex (beide  $p=0,028$ ).

Im Vergleich zur vom Hersteller angegebenen Sensitivität zeigen sich teils erhebliche Unterschiede in unserer Studie. Kronus detektiert deutlich besser als vom Hersteller beschrieben (100 vs. 85 %). Kryptor und Dynex detektieren deutlich schlechter mit 83,33 % vs. 96,3 % und 80 % vs. 98 %. Die Angaben zu Immulite (98,3 %) sind mit unseren Studienergebnissen (100 %) gut vereinbar.

### **2) Vergleich der globalen Sensitivität:**

Kronus erzielt die höchsten Positivitätsraten über die Verdünnungsreihen, dann folgen in absteigender Reihenfolge Immulite, Kryptor und Dynex.

Kronus und Immulite detektieren signifikant sensitiver als Dynex (beide  $p=0,000$ ) und ebenso als Kryptor (Kronus:  $p=0,000$  und Immulite:  $p=0,004$ ).

Ein denkbarer Grund für die schlechteren Ergebnisse des Dynex und Kryptor könnte der im Vergleich zu den anderen Assays hohe cut-off-Wert, ab dem eine Probe als positiv gilt, sein.

### **3) Vergleich der quantitativen Performance:**

Im Vergleich zu den anderen Assays sind die gemessenen Werte des Immulite niedriger und weisen eine geringere Spannbreite auf. Nichtsdestotrotz ist die Sensitivität sehr gut.

**Schluss:** Wegen der exzellenten Performance und der guten Anwendbarkeit in unserer Studie bewerten wir Kronus und Immulite als geeignet für die klinische Praxis. Kryptor und Dynex sind aufgrund ihrer schlechteren Sensitivitätsergebnisse als nur eingeschränkt geeignet anzusehen. Die Ergebnisse sollten in einer größeren Stichprobe weiter verifiziert werden.



## 7 Literaturverzeichnis

1. Taylor S. Graves of Graves' disease, 1796-1853. *Journal of the Royal College of Physicians of London*. 1986;20(4):298-300.
2. Smith TJ, Hegedus L. Graves' Disease. *The New England journal of medicine*. 2016;375(16):1552-65.
3. Franklyn JA, Boelaert K. Thyrotoxicosis. *Lancet (London, England)*. 2012;379(9821):1155-66.
4. Burch HB, Cooper DS. Management of Graves Disease: A Review. *Jama*. 2015;314(23):2544-54.
5. Kahaly GJ, Bartalena L, Hegedus L, Leenhardt L, Poppe K, Pearce SH. 2018 European Thyroid Association Guideline for the Management of Graves' Hyperthyroidism. *European thyroid journal*. 2018;7(4):167-86.
6. Brent GA. Clinical practice. Graves' disease. *The New England journal of medicine*. 2008;358(24):2594-605.
7. Herold G. *Innere Medizin*. Köln: Herold, Gerd; 2016.
8. Boelaert K, Torlinska B, Holder RL, Franklyn JA. Older subjects with hyperthyroidism present with a paucity of symptoms and signs: a large cross-sectional study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010;95(6):2715-26.
9. Sundaresh V, Brito JP, Wang Z, Prokop LJ, Stan MN, Murad MH, et al. Comparative effectiveness of therapies for Graves' hyperthyroidism: a systematic review and network meta-analysis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2013;98(9):3671-7.
10. Abraham P, Avenell A, McGeoch SC, Clark LF, Bevan JS. Antithyroid drug regimen for treating Graves' hyperthyroidism. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2010(1):Cd003420.
11. Donovan PJ, McLeod DS, Little R, Gordon L. Cost-utility analysis comparing radioactive iodine, anti-thyroid drugs and total thyroidectomy for primary treatment of Graves' disease. *European journal of endocrinology*. 2016;175(6):595-603.
12. Li HX, Xiang N, Hu WK, Jiao XL. Relation between therapy options for Graves' disease and the course of Graves' ophthalmopathy: a systematic review and meta-analysis. *Journal of endocrinological investigation*. 2016;39(11):1225-33.
13. Abraham-Nordling M, Topping O, Hamberger B, Lundell G, Tallstedt L, Calissendorff J, et al. Graves' disease: a long-term quality-of-life follow up of patients randomized to treatment with antithyroid drugs, radioiodine, or surgery. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2005;15(11):1279-86.
14. Kotwal A, Stan M. Current and Future Treatments for Graves' Disease and Graves' Ophthalmopathy. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*. 2018;50(12):871-86.
15. Bahn RS, Dutton CM, Natt N, Joba W, Spitzweg C, Heufelder AE. Thyrotropin receptor expression in Graves' orbital adipose/connective tissues: potential autoantigen in Graves' ophthalmopathy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1998;83(3):998-1002.
16. Pastan I, Roth J, Macchia V. Binding of hormone to tissue: the first step in polypeptide hormone action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1966;56(6):1802-9.
17. Parmentier M, Libert F, Maenhaut C, Lefort A, Gerard C, Perret J, et al. Molecular cloning of the thyrotropin receptor. *Science (New York, NY)*. 1989;246(4937):1620-2.
18. Rapoport B, Chazenbalk GD, Jaume JC, McLachlan SM. The thyrotropin (TSH) receptor: interaction with TSH and autoantibodies. *Endocrine reviews*. 1998;19(6):673-716.
19. Morshed SA, Davies TF. Graves' Disease Mechanisms: The Role of Stimulating, Blocking, and Cleavage Region TSH Receptor Antibodies. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*. 2015;47(10):727-34.
20. Morshed SA, Latif R, Davies TF. Characterization of thyrotropin receptor antibody-induced signaling cascades. *Endocrinology*. 2009;150(1):519-29.
21. Adams DD. Abnormal responses in the assay of thyrotropin. *Proc Univ Otago Med School*. 1956;34:11-2.

22. Meek JC, Jones AE, Lewis UJ, Vanderlaan WP. CHARACTERIZATION OF THE LONG-ACTING THYROID STIMULATOR OF GRAVES' DISEASE. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1964;52:342-9.
23. Morshed SA, Ando T, Latif R, Davies TF. Neutral antibodies to the TSH receptor are present in Graves' disease and regulate selective signaling cascades. *Endocrinology*. 2010;151(11):5537-49.
24. Diana T, Krause J, Olivo PD, Konig J, Kanitz M, Decallonne B, et al. Prevalence and clinical relevance of thyroid stimulating hormone receptor-blocking antibodies in autoimmune thyroid disease. *Clinical and experimental immunology*. 2017;189(3):304-9.
25. Kahaly GJ, Diana T. TSH Receptor Antibody Functionality and Nomenclature. *Frontiers in endocrinology*. 2017;8:28.
26. Ajjan RA, Weetman AP. Techniques to quantify TSH receptor antibodies. *Nature clinical practice Endocrinology & metabolism*. 2008;4(8):461-8.
27. Schott M, Morgenthaler NG, Fritzen R, Feldkamp J, Willenberg HS, Scherbaum WA, et al. Levels of autoantibodies against human TSH receptor predict relapse of hyperthyroidism in Graves' disease. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 2004;36(2):92-6.
28. Cappelli C, Gandossi E, Castellano M, Pizzocaro C, Agosti B, Delbarba A, et al. Prognostic value of thyrotropin receptor antibodies (TRAb) in Graves' disease: a 120 months prospective study. *Endocrine journal*. 2007;54(5):713-20.
29. Vos XG, Endert E, Zwinderman AH, Tijssen JG, Wiersinga WM. Predicting the Risk of Recurrence Before the Start of Antithyroid Drug Therapy in Patients With Graves' Hyperthyroidism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2016;101(4):1381-9.
30. Struja T, Fehlberg H, Kutz A, Guebelin L, Degen C, Mueller B, et al. Can we predict relapse in Graves' disease? Results from a systematic review and meta-analysis. *European journal of endocrinology*. 2017;176(1):87-97.
31. Hesarghatta Shyamasunder A, Abraham P. Measuring TSH receptor antibody to influence treatment choices in Graves' disease. *Clinical endocrinology*. 2017;86(5):652-7.
32. Struja T, Kaeslin M, Boesiger F, Jutzi R, Imahorn N, Kutz A, et al. External validation of the GREAT score to predict relapse risk in Graves' disease: results from a multicenter, retrospective study with 741 patients. *European journal of endocrinology*. 2017;176(4):413-9.
33. Zimmerman D. Fetal and neonatal hyperthyroidism. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 1999;9(7):727-33.
34. Tamaki H, Amino N, Aozasa M, Mori M, Iwatani Y, Tachi J, et al. Universal predictive criteria for neonatal overt thyrotoxicosis requiring treatment. *American journal of perinatology*. 1988;5(2):152-8.
35. Abeillon-du Payrat J, Chikh K, Bossard N, Bretones P, Gaucherand P, Claris O, et al. Predictive value of maternal second-generation thyroid-binding inhibitory immunoglobulin assay for neonatal autoimmune hyperthyroidism. *European journal of endocrinology*. 2014;171(4):451-60.
36. Zophel K, Roggenbuck D, Schott M. Clinical review about TRAb assay's history. *Autoimmunity reviews*. 2010;9(10):695-700.
37. Seo S, Sanchez Robledo M. Usefulness of TSH receptor antibodies as biomarkers for Graves' ophthalmopathy: a systematic review. *Journal of endocrinological investigation*. 2018;41(12):1457-68.
38. Ehlers M, Allelein S, Schott M. TSH-receptor autoantibodies: pathophysiology, assay methods, and clinical applications. *Minerva endocrinologica*. 2018;43(3):323-32.
39. Shewring G, Smith BR. An improved radioreceptor assay for TSH receptor antibodies. *Clinical endocrinology*. 1982;17(4):409-17.
40. Tozzoli R, Bagnasco M, Giavarina D, Bizzaro N. TSH receptor autoantibody immunoassay in patients with Graves' disease: improvement of diagnostic accuracy over different generations of methods. *Systematic review and meta-analysis*. *Autoimmunity reviews*. 2012;12(2):107-13.
41. Furmaniak J, Sanders J, Nunez Miguel R, Rees Smith B. Mechanisms of Action of TSHR Autoantibodies. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 2015;47(10):735-52.

42. Sanders J, Evans M, Premawardhana LD, Depraetere H, Jeffreys J, Richards T, et al. Human monoclonal thyroid stimulating autoantibody. *Lancet (London, England)*. 2003;362(9378):126-8.
43. Smith BR, Bolton J, Young S, Collyer A, Weeden A, Bradbury J, et al. A new assay for thyrotropin receptor autoantibodies. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2004;14(10):830-5.
44. Schott M, Hermsen D, Broecker-Preuss M, Casati M, Mas JC, Eckstein A, et al. Clinical value of the first automated TSH receptor autoantibody assay for the diagnosis of Graves' disease (GD): an international multicentre trial. *Clinical endocrinology*. 2009;71(4):566-73.
45. Tozzoli R, Kodermaz G, Villalta D, Bagnasco M, Pesce G, Bizzaro N. Accuracy of receptor-based methods for detection of thyrotropin-receptor autoantibodies: a new automated third-generation immunoassay shows higher analytical and clinical sensitivity for the differential diagnosis of hyperthyroidism. *Auto-immunity highlights*. 2010;1(2):95-100.
46. Diana T, Wuster C, Kanitz M, Kahaly GJ. Highly variable sensitivity of five binding and two bioassays for TSH-receptor antibodies. *Journal of endocrinological investigation*. 2016;39(10):1159-65.
47. Villalta D, D'Aurizio F, Da Re M, Ricci D, Latrofa F, Tozzoli R. Diagnostic accuracy of a new fluoroenzyme immunoassay for the detection of TSH receptor autoantibodies in Graves' disease. *Auto-immunity highlights*. 2018;9(1):3.
48. Adams DD. The presence of an abnormal thyroid-stimulating hormone in the serum of some thyrotoxic patients. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1958;18(7):699-712.
49. Mc KJ. The bioassay of thyrotropin in serum. *Endocrinology*. 1958;63(3):372-82.
50. Burke G. The long-acting thyroid stimulator of Graves' disease. *The American journal of medicine*. 1968;45(3):435-50.
51. Bakke JL, Heideman L, Jr., Lawrence NL, Wiberg C. Bioassay of thyrotropic hormone by weight response of bovine thyroid slices. *Endocrinology*. 1957;61(4):352-67.
52. Brown J, Ensor J, Munro DS. A comparison of the actions of thyroid-stimulating hormone and the long-acting thyroid stimulator in an in vitro assay. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*. 1968;61(7):652-4.
53. Planells R, Fayet G, Lissitzky S, Hennen G, Closset J. Bioassay of thyrotropin using isolated porcine thyroid cells. *FEBS letters*. 1975;53(1):87-91.
54. Wilson B, Raghupathy E, Tonoue T, Tong W. TSH-like actions of dibutyryl-cAMP on isolated bovine thyroid cells. *Endocrinology*. 1968;83(4):877-84.
55. Holmes SD, Dirmikis SM, Martin TJ, Munro DS. Effects of human thyroid-stimulating hormone and immunoglobulins on adenylate cyclase activity and the accumulation of cyclic AMP in human thyroid membranes and slices. *The Journal of endocrinology*. 1978;79(1):121-30.
56. Onaya T, Kotani M, Yamada T, Ochi Y. New in vitro tests to detect the thyroid stimulator in sera from hyperthyroid patients by measuring colloid droplet formation and cyclic AMP in human thyroid slices. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1973;36(5):859-66.
57. Vitti P, Rotella CM, Valente WA, Cohen J, Aloj SM, Laccetti P, et al. Characterization of the optimal stimulatory effects of graves' monoclonal and serum immunoglobulin G on adenosine 3',5'-monophosphate production in fRTL-5 thyroid cells: a potential clinical assay. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1983;57(4):782-91.
58. Morris JC, 3rd, Hay ID, Nelson RE, Jiang NS. Clinical utility of thyrotropin-receptor antibody assays: comparison of radioreceptor and bioassay methods. *Mayo Clinic proceedings*. 1988;63(7):707-17.
59. Vitti P, Elisei R, Tonacchera M, Chiovato L, Mancusi F, Rago T, et al. Detection of thyroid-stimulating antibody using Chinese hamster ovary cells transfected with cloned human thyrotropin receptor. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1993;76(2):499-503.
60. Lytton SD, Li Y, Olivo PD, Kohn LD, Kahaly GJ. Novel chimeric thyroid-stimulating hormone-receptor bioassay for thyroid-stimulating immunoglobulins. *Clinical and experimental immunology*. 2010;162(3):438-46.
61. Lytton SD, Kahaly GJ. Bioassays for TSH-receptor autoantibodies: an update. *Autoimmunity reviews*. 2010;10(2):116-22.

62. Watson PF, Ajjan RA, Phipps J, Metcalfe R, Weetman AP. A new chemiluminescent assay for the rapid detection of thyroid stimulating antibodies in Graves' disease. *Clinical endocrinology*. 1998;49(5):577-81.
63. Lytton SD, Ponto KA, Kanitz M, Matheis N, Kohn LD, Kahaly GJ. A novel thyroid stimulating immunoglobulin bioassay is a functional indicator of activity and severity of Graves' orbitopathy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010;95(5):2123-31.
64. Giuliani C, Saji M, Bucci I, Napolitano G. Bioassays for TSH Receptor Autoantibodies, from FRTL-5 Cells to TSH Receptor-LH/CG Receptor Chimeras: The Contribution of Leonard D. Kohn. *Frontiers in endocrinology*. 2016;7:103.
65. Diana T, Kanitz M, Lehmann M, Li Y, Olivo PD, Kahaly GJ. Standardization of a bioassay for thyrotropin receptor stimulating autoantibodies. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2015;25(2):169-75.
66. Giuliani C, Cerrone D, Harii N, Thornton M, Kohn LD, Dagia NM, et al. A TSHR-LH/CGR chimera that measures functional thyroid-stimulating autoantibodies (TSAb) can predict remission or recurrence in Graves' patients undergoing antithyroid drug (ATD) treatment. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(7):E1080-7.
67. Jang SY, Shin DY, Lee EJ, Lee SY, Yoon JS. Relevance of TSH-receptor antibody levels in predicting disease course in Graves' orbitopathy: comparison of the third-generation TBII assay and Mc4-TSI bioassay. *Eye (London, England)*. 2013;27(8):964-71.
68. Diana T, Brown RS, Bossowski A, Segni M, Niedziela M, Konig J, et al. Clinical relevance of thyroid-stimulating autoantibodies in pediatric graves' disease-a multicenter study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2014;99(5):1648-55.
69. 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. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 2015;47(12):880-8.
70. Allelein S, Ehlers M, Goretzki S, Hermsen D, Feldkamp J, Haase M, et al. Clinical Evaluation of the First Automated Assay for the Detection of Stimulating TSH Receptor Autoantibodies. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 2016;48(12):795-801.
71. Kamijo K, Murayama H, Uzu T, Togashi K, Kahaly GJ. A novel bioreporter assay for thyrotropin receptor antibodies using a chimeric thyrotropin receptor (mc4) is more useful in differentiation of Graves' disease from painless thyroiditis than conventional thyrotropin-stimulating antibody assay using porcine thyroid cells. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2010;20(8):851-6.
72. Lee JI, Jang HW, Kim SK, Choi JY, Kim JY, Hur KY, et al. Diagnostic Value of a Chimeric TSH Receptor (Mc4)-Based Bioassay for Graves' Disease. *The Korean Journal of Internal Medicine*. 2011;26(2):179-86.
73. Armbruster DA, Pry T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *The Clinical biochemist Reviews*. 2008;29 Suppl 1:S49-52.
74. Saah AJ, Hoover DR. "Sensitivity" and "specificity" reconsidered: the meaning of these terms in analytical and diagnostic settings. *Annals of internal medicine*. 1997;126(1):91-4.
75. Firma Kronus S, ID, USA. Product Insert: P/N 196d. 2015.
76. TECOmedical. package insert TE1010\_AA-D\_08.18 Dynex DS2 ELISA. package insert TE1010\_AA-D\_0818 Dynex DS2 ELISA. Bünde, Deutschland2018.
77. Siemens Healthcare F. Package Insert. PIL2KTSI-6. Erlangen, Deutschland2015.
78. BRAHMS TS. Package insert. Package Insert BRAHMS TRAK human Kryptor. Henningsdorf, Deutschland2011.
79. Massart C, Sapin R, Gibassier J, Agin A, d'Herbomez M. Intermethod variability in TSH-receptor antibody measurement: implication for the diagnosis of Graves disease and for the follow-up of Graves ophthalmopathy. *Clinical chemistry*. 2009;55(1):183-6.

80. Struja T, Jutzi R, Imahorn N, Kaeslin M, Boesiger F, Kutz A, et al. Comparison of Five TSH-Receptor Antibody Assays in Graves' disease: results from an observational pilot study. *BMC endocrine disorders*. 2019;19(1):38.
81. Diana T, Wuster C, Olivo PD, Unterrainer A, Konig J, Kanitz M, et al. Performance and Specificity of 6 Immunoassays for TSH Receptor Antibodies: A Multicenter Study. *European thyroid journal*. 2017;6(5):243-9.
82. Kamijo K, Ishikawa K, Tanaka M. Clinical evaluation of 3rd generation assay for thyrotropin receptor antibodies: the M22-biotin-based ELISA initiated by Smith. *Endocrine journal*. 2005;52(5):525-9.
83. Autilio C, Morelli R, Locantore P, Pontecorvi A, Zuppi C, Carrozza C. Stimulating TSH receptor autoantibodies immunoassay: analytical evaluation and clinical performance in Graves' disease. *Annals of clinical biochemistry*. 2018;55(1):172-7.
84. Allelein S, Diana T, Ehlers M, Kanitz M, Hermsen D, Schott M, et al. Comparison of a Bridge Immunoassay with Two Bioassays for Thyrotropin Receptor Antibody Detection and Differentiation. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 2019;51(6):341-6.
85. Bluszcz GA, Bednarczuk T, Bartoszewicz Z, Kondracka A, Walczak K, Zurecka Z, et al. Clinical utility of TSH receptor antibody levels in Graves' orbitopathy: a comparison of two TSH receptor antibody immunoassays. *Central-European journal of immunology*. 2018;43(4):405-12.
86. Tozzoli R, D'Aurizio F, Villalta D, Giovanella L. Evaluation of the first fully automated immunoassay method for the measurement of stimulating TSH receptor autoantibodies in Graves' disease. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2017;55(1):58-64.
87. Kemble DJ, Jackson T, Morrison M, Cervinski MA, Nerenz RD. Analytical and Clinical Validation of Two Commercially Available Immunoassays Used in the Detection of TSHR Antibodies. *The Journal of Applied Laboratory Medicine: An AACC Publication*. 2017.
88. Vos XG, Smit N, Endert E, Tijssen JG, Wiersinga WM. Frequency and characteristics of TBII-seronegative patients in a population with untreated Graves' hyperthyroidism: a prospective study. *Clinical endocrinology*. 2008;69(2):311-7.
89. Orgiazzi J. Thyroid autoimmunity. *Presse medicale (Paris, France : 1983)*. 2012;41(12 p 2):e611-25.

## 8 Anhang

Folgende Tabellen sind Wertetabellen zu Abb. 17-18: Boxplots in IU/L, und für Dynex in U/L.

*Abbildung 21: Wertetabelle für Boxplots (Abb. 17 und 18)*

Patienten	TSI + (%SRR)	Kronus (cut-off < 1 IU/L)					Immulite (cut-off <0,55 IU/L)				
		unverdünnt	1:3	1:9	1:27	1:81	unverdünnt	1:3	1:9	1:27	1:81
P1	214	10,8	2,9	1,2	0,7		0,733	0,277	0,09	0,09	0,09
P2	208	1	0,7	0,5			1,33	0,494	0,202	0,09	0,09
P3	193	2,4	0,9	0,5			1,3	0,514	0,182	0,09	0,09
P4	243	6,3	1,5	0,5			3,27	1,28	0,449	0,152	0,09
P5	220	4,7	1,7	0,8			1,15	0,471	0,161	0,09	0,09
P6	239	1,7	1	0,8			1,68	0,601	0,251	0,09	0,09
P7	239	8,8	2	0,8			2,81	1,01	0,384	0,167	0,09
P8	272	1,3	0,7	0,9			0,924	0,381	0,128	0,09	0,09
P9	244	8,9	2,1	1	0,9		1,59	0,663	0,214	0,09	0,09
P10	231	1,2	0,9	0,8			0,878	0,329	0,117	0,09	0,09
P11	341	4	2,2	1,3	0,7	0,7	2,12	0,836	0,287	0,09	0,09
P12	382	5,4	1,6	1	0,8		4,48	1,6	0,537	0,189	0,09
P13	291	3,4	1,4	0,7	0,8		3,22	1,03	0,37	0,119	0,09
P14	345	13	4	1,6	0,7		22,5	7,02	2,67	0,924	0,308
P15	389	7,8	1,7	0,9	0,7		4,36	1,35	0,514	0,17	0,09
P16	395	32	13,5	5,2	1,9	1,3	28,5	10,8	3,66	1,37	0,496
P17	383	1	0,6	0,6	0,7		1,1	0,397	0,139	0,09	0,09
P18	352	3,7	1,3	0,9	0,7		2,25	0,795	0,289	0,09	0,09
P19	410	9,1	3,7	1,5	1	0,8	3,89	1,54	0,601	0,182	0,09
P20	305	6,2	1,5	0,9	0,7		2,77	1,06	0,413	0,131	0,09
P21	504	29,6	11,3	3,6	1	1	31	11,7	4,46	1,67	0,568
P22	445	22,3	9	3	1,2	0,8	16,8	5,72	1,96	0,789	0,277
P23	436	2,8	1,2	0,8	0,7	0,7	3,77	1,46	0,543	0,192	0,09
P24	470	5,8	3,4	1,6	1	0,9	6,56	2,28	0,761	0,307	0,124
P25	510	16,7	5,2	1,9	1,1	0,7	14,8	5,61	2,19	0,801	0,269
P26	577	8,1	2,8	1,4	0,9	0,8	4,22	1,48	0,555	0,214	0,09
P27	489	10,3	6	3,4	1,6	1,1	14,9	4,69	1,57	0,594	0,203
P28	566	8	4,6	2	1,1	0,9	5,16	1,64	0,642	0,246	0,09
P29	482	35,5	23	9,9	3,5	1,6	27	17,6	6,12	2,23	0,877
P30	476	10,8	4,5	1,8	1,2	1	6,39	2,71	0,99	0,35	0,108

Patienten	TSI + (%SRR)	Kryptor (cut-off <1,8 IU/L)					DS2 Dynex (cut-off <2 U/L)				
		unverdünnt	1:3	1:9	1:27	1:81	unverdünnt	1:3	1:9	1:27	1:81
P1	214	12,32	3,949	1,122	0,26	0,26	10,087	2,947	1,24	0,645	0,528
P2	208	1,67	0,3177	0,26	0,26	0,26	1,323	0,745	0,389	0,551	0,518
P3	193	1,683	0,9565	0,26	0,26	0,26	1,744	0,772	0,581	0,669	0,528
P4	243	7,7	2,907	0,9215	0,26	0,26	5,676	1,935	1,013	0,678	0,5
P5	220	3,994	1,923	0,26	0,26	0,26	5,045	1,836	1,016	0,663	0,555
P6	239	2,615	1,192	0,26	0,26	0,26	3,621	1,439	0,701	0,533	0,475
P7	239	4,846	1,641	0,26	0,26	0,26	6,989	2,11	1,004	0,619	0,54
P8	272	2,797	0,8555	0,26	0,26	0,26	1,775	0,946	0,476	0,569	0,569
P9	244		1,836	0,26	0,26	0,26	6,507	1,944	1,033	0,619	0,493
P10	231	2,678	0,5533	0,26	0,26	0,26	1,09	0,42	0,501	0,482	0,433
P11	341	3,292	1,127	0,26	0,26	0,26	5,135	1,689	0,892	0,697	0,474
P12	382	5,238	1,509	0,26	1,461	0,8579	4,896	1,516	0,741	0,565	0,445
P13	291	4,87	3,033	0,8592	0,5289	0,26	3,01	1,118	0,708	0,579	0,544
P14	345	8,347	3,906	1,51	0,559	0,3	17,551	4,13	1,262	0,762	0,52
P15	389	0,26	0,2839	0,3984	0,26	0,26	7,392	2,141	1,034	0,663	0,557
P16	395	33,7	15,42	5,467	2,12	0,8387	35,535	17,261	3,962	1,141	0,816
P17	383	1,477	0,9021	0,4929	0,4055	0,4267	1,398	0,752	0,663	0,622	0,646
P18	352	1,003	1,521	0,6747	0,26	0,26	3,027	0,985	0,842	0,676	0,638
P19	410	8,445	4,584	1,777	0,9919	0,4966	12,376	3,846	1,497	0,883	0,648
P20	305	2,231	2,598	1,05	0,26	0,26	3,971	1,169	0,817	0,641	0,657
P21	504	22,73	15,67	5,208	2,026	0,5141	31,146	12,168	3,211	1,27	0,84
P22	445	17,85	6,661	2,62	1,258	0,7505	23,252	6,326	1,819	0,868	0,68
P23	436	2,553	1,388	0,7077	0,347	0,26	1,795	0,925	0,763	0,706	0,666
P24	470	5,629	2,772	0,9702	0,26	0,26	8,507	2,598	1,175	0,722	0,71
P25	510	16,38	4,834	1,707	0,26	0,26	21,931	4,946	1,526	0,951	0,762
P26	577	8,194	2,317	0,6715	0,26	0,26	10,483	2,537	1,103	0,826	0,696
P27	489	10,14	7,452	2,85	0,7845	0,26	15,367	6,854	2,668	1,227	0,806
P28	566	4,874	1,96	0,26	0,26	0,26	5,326	1,353	0,865	0,637	0,679
P29	482	45,43	25,43	8,914	2,537	0,94	42,343	25,935	8,078	2,463	1,124
P30	476	8,898	4,341	1,016	0,3964	0,26	13,892	2,904	1,053	0,814	0,72



Wertetabellen zu Abb. 12-14:

*Tabelle 16: Globale Sensitivität der im Bioassay als niedrig TSI positiv gemessenen (Wertetabelle zu Abb.12)*

	Kronus (%)	Immulite (%)	Kryptor (%)	DS2 Dynex (%)
unverdünnt	100	100	80	60
1:3	60	40	40	20
1:9	20	0	0	0
1:27	0	0	0	0
1:81	0	0	0	0

*Tabelle 17: Globale Sensitivität der im Bioassay als moderat TSI positiv gemessenen (Wertetabelle zu Abb.13)*

	Kronus (%)	Immulite (%)	Kryptor (%)	DS2 Dynex (%)
unverdünnt	100	100	70	90
1:3	90	90	50	40
1:9	50	30	10	10
1:27	20	20	10	0
1:81	10	0	0	0

*Tabelle 18: Globale Sensitivität der im Bioassay als hoch TSI positiv gemessenen (Wertetabelle zu Abb. 14)*

	Kronus (%)	Immulite (%)	Kryptor (%)	DS2 Dynex (%)
unverdünnt	100	100	100	90
1:3	100	100	90	80
1:9	90	90	40	30
1:27	80	50	20	10
1:81	40	20	0	0

## 9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und meiner Betreuerin:

Mein Doktorvater ermutigte mich zu dieser Promotion und schenkte mir das Vertrauen und die Unterstützung, in seinem Labor zu forschen.

Meiner Betreuerin möchte ich nicht nur für die umfassende Betreuung in der praktischen, sowie theoretischen wissenschaftlichen Arbeit danken, sondern auch für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die schönen persönlichen Gespräche. Sie war es, die mich durch Höhen und Tiefen dieser Arbeit begleitete.

Außerdem möchte ich mich bei (Name aus Datenschutzgründen entfernt) für die große praktische Hilfe bei der Assaydurchführung, sowie die spannenden Gespräche über die Natur bedanken. Ein großer Dank für die praktische Unterstützung gilt hier auch (Name aus Datenschutzgründen entfernt). (Namen aus Datenschutzgründen entfernt) möchte ich für die wichtige organisatorische Hilfe danken. Auch (Namen aus Datenschutzgründen entfernt) vom IMBEI gilt ein großer Dank für die entscheidende Hilfestellung in der statistischen Auswertung.

Ohne meine Liebsten wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die nie an der Fertigstellung der Arbeit zweifelte, bei meiner Großmutter, die sich immer um mich sorgte und bei meinem verstorbenen Großvater, an dessen Gelassenheit ich mich gerne erinnere. Außerdem möchte ich mich bei (Name aus Datenschutzgründen entfernt) bedanken, die mich an die nötigen Pausen erinnerte, bei (Name aus Datenschutzgründen entfernt), die mir mit ihrer positiven Ausstrahlung immer wieder Energie zum Weitermachen schenkte und bei (Name aus Datenschutzgründen entfernt), die mich auf einem Berggipfel an die nötige Weitsicht erinnerte.

Zuletzt möchte ich mich bei (Name aus Datenschutzgründen entfernt) bedanken, für die Geduld, die wertvollen Anregungen und dafür, dass er mein Leben so viel reicher macht.

## 10 Tabellarischer Lebenslauf

Aus Datenschutzgründen entfernt

Aus Datenschutzgründen entfernt