

VALORACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-RECEPTOR DE TSH: CONCORDANCIA DIAGNÓSTICA ENTRE UN MÉTODO DE PRIMERA GENERACIÓN Y UN MÉTODO DE TERCERA GENERACIÓN

Martin J¹; Cabrera N²; Cabral MF³; Inchauspe ME³; Maldonado V²; de Elías, RF²; Kiener G²; Cisella Y^{1,3}; Andrada MC³

RESUMEN

Introducción: La determinación de anticuerpos anti-receptor de TSH (TRAbs) es útil para la detección del hipertiroidismo autoinmune, el seguimiento de pacientes con Enfermedad de Graves (EG) y la predicción de recidivas. Los nuevos ensayos de 3ª generación tienen sensibilidad mayor al 99% y exactitud diagnóstica significativamente superior a los ensayos de 1ª y 2ª generación. **Objetivos:** Establecer el grado de concordancia diagnóstica de valores de TRAbs obtenidos por un ensayo de 1ª generación y uno de 3ª generación y analizar la capacidad de detección de TRAbs de ambos métodos. **Materiales y métodos:** Se midieron TRAbs en 44 muestras de pacientes utilizando un ensayo de 1ª generación basado en la inhibición de la unión de TSH-I¹²⁵ a receptores porcinos solubilizados (TBII-RIA) y un ensayo de 3ª generación que emplea un anticuerpo humano monoclonal estimulante de tiroides marcado con biotina (TBII-EQLIA). **Análisis estadístico:** para establecer la concordancia diagnóstica se calculó el índice Kappa (k); se consideró grado de acuerdo bueno para los valores de $k = 0,6$ a $0,8$. **Resultados:** De las 44 muestras, 30 fueron positivas por TBII-EQLIA y 30 por TBII-RIA. El 86% (38 muestras) dieron resultados concordantes por ambos métodos. De las 6 discordantes, 3 pacientes con EG fueron positivos por TBII-EQLIA y negativos por TBII-RIA. De las otras 3 muestras, positivas por TBII-RIA pero negativas por TBII-EQLIA, sólo una correspondió a un paciente con EG. TBII-RIA tuvo 2 falsos positivos. **Conclusiones:** En pacientes con EG, el método de 3ª generación detectó un mayor número de TRAbs positivos. La concordancia diagnóstica entre TBII-EQLIA y TBII-RIA fue buena, lo cual evidencia que ambos métodos tienen similar utilidad en la práctica clínica para identificar pacientes hipertiroides con EG y realizar el control y seguimiento de su terapia. TBII-EQLIA sería una mejor alternativa que los ensayos manuales por su rapidez y sensibilidad.

Palabras Clave: Enfermedad de Graves, TRAbs, EQLIA, TBII, Concordancia diagnóstica.

¹Bioquímico. Laboratorio GEA – Córdoba - Argentina.

²Bioquímico. Laboratorio Central – Sanatorio Allende – Córdoba - Argentina.

³Bioquímico especialista en endocrinología. Laboratorio Central – Sanatorio Allende – Córdoba - Argentina.

✉ Julieta Martín
julietamartin@outlook.com

BIOQUINFORMA DIGITAL

Publicación on-line del Colegio de Bioquímicos de la Provincia de Córdoba (ISSN: 2344-9926)

INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Graves (EG) es la causa más común de hipertiroidismo, con una proporción de 60 a 80% en pacientes hipertiroides. La incidencia depende de factores regionales, especialmente la ingesta de yodo¹⁻³. El pico de incidencia de la enfermedad se encuentra entre los 40 y los 60 años y es más prevalente en mujeres que en varones, habiéndose reportado una razón mujer/varón entre 4/1 y 10/1³⁻⁵.

La EG es causada por la presencia de autoanticuerpos que se unen y activan el receptor de TSH (TSHR) en forma continua y no controlada, induciendo hipertrofia e hiperplasia de las células tiroideas e hipersecreción de triiodotironina (T3) y tiroxina (T4)⁶. El diagnóstico de hipertiroidismo se realiza en base a los hallazgos clínicos de tirotoxicosis, bocio difuso, oftalmopatía y dermopatía y la medición de tirotrófina (TSH) y tiroxina libre (T4L). Sin embargo, 2-4% de los pacientes presentan niveles normales de T4L y elevados de T3 total o libre (T3L) en estadios tempranos de la enfermedad, por lo que se recomienda la medición en suero de TSH, T4L y T3L^{7,8}.

El diagnóstico de la EG es simple cuando aparecen signos y síntomas característicos de hipertiroidismo junto con bocio. Sin embargo, en pacientes sin hipertiroidismo obvio o signos oculares y con bocio nodular, la EG debe diferenciarse de otras posibles causas de hipertiroidismo como adenoma tóxico o bocio multinodular tóxico. En la práctica clínica la determinación de anticuerpos anti-receptor de TSH (TRAbs) es de utilidad para establecer si la causa del hipertiroidismo es la EG. Por otro lado, se ha demostrado la importancia de la valoración de TRAbs en el seguimiento de pacientes con EG bajo tratamiento, en la predicción de recidivas y en mujeres embarazadas con EG actual o previa, para predecir el riesgo de hipertiroidismo neonatal en el recién nacido⁹⁻¹³.

Para la detección de los TRAbs se pueden emplear bioensayos o inmunoensayos. Los bioensayos se basan en la capacidad de los TRAbs de estimular el sistema adenilato ciclasa de células en cultivo, mientras que los inmunoensayos se basan en la capacidad de los TRAbs de competir con TSH por los sitios de unión al TSHR^{14,15}. La determinación de TRAbs en la rutina clínica se lleva a cabo por inmunoensayos competitivos. Los ensayos de 1ª generación utilizan receptores porcinos solubilizados y TSH-I¹²⁵ bovina, los de 2ª generación emplean receptores porcinos o humanos recombinantes fijados a tubos o microplacas y los de 3ª generación utilizan M22, un anticuerpo humano monoclonal estimulante de tiroideas que sustituye el uso de TSH marcada¹⁵⁻¹⁸. Estos nuevos ensayos de 3ª generación tienen una sensibilidad diagnóstica mayor al 99% y una exactitud diagnóstica significativamente superior a los ensayos de 1ª y 2ª generación^{19,20}. Si bien estos métodos no distinguen entre anticuerpos

estimulantes y anticuerpos bloqueantes, es razonable pensar que un resultado positivo en un paciente con hipertiroidismo es debido a la presencia de TRAbs estimulantes.

Los objetivos de este trabajo fueron: establecer el grado de concordancia diagnóstica de los valores de TRAbs entre un método manual de 1ª generación y uno automatizado de 3ª generación en una población de pacientes adultos y analizar la capacidad de detección de los TRAbs de ambos métodos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 44 muestras de suero de pacientes que en forma consecutiva concurren al Laboratorio Central del Sanatorio Allende entre marzo y junio del año 2015 para el control de la función tiroidea. Se seleccionaron las muestras con valores de TRAbs distribuidos en todo el rango de medición del método TBII-RIA (5-405 u/L). El grupo estudiado estuvo integrado por 6 hombres y 38 mujeres, con un rango etario de 17 a 65 años (\bar{x} = 38 años). Treinta y siete de ellos eran pacientes con EG, (31 bajo tratamiento con drogas antitiroideas, 2 tiroidectomizados y 4 habían recibido dosis ablativa de Iodo¹³¹). Los 7 restantes fueron estudiados por otras causas (aborto espontáneo, síncope, etc).

Las muestras de sangre se extrajeron en condiciones de ayuno en tubos con gel separador. Los tubos se centrifugaron inmediatamente y el suero obtenido se conservó en freezer, a -20°C, hasta el momento del análisis. Se determinaron los niveles de TSH y T4L en los 44 pacientes; en 29 de ellos se valoraron además T3 o T3L o ambas. Las concentraciones de TSH, T4L, T3 y T3L fueron determinadas por electroquimioluminiscencia (EQLIA) en Cobas e411 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania).

Para la medición de TRAbs se emplearon dos métodos basados en la inhibición de la unión de TSH o M22 al TSHR (TBII): un ensayo manual de 1ª generación (TBII-RIA), (RSR Limited, Cardiff, United Kingdom) y un ensayo automatizado de 3ª generación (TBII-EQLIA) (Cobas e411, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania).

El método TBII-RIA se basa en la inhibición por los autoanticuerpos del paciente de la unión de TSH-I¹²⁵ a receptores porcinos solubilizados (pTSHR). Después de incubar la muestra de suero con pTSHR, se realiza una segunda incubación agregando TSH-I¹²⁵ que interactúa

con los TSHR no bloqueados por TRAbs. El complejo pTSHR-TSH-I¹²⁵ se trata con polietilenglicol 16,5%, se centrifuga, se descarta el sobrenadante, se leen las cuentas por minuto (cpm) del precipitado y se calcula la concentración de TRAbs. El método está calibrado con el estándar B-MRC LATS (*Medical Research Council*). Las líneas de corte establecidas para este ensayo son: <10 u/L (valores negativos), ≥15 u/L (valores positivos) y 10-15 u/L (positivos *borderline*)¹⁵. En las muestras determinadas por TBII-RIA, se obtuvieron valores de TRAbs distribuidos en todo el rango de medición del método (5-405 u/L).

El método TBII-EQLIA emplea un anticuerpo humano monoclonal estimulante de tiroides (M22) en lugar de TSH-I¹²⁵. M22, marcado con rutenio (M22-Ru), compite con los autoanticuerpos séricos del paciente por el pTSHR²¹. En una primera incubación, los autoanticuerpos del paciente se unen al pTSHR que se halla inmunocomplejado con un anticuerpo monoclonal de ratón biotinilado (pTSHR-biotina). En la segunda incubación, M22-Ru ocupa los sitios remanentes de pTSHR-biotina; posteriormente, los inmunocomplejos biotinilados se fijan a micropartículas magnéticas recubiertas de estreptavidina que son capturadas sobre la superficie de un electrodo donde ocurre la reacción electroquimioluminiscente. Este método ha sido estandarizado con el primer estándar internacional 90/672 del NIBSC (*National Institute for Biological Standards and Control*). El valor de corte del ensayo es 1,75 UI/L.

Análisis estadístico: para establecer la concordancia se calculó el índice Kappa (k); se consideró grado de acuerdo bueno k= 0,61 a 0,8 (escala de Landis y Koch).

RESULTADOS

La Tabla 1 muestra el rango de valores de TSH, T4L, T3 y T3L hallados en el grupo de pacientes estudiados (n=44).

En el análisis de los resultados obtenidos por los dos métodos, 30 muestras (68%) fueron positivas por TBII-EQLIA y 30 (68%) positivas por TBII-RIA. En 38 muestras (86%) los resultados fueron concordantes por ambos métodos (Tabla 2). De los 6 resultados discordantes, 3 de ellos, correspondientes a pacientes con EG, fueron positivos por TBII-EQLIA y negativos por TBII-RIA. Las otras 3 muestras, positivas por TBII-RIA pero negativas por TBII-EQLIA, tuvieron valores

de TBII-RIA en el rango positivo *borderline* (≥10-15 u/L); de ellas, sólo una correspondió a un paciente con EG y tuvo un valor por EQLIA de 1,59 UI/L, cercano a la línea de corte. El índice de concordancia *k* fue 0,69 (considerado grado de acuerdo bueno).

DISCUSIÓN

Los TRAbs son un grupo heterogéneo de anticuerpos con diferentes funcionalidades. Son 3 las variedades reconocidas: TRAbs estimulantes, TRAbs bloqueantes y TRAbs neutros. Cada uno de ellos se une a diferentes regiones del TSHR^{22,23}. Puede ocurrir la producción simultánea de estas variedades de TRAbs en el mismo paciente, por lo que sus concentraciones relativas definen el cuadro clínico y la progresión de la EG. La detección de TRAbs se realiza a través de bioensayos o inmunoensayos. Los bioensayos miden la actividad funcional de los TRAbs, mientras que los inmunoensayos miden la unión de estos autoanticuerpos al TSHR sin diferenciar si son estimulantes o bloqueantes. Los bioensayos miden la capacidad de TRAbs estimulantes de producir AMPc en líneas celulares transfectadas con TSHR. Tienen mayor sensibilidad que los inmunoensayos pero no son aplicables como métodos de rutina en laboratorios de análisis clínicos^{14,24,25}.

En este trabajo se evaluó el nivel de concordancia en la detección de TRAbs entre dos inmunoensayos basados en la inhibición de la unión del receptor al trazador marcado que utilizan principios analíticos diferentes.

El grupo de pacientes estudiados incluyó 6 hombres y 38 mujeres, de los cuales 37 tenían diagnóstico de EG, mientras que los 7 restantes fueron estudiados por otras causas como aborto espontáneo, síncope, etc. Los pacientes con EG habían sido tratados con algunas de las siguientes modalidades terapéuticas: drogas antitiroideas, ablación con Iodo 131 o cirugía. Por lo tanto, al momento del estudio, el rango obtenido de las concentraciones de TSH, T4 total y libre y T3 total y libre fue muy amplio para cada una de las hormonas (Tabla 1).

En el presente trabajo el número de mujeres con EG (n=32) fue mayor al de hombres (n=5), hallazgo similar a lo publicado en la literatura que refiere una razón mujer/hombre entre 4/1 y 10/1^{3,5}. La EG, a semejanza de otras enfermedades autoinmunes, es más prevalente en mujeres, habiéndose sugerido un rol de factores

hormonales en su patogénesis, particularmente de los estrógenos. Se ha demostrado que las hormonas sexuales son capaces de modular la proliferación celular y la producción de citoquinas de varios tipos celulares incluyendo las células del sistema inmune. Evidencias sobre la asociación entre la expresión del receptor de estrógenos (ER) y el desarrollo de la EG o entre el gen ESR2 que codifica el ER y la susceptibilidad de padecer EG, sugieren que los estrógenos pueden ser un factor de promoción de la enfermedad. Sin embargo, otros autores no encontraron tal asociación²⁶⁻²⁸.

En el análisis de concordancia entre TBII-RIA y TBII-EQLIA se observó coincidencia en los resultados en el 86% de los pacientes, obteniéndose un índice k igual a 0,69, considerado un grado de acuerdo bueno. Estos resultados fueron similares a los encontrados por otros grupos de Argentina cuando compararon estos métodos de 1ª y 3ª generación en poblaciones pediátricas y de adultos. Fenili C y col.²⁹, mostraron buena correlación entre ambos métodos y una concordancia de 93% en pacientes hipertiroideos; en 2 trabajos del grupo de Smithuis F y col.^{30,31}, los coeficientes kappa fueron 0,675 y

0,687 en pacientes con sospecha de EG o EG confirmada. Para Delfino L y col.³² ambos métodos tuvieron una muy buena correlación (r 0,80) con una concordancia diagnóstica del 78,6%. En una población de niños con hipotiroidismo o hipertiroidismo, Rodríguez M y col.³³, reportaron una correlación positiva entre TBII-RIA y TBII-EQLIA y un índice $k = 0,70$.

No obstante, en el presente trabajo se obtuvieron 2 falsos positivos con el método de TBII-RIA de 1ª generación. Estas muestras tuvieron valores de TRAbs en el rango denominado por el fabricante como "positivo *borderline*". Otros autores también reportaron discordancia entre las muestras cuando los resultados se encontraban cercanos a los valores de corte de ambos métodos^{29,33}.

Las discrepancias obtenidas en los resultados entre ambos métodos pueden deberse a múltiples razones: a) el error asociado a la técnica manual, b) la accesibilidad de los diferentes epitopes del pTSHR solubilizado, c) la mezcla heterogénea de TRAbs en sueros de pacientes con EG (anticuerpos con diferentes actividades funcionales o que pueden interferir en algunos ensayos), d) el empleo de moléculas diferentes con distinta marcación en la competencia por el

Tabla 1- Rango y valores de referencia de TSH, T4 libre, T3 total y T3 libre en suero de los pacientes estudiados (n=44).

<u>Analito</u>	<u>Rango</u>	<u>Valores de referencia (p2,5-p97,5)</u>
TSH (<u>μIU/mL</u>)	0,01-8,53	0,27-4,20
T4 libre (<u>ng/dL</u>)	0,69-5,86	0,93-1,70
T3 total (<u>ng/dL</u>)	88-505	80-200
T3 libre (<u>pg/dL</u>)	2,9-23,7	2,0-4,4

Tabla 2: Concordancia entre TBII-RIA y TBII-EQLIA

		TBII-RIA		Total
		≥ 10 u/L (+)	< 10 u/L (-)	
TBII-EQLIA	$\geq 1,75$ UI/L (+)	27	3	30
	$< 1,75$ UI/L (-)	3	11	14
Total		30	14	44

TBII-RIA= ensayo de 1ª generación, TBII-EQLIA= ensayo de 3ª generación.

pTSHR (TSH-I¹²⁵ o M22-Ru), e) las diferencias en la matriz de los inmunoensayos, f) la calibración de los métodos con distintos estándares internacionales.³⁴ En relación a este último punto, los métodos utilizados en el presente estudio fueron calibrados con estándares internacionales diferentes: B-MRC LATS para TBII-RIA (pool de sueros calibrado con un estándar de referencia denominado LATS-B) y el 1^{er} estándar internacional 90/672 para TBII-EQLIA (proteínas liofilizadas de un suero de embarazada con altos niveles de TRAbs). Esto podría explicar la amplia diferencia en los rangos de medición y líneas de corte de estos dos métodos. Sin embargo, Massart C y col.^{34,35} han reportado una alta variabilidad entre inmunoensayos de 2^a y 3^a generación que fueron calibrados con el mismo estándar de referencia, 90/672. Estos autores han sugerido la necesidad de armonizar los métodos para un correcto seguimiento de los pacientes con EG.

TBII-EQLIA de 3^a generación fue el primer método totalmente automatizado que se desarrolló para la medición de TRAbs. Estudios de comparación con métodos manuales de 1^a, 2^a y 3^a generación demostraron un desempeño analítico comparable o superior al de los métodos existentes, independientemente de si el TSHR era porcino o recombinante humano^{13,25}. En el presente estudio se observó que la detección de TRAbs positivos en los pacientes con EG fue mayor con el método de 3^a generación; 3 de ellos fueron positivos por TBII-EQLIA y negativos por TBII-RIA. Los ensayos de 2^a y 3^a generación han demostrado mayor sensibilidad diagnóstica (SD) que los de 1^a generación en el diagnóstico y seguimiento de pacientes con EG (entre 92,9% y 98,2% para ensayos de 2^a y 3^a generación y entre 68,4% y 85% para ensayos de 1^a generación), sin embargo, la especificidad ha sido similar para todos los métodos (entre 97% y 100%)^{9,20,36-39}.

La ventaja principal del sistema TBII-EQLIA automatizado en relación a los métodos manuales es la reducción en el tiempo de obtención de resultados, pudiendo ser integrado rutinariamente al flujo de trabajo de los laboratorios¹³. Como desventaja del método, se puede mencionar el hallazgo de falsos positivos en muestras de sangre de cordón heparinizadas. El efecto se observó con heparina-sodio y heparina-litio, por lo que se sugirió que la heparina sería la responsable de este fenómeno⁴⁰. Recientemente se han desarrollado nuevos inmunoensayos automatizados de 3^a generación que permiten

detectar TRAbs estimulantes. Estos métodos que emplean TSHR quiméricos y se basan en la interacción del autoanticuerpo estimulante con el dominio extracelular del TSHR, todavía necesitan ser validados^{41,42}.

En conclusión, si bien la metodología EQLIA mostró una mayor capacidad para la detección de los TRAbs, la concordancia entre TBII-EQLIA y TBII-RIA fue buena, implicando que ambos métodos tienen similar utilidad en la práctica clínica para identificar y realizar el seguimiento de pacientes hipertiroideos con EG.

La carencia de estandarización entre los ensayos de TRAbs continúa siendo un problema importante, por lo que el control de la terapia debe realizarse siempre con el mismo método.

El método TBII-EQLIA de 3^a generación brinda una mejor alternativa a los ensayos de TRAbs manuales para el diagnóstico diferencial del hipertiroidismo debido a la rapidez y mayor SD del método.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Laurberg P, Jørgensen T, Perrild H, Ovesen L, Knudsen N, Pedersen IB y col. The Danish investigation on iodine intake and thyroid disease, DanThyr: status and perspectives. *Eur J Endocrinol* 2006;155(2):219-28.
2. Laurberg P, Cerqueira C, Ovesen L, Rasmussen LB, Perrild H, Andersen S y col. Iodine intake as a determinant of thyroid disorders in populations. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2010;24(1):13-27.
3. Vanderpump MP. The epidemiology of thyroid disease. *Br Med Bull* 2011;99:39-51.
4. Hussain YS, Hookham JC, Allahabadia A, Balasubramanian SP. Epidemiology, management and outcomes of Graves' disease-real life data. *Endocrine* 2017;56(3):568-78.
5. Weetman AP. Graves' Disease. *N Engl J Med* 2000;343:1236-48.
6. Kendall-Taylor P. Effects of long-acting thyroid stimulator (LATS) and LATS protector on human thyroid adenyl cyclase activity. *Br Med J* 1973;3(5871):72-5.
7. Bartalena L, Bogazzi F, Chiovato L, Hubalewska-Dydejczyk A, Links TP, Vanderpump M. 2018 European Thyroid

- Association (ETA) Guidelines for the Management of Amiodarone-Associated Thyroid Dysfunction. *Eur Thyroid J* 2018;7(2):55-66.
8. Ross DS, Burch HB, Cooper DS, Greenlee MC, Laurberg P, Maia AL y col. 2016 American Thyroid Association Guidelines for Diagnosis and Management of Hyperthyroidism and Other Causes of Thyrotoxicosis. *Thyroid* 2016;26(10):1343-421.
 9. Cho BY. Clinical applications of TSH receptor antibodies in thyroid diseases. *J Korean Med Sci* 2002;17:293-301.
 10. Okamoto Y, Tanigawa SI, Ishikawa K, Hamada N. TSH receptor antibody measurement and prediction of remission in Graves' disease patients treated with minimum maintenance doses of antithyroid drugs. *Endocr J* 2006;53:467-72.
 11. Izumi Y, Takeoka K, Amino N. Usefulness of the 2nd generation assay for anti-TSH receptor antibodies to differentiate relapse of Graves' thyrotoxicosis from development of painless thyroiditis after antithyroid drug treatment for Graves' disease. *Endocr J* 2005;52(4):493-7.
 12. Winter WE. Thyrotropin Receptor Antibody Assays. Clinical Utility. *Am J Clin Pathol* 2013;139:140-2.
 13. Hermsen D. Technical evaluation of the first automated assay for the detection of TSH receptor autoantibodies. *Clin Chim Acta* 2009;401:84-9.
 14. Vitti P, Rotella CM, Valente WA, Cohen J, Aloj SM, Laccetti P, y col. 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. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;57:782-91.
 15. Rootwelt K. Evaluation of a radioreceptor assay for TSH receptor autoantibodies. *Scand J Clin Lab Invest* 1988;48(2):157-64.
 16. Costagliola S, Morgenthaler NG, Hoermann R, Badenhoop K, Struck J, Freitag D y col. Second generation assay for thyrotropin receptor antibodies has superior diagnostic sensitivity for Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:90-7.
 17. Kamijo K. TSH-receptor antibody measurement in patients with various thyrotoxicosis and Hashimoto's thyroiditis: a comparison of two two-step assays, coated plate ELISA using porcine TSH-receptor and coated tube radioassay using human recombinant TSH-receptor. *Endocr J* 2003;50(1):113-6.
 18. Smith BR, Bolton J, Young S, Collyer A, Weeden A, Bradbury J y col. A new assay for thyrotropin receptor autoantibodies. *Thyroid* 2004;14(10):830-5.
 19. Kamijo K, Ishikawa K, Tanaka M. Clinical evaluation of 3rd generation assay for thyrotropin receptor antibodies: the M22-biotin-based ELISA initiated by Smith. *Endocr J* 2005;52(5):525-9.
 20. Schott M, Hermsen D, Broecker-Preuss M, Casati M, Mas JC, Eckstein A y col. Clinical value of the first automated TSH receptor autoantibody assay for the diagnosis of Graves' disease (GD): an international multicentre trial. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2009; 71(4):566-73.
 21. Hermsen D, Broecker-Preuss M, Casati M, y col. Development of a new automated assay for thyrotropin receptor autoantibodies on the Elecsys system. *Clin Chim Acta* 2009;401:84-9.
 22. Chen CR, Pichurin P, Nagayama Y, Latrofa F, Rapoport B, McLachlan SM. The thyrotropin receptor autoantigen in Graves' disease is the culprit as well as the victim. *J Clin Invest* 2003;111:1897-904.
 23. Chazenbalk GD, Pichurin P, Chen CR, Latrofa F, Johnstone AP, McLachlan SM y col. Thyroid-stimulating autoantibodies in Graves' disease preferentially recognize the free A subunit, not the thyrotropin holoreceptor. *J Clin Invest* 2002;110(2):209-17.
 24. Leschik JJ, Diana T, Olivo PD, König J, Krahn U, Li Y y col. Analytical performance and clinical utility of a bioassay for thyroid-stimulating immunoglobulins. *Am J Clin Pathol* 2013;139(2):192-200.
 25. Syme NR, D Toft AD, Stoddart M, Beckett GJ. Clinical performance of the Roche cobas e411 automated assay system for thyrotropin-receptor antibodies for the diagnosis of Graves' disease. *Ann Clin Biochem* 2011;48:471-3.
 26. Kisiel B, Bednarczyk T, Kostrzewa G, Kosińska J, Miśkiewicz P, Płazińska MT y col. Polymorphism of the oestrogen receptor beta gene (ESR2) is associated with susceptibility to Graves' disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008;68(3):429-34.

27. Domszlawski P, Podhorska-Okolow M, Pula B, Lukieniczuk T, Dziegiel P. Expression of estrogen and progesterone receptors and Ki-67 antigen in Graves' disease and nodular goiter. *Folia Histochem Cytobiol.* 2013;51(2):135-40.
28. Wang S, Mao S, Zhao G, Wu H. Relationship between estrogen receptor and Graves' disease. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi.* 2000 Aug;38(8):619-21.
29. Fenili CA, Terruzzi P, Noretto S, Damilano SA. Anticuerpos antireceptor de TSH (TRAB): su análisis por un método de 3ª generación □Resumen□. *RAEM* 2009;46:151.
30. Smithuis F, Espósito S, Oneto A, Gamez JM, Rosmino J, Chebel, G y col. Evaluación del desempeño analítico de una metodología automatizada para la detección de anticuerpos anti receptor de TSH □Resumen□. *RAEM* 2015;52(S).
31. Oneto A, Smithuis F, Fabbro MD, Vanden Ryn R, Fadel AM, Chebel G y col. Anticuerpo anti receptor de TSH (TRAb): Conversión de valores entre dos metodologías de diferente generación en el seguimiento de pacientes con Enfermedad de Graves □Resumen□. XI Congreso de la Federación Argentina de Sociedades de Endocrinología (FASEN) 2016:TOR053. Disponible en:<http://www.congresofasen.com.ar/wp-content/plugins/pdf-viewer-for-wordpress/web/viewer.php?file=http://www.congresofasen.com.ar/trabajos-aceptados-fasen-2016/tor053.pdf>
32. Delfino L, Ilera V, Zunino A, Gauna A. Anticuerpos anti-receptor de TSH: impacto clínico de dos metodologías diferentes □Resumen□. *RAEM* 2017;54(S).
33. Rodríguez MP, Zaidman V, Gazek N, Herzovich V, Maceiras M, Dujovne N y col. Good agreement between two methods of 1st and 3rd generation for the detection of autoantibodies to the thyrotrophin receptor (TRAbs) □Resumen□. XXVI Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Endocrinología Pediátrica (SLEP) 2016;P034. Disponible en:https://www.researchgate.net/profile/Juan_Lazzati/publication/310424687_Good_Agreement_between_Two_Methods_-_of_1st_and_3rd-Generation_for_the_Detection_of_Autoantibodies_to_the_Thyrotrophin_Receptor_TRAbs/links/582c8cf808ae138f1bfe2e5d/Good-Agreement-between-Two-Methods-of-1st-and-3rd-Generation-for-the-Detection-of-Autoantibodies-to-the-Thyrotrophin-Receptor-TRAbs
34. Massart C, Gibassier J, d'Herbomez M. Clinical value of M22-based assays for TSH-receptor antibody (TRAb) in the follow-up of antithyroid drug treated Graves' disease: comparison with the second generation human TRAb assay. *Clin Chim Acta* 2009; 407:62-6.
35. Massart C, Sapin R, Gibassier J, Agin A, d'Herbomez M. Inter-method variability in TSH-receptor antibody measurement: implication for the diagnosis of Graves' disease and for the follow-up of Graves' ophthalmopathy. *Clin Chim Acta* 2009;55:183-6.
36. Giovanella L, Ceriani L, Garancini S. Evaluation of the 2nd generation radio-receptional assay for anti-TSH receptor antibodies (TRAb) in autoimmune thyroid diseases. Comparison with 1st generation and anti-thyropoxidase antibodies (AbTPO). *Q J Nucl Med* 2001;45(1):115-9.
37. Schott M, Feldkamp J, Bathan C, Fritzen R, Scherbaum WA, Seissler J. Detecting TSH-receptor antibodies with the recombinant TBII assay: technical and clinical evaluation. *Horm Metab Res* 2000;32(10):429-35.
38. Kamijo K, Ishikawa K, Tanaka M. Clinical evaluation of 3rd generation assay for thyrotropin receptor antibodies: The M22-biotin-based ELISA initiated by Smith. *Endocr J* 2005;52:525-9.
39. Liu C, Hermsen D, Domberg J, Graeber C, Hautzel H, Duan Y y col. Comparison of M22-based ELISA and human-TSH-receptor-based luminescence assay for the measurement of thyrotropin receptor antibodies in patients with thyroid diseases. *Horm Metab Res* 2008;40(7):479-83.
40. Wada M, Kita M, Kawasaki K, Kusakabe T, Tagami T, Satoh-Asahara N y col. False-positive TSH receptor antibody—a pitfall of third generation TSH receptor antibody measurements in neonates. *Endocr J* 2018;65(5):587-92.
41. Fabbro MD, Smithuis F, Thomas G, Chebel G, Fadel AM, Aranda C y col. Concordancia diagnóstica entre anticuerpos contra el receptor de TSH (TRAB) y anticuerpos estimulantes del receptor de TSH (TSI) □Resumen□. *RAEM* 2017;54(S).

42. 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 Immun Highlights* 2018;9:3.