

評估第二代促甲狀腺刺激激素受體抗體之檢測方法於葛瑞夫茲氏症

王玫君¹, 林興中^{1,2,3}, 呂志成^{1,3,5}, 朱志勳^{1,3,6}

孫群欽¹, 莊明儒¹, 莊媖婷^{1,4}, 李鎮堃^{1,3}

高雄榮民總醫院內科部新陳代謝科¹, 高雄榮民總醫院教研部醫研科², 國立陽明大學醫學院³,

健仁醫院⁴, 美和技術學院⁵, 慈惠技術學院⁶

摘要

目的：葛瑞夫茲氏症 (Grave's disease-GD) 是造成甲狀腺機能亢進之重要甲狀腺自體免疫疾病，患者血清中存在異常的免疫球蛋白，稱為促甲狀腺刺激激素受體抗體(TSH receptor antibody-TRAb)，它可與存在於甲狀腺濾泡細胞膜上之人促甲狀腺激素受體結合，促使甲狀腺分泌荷爾蒙增多並造成甲狀腺瀰漫性增生（腫大）。TRAb是Graves發病的一個重要因素，這些抗體在Graves病患者中的陽性率約為60-95%，檢測這些自身抗體可用於Graves症的確診和區分其他甲狀腺疾病，繼續監測TRAb的值可有助於判斷疾病的預後及復發，由此可見檢測TRAb是很重要！但臨床檢測時亦有10-40%TRAb未能檢測出TRAb，因此我們評估更敏之新方法，以期有更安全、簡便操作、更準確的檢測方法。本實驗將分析比較慣用之放射受體法 (radioreceptor assay-RRA) 試劑組與新方法酵素免疫分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay-ELISA) 試劑組之間的精密度、準確度、敏感度、特異性、相關性，並建立ELISA法之參考值。

方法：使用RRA法與ELISA法測試甲狀腺疾病之病人 ($n=105$) 及健康人 ($n=74$) 之血清中的TRAb。

結果：RRA法inter assay A血清為26.12% ± 2.04% ($N=10$) , CV=7.66% ; B血清為44.69% ± 2.81% ($N=10$) , CV=6.29% 。Between assay A血清為27.71% ± 2.7%

($N=10$) , CV=9.74% ; B血清為44.5% ± 2.32% ($N=10$) , CV=5.21% 。ELISA法之inter assay A血清為34.27% ± 1.98% ($N=10$) , CV=5.77% ; B血清為90.61% ± 0.78% ($N=10$) , CV=0.86% ; C血清為73.09% ± 1.08% ($N=10$) , CV=1.47% 。Between assay A血清為34.27% ± 3.05% ($N=10$) , CV=8.86% ; B血清為89.64% ± 2.16% ($N=10$) , CV=2.41% 。RRA法與ELISA法 $R=0.95$; $P<0.001$ ，所以兩種方法相關顯著。RRA法陽性率為64/105 (60.95%) , ELISA法陽性率為78/105 (74.3%) ; ELISA法之參考值為<10%。

結論：因使用豬的促甲狀腺素受體 (TSH receptor-TR) 之放射受體法，有放射性使用安全性及放射性廢棄物處理之考量，且與使用人的促甲狀腺素受體 (TSH receptor-TR) 之酵素免疫析法比較分析後，酵素免疫析法具有較高的臨床敏感性和特異性及操作簡便，且酵素免疫分析法之有效期限較RRA長，更有利於臨床彈性應用，另外更重要是可提供更準確數值，所以使用酵素免疫分析法是為很好的考量。

關鍵詞：促甲狀腺刺激激素受體抗體、葛瑞夫茲氏症、放射受體法、酵素免疫分析法

前言

甲狀腺機能亢進對於現在緊張、忙碌的社會大眾來說是常見的，因為心跳快、焦慮、容易緊



張、手會抖、體重下降、失眠、腹瀉，都是甲狀腺亢進典型的症狀。甲狀腺是影響人體最廣的內分泌腺，身體每個器官的新陳代謝都受到甲狀腺的影響，包括心臟、肌肉、眼睛、骨骼、皮膚等。誘發甲狀腺亢進的原因很多，包括甲狀腺發炎、長結節、腫瘤…等。但最常見的是自體免疫的問題，也就是葛雷氏症（Grave's disease），約佔90%以上【1-2】。而診斷葛雷氏症除了有以上所述之各種症狀，目前的甲狀腺功能檢查如三碘甲狀腺素（T3），甲狀腺素（T4）遊離甲狀腺素（FT4）和高敏感度甲狀腺促素（HS-TSH）檢查【3】，可以很客觀而正確的診斷，由於葛雷氏症患者血清中存在一種抗體，是針對促甲狀腺素受體（TSH receptor-TR）的自身抗體，稱為促甲狀腺刺激激素受體抗體（TSH receptor antibody-TRAb），作用和促甲狀腺素（thyroid stimulating hormone-TSH）一樣，會刺激甲狀腺分泌甲狀腺素，造成甲狀腺機能亢進。在Graves病患者中，TRAb陽性率可達73%~90%【4-10】。測定TRAb不僅可作為Graves診斷的一個重要依據，而且可作為經抗甲狀腺藥物治療後，甲狀腺功能已恢復正常的患者停藥後是否會復發的一個判斷指標。一般用藥大約一年半至二年，痊癒的機會是50%左右，不過，並非藥物使妳痊癒，是發病的元兇——TRAb，自然消失或作用減弱之故。停藥後約有50%的病人甲亢復發，TRAb值越高復發可能性就越高【11-14】。患有葛瑞夫氏病的孕婦，其甲促素受體抗體會穿過胎盤，刺激胎兒併發甲狀腺機能亢進【15-16】。外科切除，也就是手術治療，手術治療甲狀腺次全切除能使90%以上的患者得到痊愈，且術後TRAbs均可下降【17-18】。所以儘管TSAb在GD中的確致病作用尚未完全闡明，但其在監測高危人群、評估療效、確定停藥時機及預測復發等方面均具有重要意義。

自從1983有動物實驗之文獻報告指出，先利用放射碘注射天竺鼠，使其TSH降低後，再注射葛瑞夫症病人血清於天竺鼠，發現會刺激甲狀腺【19】，據此往後發展出生物分析法（bioassay），為採用細胞培養觀察cAMP增加作為有無TRAb之指標【20-22】，自Bernard Rees Smith發明利用放射受體法（radioreceptor assay-RRA）測定TSH receptor antibody之後【23】，

已為大家所接受且慣用之分析方法。

目前檢測TRAb的方法除了有生物法為採用細胞培養觀察cAMP增加作為指標，尚有免疫沈澱法【24】、流式細胞儀【25,26】、化學冷光【27】、色層分析法【28】、西方墨點法【29】等，而這些方法大部份費時、不易操作、昂貴，不適合常規檢查，因目前臨床應用幾乎為放射受體法，有放射性使用安全性及放射性廢棄物處理之考量，更因為診斷葛雷氏症之TRAb陽性率為60%~95%【5-22】，表示約有10-40%未能檢測到，因此我們為了有更敏感且更安全、簡便操作，更重要的是更準確的檢測方法，將放射受體法（radioreceptor assay-RRA）試劑組與酵素免疫分析法（enzyme-linked immunosorbent assay-ELISA）試劑組做分析比較，並建立ELISA法之參考值。

材料及方法

檢體

收集本院門診甲狀腺疾病患者（葛瑞夫茲氏症、甲狀腺功能過低症、甲狀腺結節、甲狀腺囊腫等）105位病患血清及篩檢FT4（0.71-1.9 ng/dl）或TSH（0.4-4.67 IU/ml）正常無症狀之健康無甲狀腺疾病74位血清。

分析方法

RRA KIT (RSR,U.K.)，原理：TRAb與放射性標示之TSH，競爭結合TSH receptor，所以TRAb的結果為抑制百分比，即TSH receptor與放射性標示之TSH結合量越少，表示TRAb的量越多，抑制百分比就越高。

ELISA法 (RSR,U.K.)，原理：ABS為親和素(avidin)-生物素(biotin)系統的簡稱。TRAb與固相TSH receptor結合後，加入生物素標記的TSH，TRAb抗體通過競爭結合結果如待測TRAb含量越多，與固相TSHreceptor結合的生物素標記的TSH就越少，顯色越淺，二者呈負相關。結果亦以抑制百分比表示。

結果

如表一所示為統計結果，甲狀腺疾病患者之平均值RRA法為 $32.11 \pm 31.21\%$ ($N=105$)，ELISA法為 $36.37 \pm 29.64\%$ ($N=105$)；健康者之平均值RRA法為 $3.61\% \pm 3.2\%$ ($N=74$)，ELISA



法為 $4.53\% \pm 2.48\%$ ($N=74$)。

如表二所示則將105位甲狀腺疾病患者以RRA法分為陰性組、陽性組分析比較，陰性組之平均值RRA法為 $3.73\% \pm 3.03\%$ ，ELISA法為 $8.86\% \pm 7.29\%$ ；陽性組之平均值RRA法為 $50.03 \pm 27.23\%$ ，ELISA法為 $53.99\% \pm 24.67\%$ 。且從105位甲狀腺疾病患者中統計90位葛瑞夫茲氏症，亦以RRA法分為陰性組、陽性組分析比較，陰性組之平均值RRA法為 $3.81\% \pm 3.12\%$ ，ELISA法為 $8.11\% \pm 6.1\%$ ；陽性組之平均值RRA法為 $48.73\% \pm 26.52\%$ ，ELISA法為 $52.21\% \pm 23.88\%$ 。

精密度與準確度

如表三所示RRA法RRA法inter assay A血清為 $26.12\% \pm 2.04\%$ ($N=10$)， $CV=7.66\%$ ；B血清為 $44.69\% \pm 2.81\%$ ($N=10$)， $CV=6.29\%$ 。Between assay A血清為 $27.71\% \pm 2.7\%$ ($N=10$)， $CV=9.74\%$ ；B血清為 $44.5\% \pm 2.32\%$ ($N=10$)， $CV=5.21\%$ 。

如表四所示ELISA法之inter assay A血清為 $34.27\% \pm 1.98\%$ ($N=10$)， $CV=5.77\%$ ；B血清為 $90.61\% \pm 0.78\%$ ($N=10$)， $CV=0.86\%$ ；C血清為 $73.09\% \pm 1.08\%$ ($N=10$)， $CV=1.47\%$ 。Between assay A血清為 $34.27\% \pm 3.05\%$ ($N=10$)， $CV=8.86\%$ ；B血清為 $89.64\% \pm 2.16\%$ ($N=10$)， $CV=2.41\%$ 。

相關性

如圖一所示RRA法與ELISA法比較， $Y=0.899X+7.4957$ ； $R=0.946$ ； $P<0.001$ ，所以兩種方法相關顯著。

陽性率

如表五所示RRA法陽性率為 $64/105$ (60.95%)，ELISA法陽性率為 $78/105$ (74.3%)；而特別將葛瑞夫茲氏症患者統計，則RRA法陽性率提高為 $59/90$ (65.6%)，而ELISA法陽性率提高為 $68/90$ (75.6%)。而RRA法41例陰性而ELISA法陽性有14例則陽性率提高為 34.1% 。只統計葛瑞夫茲氏症患者其RRA法有31例陰性而ELISA法陽性有9例則陽性率提高為 29% 。

參考值

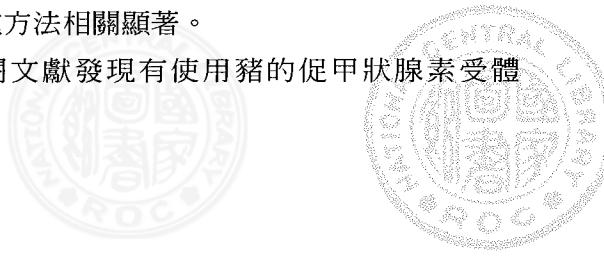
如表六所示為健康者之平均值RRA法為 $3.61\% \pm 3.2\%$ ($N=74$)，ELISA法為 $4.53\% \pm 2.48\%$ ($N=74$)。眾數RRA法為 0% ，ELISA法為 3.87% 。而本科參考值使用平均值加上二個標準差（單尾），則RRA法為 10.0% ，RRA法為 9.49% ，皆與試劑組所建議及其他文獻報導之 <10 相同。

討論

目前檢測TRAb的方法為慣用之放射受體法 (radioimmunoassay-RRA)，為使用豬促甲狀腺刺激激素受體 (Porcine TSH receptor-PTR) 與病人血中TRAb、標示放射性牛的促甲狀腺素，三者交互作用後，再用聚乙二醇(polyethylene glycol-PEG)將結合物沉澱後測量其值之同質性液相分析法 (Homogenous liquid phase assay)，而近年來已發展出使用重組之人的促甲狀腺素受體 (Human TSH receptor-HTR)，將其固著於96之孔盤上，而此法中病人血中TRAb與標示生物素牛的促甲狀腺素，競爭結合TSH receptor後，與標示酵素之親合素結合之ELISA方法。

我們比較分析後二組試劑組，由表三、表四結果顯示新的ELISA方法精密度與準確度優於慣用之RRA方法。由表一、表二結果顯示新的ELISA方法不管是甲狀腺疾病患者、健康者或將RRA法區分陰性、陽性組，其平均值皆為ELISA方法高於RRA法，由表五所示RRA法陽性率為 $64/105$ (60.95%)，ELISA法陽性率為 $78/105$ (74.3%)；而特別將葛瑞夫茲氏症患者統計，則RRA法陽性率提高為 $59/90$ (65.6%)，而ELISA法陽性率提高為 $68/90$ (75.6%)。而RRA法41例陰性而ELISA法陽性有14例則陽性率提高為 34.1% 。只統計葛瑞夫茲氏症患者其RRA法有31例陰性而ELISA法陽性有9例則陽性率提高為 29% 。明白顯示ELISA方法之敏感度優於慣用之RRA方法。而二組試劑組相關性如圖一所示R， $Y=0.899X+7.4957$ ； $R=0.946$ ； $P<0.001$ ，所以兩種方法相關顯著。

查閱文獻發現有使用豬的促甲狀腺素受體



(Porcine TSH receptor-PTR) 之RRA法與使用人的促甲狀腺素受體 (Human TSH receptor-HTR) 之RRA法之比較【30】；使用PTR之RRA法之液相與固相之比較【31】；使用PTR之RRA法與使用HTR之固相（固著於試管）RRA法之比較【32,33】；使用PTR之RRA法與ELISA法之比較【34】；使用PTR之ELISA法與使用HTR之RRA法之比較【35】。結論為使用人的TR優於豬的TR；異質性固相分析法優於同質性液相分析法，而我們則比較使用PTR之RRA法與使用HTR之固相（固著於孔板）ELISA法。亦是證明以上結果，且ELISA是一種無放射性危害、敏感性高、特異性強、重複性好的實驗診斷方法，由於其試劑穩定、有效期限長、易保存、操作簡便、以及使用國際上標準的微量滴定板為12聯孔條的孔板，既適宜於大規模篩查試驗又可以用於少量標本的檢測，既可做定性試驗也可做定量分析等優點，很容易自動化。

人的TR優於豬的TR，是因提供其對應之人的TRAb有改良之更好之結構、更多的結合位【36】，而用PEG之同質性液相分析法，則因包括有抗TSH抗體（也可出現在Graves病中）等非特異性蛋白質結合，造成沉澱量增加，而目前發展的方向是以固相作為取代常規液相法的技術。固相法在抗原、抗體免疫反應完成後不必加分離劑和低溫離心程式，操作簡便快速，適合大量臨床樣品的檢測。尤其以洗滌代替分離和離心，避免抗TSH抗體等非特異性蛋白質結合的干擾。提高了方法精密度和準確性。

而ELISA法採用生物素-親合素系統 (biotin-avidin system, BAS)，由於它具有生物素與親合素之間高度親和力及多級放大效應，因一個生物素可聯結四個酵素標示之親和素，Avidin對Biotin的結合是不可逆的。同時，Avidin有4個結合位點可與Biotin結合，提高分析的特異性和靈敏度，因此與放射性之特異性和靈敏度不相上下。

而我們之陽性率達60-74%，則是因為無區分甲狀腺疾病及有無病程發展（有無發炎、長結節、眼病變等）、醫療處置（用藥、手術等）

等，因此陽性率較低。

結論

TRAb是導致自家免疫性甲狀腺疾病中甲狀腺功能異常和甲狀腺組織生長異常的重要因素。TRAb的臨床應用價值包括：區別Graves病與其他原因造成的甲狀腺功能亢進；甲狀腺功能正常的Graves病的診斷；預測Graves病孕婦分娩的新生兒患新生兒甲亢的可能性；預測Graves病人復發的可能性；有助於估計產後Graves病是否將繼續存在。由此可見檢測TRAb是很重要！但在Graves病患者中，TRAb陽性率可達60-95%，其陽性率之不同除了Graves病患者個別差異（年齡、懷孕等）、病程發展（有無發炎、長結節、眼病變等）、醫療處置（用藥、手術等），檢測方法之不同亦是原因之一，之前文獻報導大多為豬的TR，而我們使用重組之人的TR之ELISA法可提供更敏感且更安全、簡便操作，更重要的是更準確的檢測方法。

表一以RRA法檢測TRAb之精密性與準確性

INTRA-ASSAY				
	次數	平均值%	標準差%	CV%
A	10	26.12	2.04	7.66
B	10	44.69	2.81	6.29
INTER-ASSAY				
	次數	平均值%	標準差%	CV%
A	10	27.71	2.70	9.743
B	10	44.50	2.32	5.21

表二以ELISA法檢測TRAb之精密性與準確性

INTRA-ASSAY				
	次數	平均值%	標準差%	CV%
A	10	34.27	1.98	5.77
B	10	90.61	0.78	0.86
INTER-ASSAY				
	次數	平均值%	標準差%	CV%
A	10	34.27	3.05	8.86
B	10	89.64	2.16	2.41

表三使用RRA及ELISA測定TRAb之敏感度與特異性比較

表三使用RRA及ELISA測定TRAb之敏感度與特異性比較		
葛瑞夫症(N=90)		健康者
	A組(N=31)	B組(N=59)
	RRA(-)	RRA(+)

RRA(+)	0/31	59/59	0/74
ELISA(+)	9/31	59/59	0/74

表四為葛瑞夫茲氏病患者與健康者TRAb之結果

GD患者			
	人數	平均值	標準差
RRA	90	33.26	30.37
ELISA	90	37.02	28.78
健康者			
	人數	平均值	標準差
RRA	74	3.61	3.20
ELISA	74	4.53	2.48

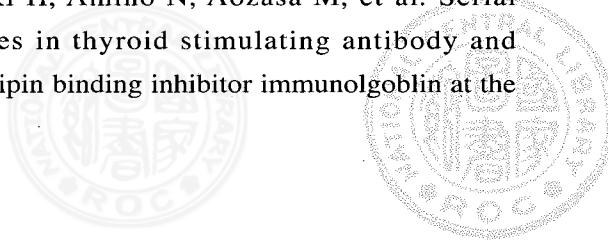
表五為74位健康者TRAb之結果與參考值

	RRA	ELISA
平均值%	3.61	4.53
中位數	3.28	3.87
最小值	0.00	0.89
最大值	10.00	10.00
標準差	3.20	2.48
參考值	10.00	9.49

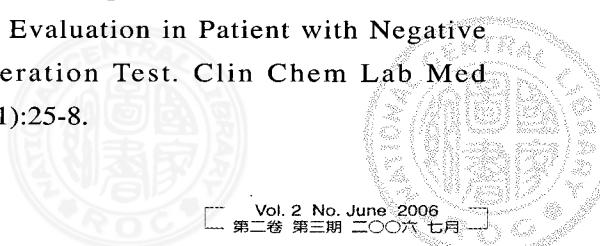
* 參考值為使用平均值加上二個標準差

Reference

1. Weetma AP, McGregor AM: Autoimmune thyroid disease:further developments in our understanding. Endocr Rev 1994;15:788-830.
2. Zakarija M, McKenzie JM: The spectrum and significance of autoantibodies reacting with the thyrotropin receptor. Endocrinol Metab Clin North Am 1987;16:343-63.
3. 林宏達:甲狀腺功能檢查.臨床醫學 1978;1:518-31.
4. Endo K, Kasagi K, Konishi J, et al: Detection and properties on TSH binding inhibitor immunoglobulins in patient with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. J Clin Endocrinol Metab 1978; 46:734-39.
5. Creagh F, Teece M, Williams S, et al: An analysis of throtropin receptor binding and thyroid stimulating activities in a series of Graves' sera. Clin Endocrinol 1985;23:395-404
6. Takasu N, Oshiro C, Akamine H, et al: Thyroid-stimulating antibody and TSH-binding inhibitor immunoglobulin in 277 Graves' patients and 686normal subjects. J Endocrinol Invest 1997;20:452-61.
7. Rees Simith B, McLachlan SM, Furmaniak J: Autoantibodies to the thyrotropin receptor. Endocr Rev 1988;9:106-21.
8. Foley TP, White C, New BA: Juvenile Graves' disease : usefulness and limitations of thyrotropin receptor antibody determinations. J Pediatr 1987;110:378-86 .
9. Lucas A, Salinas I, Rius F, et al: Medical therapy of Graves' disease : does thyroxine prevent recurrence of hyperthyroidism? J Clin Endocrinol Metab 1997;82:2410-13.
10. Rittmaster RS, Zwicker H, Abbotte EC, et al: Effect of methimazole with or without exogenous L-thyroxine on serum concentrations of thyrotropin (TSH) receptor antibodies in patients with Graves' disease. J Clin Endocrinol Metab 1996;81:3283-88.
11. Wilson R, McIllopp JH, Pearson DWM, et al: Relapse of Graves' after medical therapy : predictive value pf thyroidal techtium-99m uptake and serum thyroid stimulating hormone receptor antibody levels antibody levels. J Nucl Med 1985;26:1024-28.
12. Schleusener H, Schwander J, Fischer C, et al: prospective multicenter study on the prediciton of clapse after antithyroid drug treatment in patients with Graves' disease? Clin Endocrinol 1989;21:247-55.
13. Roti E, Gardini E, Minelli R, et al: Effects of chronic iodine adminstration on thyroid status in euthyroid subjects previously treated with antithyroid drugs for Graves' hyperthyroidism. J Clin Endocrinol Metab 1993; 76:928-32
14. Noguchi K, Suzuki H, Nakahata M, et al: Prolonged treatment of hyperthyroidism and sodium tyropanoate, an oral cholecystographic agent : A reevaluation of its clinical utility. Clin Endocrinol 1986;25:293-301.
15. Zakarija M, McKenzie JM: Pregnancy-associated changes in the thyroid-simulating antibody of Graves' disease and the relationship to neonal hyperthyroidism. J Clin Endocrinol Metab 1983;57:1036-40.
16. Tamaki H, Amino N, Aozasa M, et al: Serial changes in thyroid stimulating antibody and thyrotropin binding inhibitor immunolgoblin at the



- time of postpartum occurrence of thyrotoxicosis in Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;65:324-30.
17. Steel NR, Taylor JJ, Young ET, et al: The effect of subtotal thyroidectomy with propanolol preparation on antibody activity in Graves' disease within one year. *Clin Endocrinol* 1987;36:97-106.
18. Takamura Y, Naknoj, Uruno T, et al: Changes in serum TSH receptor antibody (TRAb) Values in patients with Graves' disease after total or subtotal thyroidectomy. *Endocr J*. 2003;50(5):595-601.
19. Munro, D S : "Thyroid Stimulating Immunoglobulins" , The Watson Smith Lecture, 1983.
20. Rapoport B, Greenspan FS, Filetti S, et al: Clinical experience with a human thyroid cell bioassay for thyroid stimulating immunoglobulin. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 58:332-35.
21. Vitti P, Elisei R, Tonacchera M, et al: Detection of thyroid-stimulating antibody using Chinese hamster ovary cells transfected with cloned human thyroid receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:499-503.
22. Morgenthaler NG, Pampel I, Aust G, et al: Application of a bioassay with CHO cells for the routine detection of stimulating and blocking autoantibodies to the TSH-receptor. *Horm Metab Res* 1998;30:162-68.
23. Shewring G, Rees Smith B: An improved radioreceptor assay for TSH receptor antibodies. *Clin Endocrinol* 1982 ;17:409-14.
24. Morgenthaler NG, Tremble J, Huang GC, et al: Binding of anti-thyrotropin receptor autoantibodies in Graves' disease serum to nascent, in vitro translated thyrotropin receptor; ability to map epitopes recognised by antibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:700-06.
25. Jaume JC, Kakinuma A, Chazebalk GD, et al: thyrotropin receptor autoantibodies in serum are present at much lower levels than thyroid peroxidase autoantibodies : analysis by flow cytometry. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:500-07.
26. Patibandla SA, Dallas JS, Seetharamaiah GS, et al: Flow cytometric analyses of antibody binding to Chinese hamster ovary cells expressing human thyroypin receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1885-93.
27. De Forteza R, Smith CU, Amin J, et al: Visualization of the thyrotropin receptor on the cell surface by potent autoantibodies [published erratum appears in *Clin Endocrinol Metab* 1994 79:376]. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:1271-73.
28. Worthington J, Byfield PG, Himsworth RL: Heterogeneity of circulating TSH-receptor antibodies in thyroid disease demonstrated directly by chromatography. *Clin Endocrinol* 1991; 34(2):147-54.
29. Salvi M, Zhang ZG, Haegert D, et al: patients with endocrine ophthalmopathy not associated with overt thyroid disease have multiple thyroid immunological abnormalities. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70(1):89-94.
30. Meller J, Schreivogel I, Bergmann A, et al: Clinical implications of a new TSH receptor antibody assay (DYNO test TRAK human) in autoimmune thyroid diseases. *Nuklearmedizin* 2000;39(1):14-8.
31. Lima N, Knobel M, Medeiros-Neto G: Evaluation of Coated-Tube Assay for Antithyrotropin Receptor Antibodies in Patients with Graves' Disease and Other Thyroid Disorders. *Mary Ann Inc.-Thyroid* 2004;14(4):295-300.
32. Giobavella L, Ceriani L, Garancini S: Evaluation of the 2nd generation radio-receptional assay for anti-TSH receptor antibodies(TRAb) in autoimmune thyroid diseases. *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine* 2001: 45:155-20.
33. Giovanella L, Ceriani L, Garancini S: Clinical Applications of the 2nd Generation Assay for Anti-TSH Receptor Antibodies in Graves' Disease. Evaluation in Patient with Negative 1st Generation Test. *Clin Chem Lab Med* 2001;39(1):25-8.



- 34.Bolton J, Sanders J, Oda Y, et al: Measurement of Thyroid-stimulating Hormone Receptor Autoantibodies by ELISA.Clinical Chemistry 1999;45:2285-87.
- 35.Kamijo K:TSH-Receptor Antibody Measurement in Patients with Various Thyrotoxicosis and Hashimoto's Thyroiditis: a Comparison of Two-Step Assays, Coated Plate ELISA Using Porcine TSH-Receptor and Coated Tube Radioassay Using Human Recombinant TSH-Receptor. Endocrine Journal 2003;50(1):113-6.
- 36.Cundiff JG, Kaithamana S, seetharamaiah GS, et al:Studies using recombinant fragments of human TSH receptor reveal apparent diversity in the binding specificities of antibodies that block TSH binding to its receptor or stimulate thyroid hormone production.The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2001;86(9):4254-60.



The Evaluation of The Second Generation Assay for Measuring TSH Receptor Antibody in Graves' Disease

Wang Mei-Chun¹, Lam Hing-Chung^{1,2,3}, Lu Chih-Chen^{1,3,5}, Chu Chih-Hsun^{1,3,6}, Sun Chun-Chin¹, Chuang Ming-Ju¹, Chuang Ying-Ting^{1,4}, Lee Jenn-Kuen^{1,3}

Division of Endocrinology¹, Division of Medical Research², Veterans General Hospital-Kaohsiung School of medicine³, Jiannren Hospital A1c⁴, Mei-Ho Institute of Technology⁵, Tzuhui Institute of Technology⁶

Abstract

Background: TSH receptor antibody (TRAb) plays important role in Graves' disease. The measurement of TRAb is performed currently by radioreceptor assay (RRA) to detect porcine TSH receptor (PTR). However, TRAb is undetectable in about 10% to 40% of patients Graves' disease by using this method. The second generation assay by using ELISA to detect human TSH receptor (HTR) as a means to measure TRAb is therefore investigated in the present study.

Method: TRAb in the quality control sera were measured by RRA and ELISA respectively to compare their inter-assay and intra-assay. TRAb in the sera of 90 patients (24 females and 66 males with mean age of 39.9 y/o) Graves' disease were measured both by the RRA and ELISA methods. Besides, TRAb in the sera of 74 age and sex matched control subjects were also measured by these two assays method.

Result: The inter assay of control serum A and serum B by using RRA method was $26.12\% \pm 2.04\%$ ($N=10$, $CV = 7.66\%$) and $44.69\% \pm 2.81\%$ ($N=10$, $CV = 6.29\%$), respectively. The intra assay of control serum A and serum B by RRA was $27.71\% \pm 2.70\%$ ($N=10$, $CV = 9.74\%$) and $44.5\% \pm 2.32\%$ ($N=10$, $CV = 5.21\%$), respectively whereas the inter assay of control serum A and serum B by using by ELISA method was $34.27\% \pm 1.98\%$ ($N=10$, $CV = 5.77\%$) and $90.61\% \pm 0.78\%$ ($N=10$, $CV = 0.86\%$), respectively. The intra assay of control serum A and serum B by ELISA was $34.27\% \pm 3.05\%$ ($N=10$, $CV = 8.86\%$), and $89.64\% \pm 2.16\%$ ($N=10$, $CV = 2.41\%$), respectively. The correlation coefficient between RRA and ELISA was significant ($r = 0.94$, $P < 0.001$). The sensitivity of RRA assay was 65.6% (59/90), and that of ELISA assay was 75.6% (68/90). The specificities of both RRA and ELISA assays were 100% (74/74). The nominal reference value of TRAb by using ELISA was below 10%.

Conclusion: measurement of TRAb by detecting HTR using ELISA METHOD has higher sensitivity and specificity than that by detecting PTR using RRA method.

Key words: TSH Receptor Antibody, Graves' disease, RRA assay, ELISA assay

