

Klinisyenler İçin Tiroglobulin Ölçüm Yöntemleri
Thyroglobulin Measurement Methods for Clinicians
Uğur Alp Göksu¹

¹Özel Medstar Antalya
Hastanesi

Sorumlu Yazar:

Uğur Alp GÖKSU

Yıldız Mah. Çakırlar Sok.
No:19 Muratpaşa -Antalya.

alpgoksu@yahoo.com.tr

Özet

Son yıllarda differansiye tiroid kanseri görülme sıklığı belirgin şekilde artmaktadır. Tiroglobulin sadece tiroid follikül hücresinde sentezlenmesi ve dolaşıma verilmesi DTK'li hastaların takibinde tümör belirteci olarak kullanılmasını sağlamıştır. Günümüzde standart takip, Tg ölçümü ve boyun ultrasonografisini içermektedir. Uygun endikasyonda tüm vücut iyot taraması yapılabilir. Klinik rehberlerde küçük odakların saptanmasında suboptimal sensitiviteye sahip Tg ölçümlerin kullanılması durumunda ekzojen veya endojen TSH uyarımı sonrası Tg ölçümü önerilmektedir. Bununla birlikte günümüzde yüksek sensitivite oranlarına sahip metotların kullanılmasıyla, TSH uyarımına gerek olmadan çok düşük konsantrasyonlardaki Tg'nin doğru saptanmasını, bazı dezavantajlarına rağmen, sağlamaktadır. Tg'nin hangi yöntemle bakıldığı, anti tg ve heterofil antikor varlığında olabilecek değişikliği bilerek kullanılması klinisyen için önemlidir. Klinisyenler tarafından bu yeni metotların avantaj ve dezavantajının bilinmesi, hem serum hem de Tg-yıkama sonuçlarının doğru değerlendirilerek, hastaya gereksiz tetkik yapılmasını önleyecektir.

Anahtar kelimeler: Tiroglobulin, Tiroglobulin ölçüm yöntemleri, İnterferans

Abstract

The frequency of differentiated thyroid cancer has increased markedly in recent years. Thyroglobulin is synthesized only in the thyroid follicle cell and given to the circulation, it has been used as a tumor marker in the follow-up of patients with DTC. Currently standart follow up DTC comprises Tg measurement and neck ultrasound. In adequate indication whole body radioiodine scan make up. Clinical guidelines recommended that, measurement of Tg after stimulation by endogenous or exogenous TSH to detect occult disease focus when suboptimal sensitivity of Tg assays used. However, nowadays, highly sensitivity methods used with despite of disadvantage, without the need TSH stimulation, at very low Tg concentrations ensured correct detection. In which methods used for Tg assays and possible change in the presence of thyroglobuline and heterophile antibody very important for clinicians. This new methods to be know the advantages and disadvantages by clinicians, the results of serum and Tg washout evaluated corretly, prevented the patient's unnecessary investigation.

Keywords: Thyroglobulin, Thyroglobulin Measurement methods, İnterferance

Giriş

Differansiye tiroid kanserleri (DTK), tüm kanserlerin yaklaşık %1'ini içerir ve aynı zamanda endokrin kanserler içerisinde de en sık görülendir (1). Tiroglobulin (Tg) tiroid glandında folliküler lümende kolloid içinde depolanan ve tiroid hormonun sentezi için substrat görevi gören bir glikoproteindir. Tiroide spesifik protein olan Tg tümör takibinde önemlidir (2). Total tiroidektomi ve radyoaktif iyot

tedavisi sonrası, serum Tg düzeylerinde artış tiroid kanserinin rekürrens veya persistans durumuna işaret etmektedir (3). Tg'nin ölçümündeki teknik ilerleme, DTK'in takibinde önemli başarı sağlamıştır (4). Boyun ultrasonografi ile Tg'nin birlikte değerlendirilmesi DTK'li hastaların takibinde standart yaklaşım olmuştur.

Teknolojik ilerlemeler sayesinde yeni jenerasyon Tg ölçüm yöntemleri geliştirilmiştir (5,6). Yeni ölçüm tekniklerinin, sensitivitelerinin iyi olması, DTK'li hastalarda tiroid hormon replasmanı sırasında, serumda saptanamayacak derecedeki düşük Tg değerlerinde, TSH uyarı testine olan ihtiyacı azaltmıştır (5-7). Güncel literatür bilgileri eşliğinde uluslararası gruplar, 2012 yılında Zurih ve 2013 yılında Leiden toplantılarında, DTK değerlendirmesi için, yüksek sensitivite değerine sahip Tg ölçüm metotlarının değerlendirilmesi için görüş bildirmişlerdir (8).

Anti-tg pozitifliği, kullanılan ölçüm yöntemine göre Tg'nin yanlılıkla düşük veya yüksek sonuç vermesine neden olabilmektedir (9). Anti-tg titresinde yükselme hastalık progresyonu göstermesi açısından değerli olabilir (10,11). Bu hastalar klinik olarak önemli olmayan persistant veya rekürrent küçük odak için ek laboratuvar ve radyolojik tetkiklerin yapılmasına neden olmaktadır (2,4,12).

Tg ölçümünde sırasıyla immünoassay (RIA), immünometrik (IMA) ve kütle spektrometrik (Tg-MS) gibi yeni yöntemler kullanılmaktadır.

Tg ölçümünde; fonksiyonel sensitivitenin <1 µg/dl olmasına, BCR-457 sertifikalı referansın kullanılmasına, aynı örnekte anti-tg'nin çalışılmasına ve takipte aynı metotun kullanılmasına dikkat

edilmesi önerilmektedir. Metotun, Tg ile interferansı önleyen ve daha doğru sonuç verecek şekilde gelişmesi amaçlanmaktadır (13).

Bizim amacımız, klinisyenlerin Tg'yi değerlendirirken, hangi ölçüm metotunun uygulandığını, bunların avantaj ve dezavantajlarını bilerek tedavinin düzenlenmesine katkı sağlamak olacaktır.

Tg ölçüm yöntemleri

Tg'nin serum düzeylerinin ölçülmesi, DTK'lı hastaların takip edilmesinde önemli rol oynamaktadır. Tg düzeylerinin artması rezidüel doku veya tekrarlayan hastalığı belirtirken, serumda düzeyi saptanamayan Tg ile artmış TSH düzeyi ise hastanın tümör bakımından temiz olduğunu gösterir⁸.

Ölçümlerdeki teknolojik ilerlemeye rağmen Tg değerlendirmesinde interferans önlenememiştir. Tg ölçümü genelde immün ve Tg-MS yöntemleriyle yapılmaktadır (13,14). İmmüno yöntem, RIA ve IMA olarak ikiye ayrılmaktadır. Bu yöntemlerin anti-tg ve heterofil antikor(HA) varlığında spesifite, sensitivite ve duyarlılıkları farklıdır. Yöntemlerin fonksiyonel sensitivite değerlerinin bilinmesi önerilmektedir. Tg için fonksiyonel sensitivite; 6-12 aylık periyot içinde en az iki değişik reaktif ve iki cihazla yapılan kalibrasyon işlemi, serumda Tg değişim katsayısının yaklaşık %20 olduğunda ölçülen en düşük Tg konsantrasyonudur (15). Laboratuvarlar, anti-tg negatif hasta değerlerinden hareketle fonksiyonel sensitivitenin klinik olarak anlamlı değerini bildirmelidirler. İlk jenerasyon ölçümlerinde Tg'nin fonksiyonel sensitivite değeri 0.5-1 µg/L, ikinci jenerasyonda ise <0.1 µg/L olarak saptanmıştır (16).

Tg ölçümlerinde, BCR 457 sertifikasyonundan önce, uygulanan yöntemlere göre %60'a varan farklı sonuçlar bildirilmekteydi (17). BCR457'nin referans olarak alınmasıyla değişkenlik önemli oranda azalmıştır. Buna rağmen aynı serumun farklı yöntemlerle ölçümünde Tg konsantrasyonlarında farklılık olabilmektedir (14,18). Bu duruma Tg izoformlarının etkisi olacağı düşünülmüştür. BCR457; tiroid glandında bulunan Tg ile hazırlanırken, dolaşımda bulunan Tg'nin moleküler konfigürasyonu farklıdır. Normal tiroid hücresiyle karşılaştırıldığında, tümör hücresindeki glikolizasyon ve iyodinasyon işlemi heterojenite, Tg epitoplarında maskelenmeye veya mağruziyete neden olarak Tg immünoreaktivitesini değiştirmektedir (14,19). Postoperatif dönem takipte, Tg'nin aynı yöntem ve aynı laboratuvarında çalışılması önemlidir.

RIA metotları

Tg-RIA yöntemi; 1970'li yıllarda tiroid kanserli hastaların tüm vücut radyoaktif sintgrafi sonrası tamamlayıcı yöntem olarak kullanılmıştır (14). Başlangıçta Tg-RIA fonksiyonel sensitivite aralığı 5-15µg/L olarak saptanmıştır (14,20,21). Bu değerler persistant hastalığı olup çok düşük Tg değerlerin saptanmasında yetersiz kalmıştır. Tg-RIA'nın klinik sensitivitesi %72-98 aralığında değişmektedir. Günümüzde Tg-RIA'nın tiroid kanser hastalarında kullanımını sınırlıdır. Bu yöntem çalışmalarda, özellikle Tg'nin, IMA yöntemiyle antikorla olan interferans etkisini göstermede altın standart olarak kullanılmaktadır (18,22,23).

Anti-tg interferansına karşı genelde dirençli olmasına rağmen, Tg-RIA

sonuçları yanlışlıkla düşük veya yüksek saptanabilmektedir (24-26). Netzel ve arkadaşları; Tg-RIA sonuçlarının, hem Tg hem de anti-tg konsantrasyonuna bağlı olduğunu göstermişlerdir (27). Anti-tg olduğunda, Tg konsantrasyonu(Tg:1µg/L) Tg-RIA yöntem ile ölçüldüğünde, yaklaşık 2-11 kat aralığında fazla okunmaktadır. Anti-tg konsantrasyonununun 100-200IU/mL olduğunda ölçüm 2-5 kat aralığında raporlanmıştır. Gerçekte hasta doğru Tg değeri 1µg/L ve TgAb 100-200IU/mL arasında saptandığında Tg-RIA sonucunu 2 ve 5 µg/L olarak saptamışlardır. Clarke ve arkadaşlarının anti-tg pozitiflerde, Tg-MS ile Tg saptanmazken, Tg-RIA ile Tg konsantrasyonu 13 µg/L saptanmıştır (28).

Tg-IMA

Kısa zamanda sonuç vermesi ve otomatik çalışabilmesi nedeniyle günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır(Tablo-1) (14,15). İkinci kuşak Tg-IMA'ların fonksiyonel sensitivite değeri < 0,1 µg/L'dir. Bunların klinikte kullanılmasıyla, tiroid kanser hastalarının bazılarında endojen veya ekzojen TSH uyarı sonrası Tg ölçüm ihtiyacını azaltmıştır. Birçok çalışma grubunda Tg <0,1µg/L olmasının TSH uyarı testi için iyi bir belirleyici olduğunu göstermiştir(<2µg/L) (14,27,29). Chindirs ve arkadaşların çalışmalarında bazal Tg <0,1 µg/L olduğunda TSH uyarısıyla Tg'nin >2µg/L olma olasılığını %2.5, Schlumberger ve arkadaşlarında 521 hastada bazal Tg <0,1 µg/L iken TSH uyarı testinde %1 'inde Tg >2 µg/L saptanmıştır (14). Spencer ve Malandrino'nun çalışmalarında Tg uyarı testinde, Tg >2 µg/L olma olasılığı sırasıyla %0.3 ile %0.9'dur (29).

Dokuz çalışmanın dahil edildiği metaanalizde ikinci kuşak yöntemle bazal

Tg ölçümünde klinik olarak yüksek oranda sensitivite ve negatif prediktif değerler(NPV) bildirilmiştir (30). TSH uyarı testinde Tg>1 ve >2µg/L olarak alındığında sensitivite %88 ile %97 iken NPV değeri de sırasıyla %97 ve %99 olarak raporlanmıştır. Aynı metaanalizde Tg değeri 0.1-1µg/L arasında testin spesifite, doğruluk ve pozitif prediktive değerleri suboptimal olmuştur. Bu da TSH uyarı testinin yapılması gerekliliğini engelliyememiştir. Bu grup hastalara, hastalığın tamamen olmadığı söylemeden önce TSH uyarı testinin yapılması faydalı olacaktır (30). Bu yöntemle takip edilenlerin, total tiroidektomi sonrası saptanabilir Tg'si olanların, loko-rejyonel nüks veya uzak metastaz açısından, yüksek riskli olanlarınsa Tg'nin gidişatı ve uyarılmamış Tg'nin ikiye katlanma süresinin takip edilmesi hastalık hakkında bilgi verebileceği bildirilmiştir (20,31,32).

Tg-IMA yönteminde testin duyarlılığını kısıtlayan ana husus, anti-tg ve HA ile olan interferansıdır. Anti-tg pozitifliğinde, Tg'yi yanlışlıkla düşük veya hiç saptanmaya bilir, bu da var olan hastalığı maskeliyebilir. HA ise Tg'nin yanlışlıkla yüksek saptanmasına neden olarak, yanlışlıkla rezidüel veya nüks hastalık araştırılmasına neden olabilmektedir. Bazı ticari Tg-IMA'larda, genellikle endojenik anti-tg tarafından tanınmayan, Tg molekülündeki antijenik bölgelere bağlanan monoklonal antikörlerin karışım şekli kullanılırken (33,34), diğerleri Tg'yi hem yakalama hem de saptama açısından endojenik anti-tg ile interferansı minimize eden poliklonal anti-tg antikörleri kullanmaktadır. DTK hastalarında görülen anti-tg heterojenitesi, Tg-IMA yöntemiyle, anti-tg interferansının

önlemesi her zaman başarılı olamamaktadır¹⁴.

LC-MS/MS yöntemi(Tg-MS)

Tg-MS, anti-tg varlığında Tg'nin kantitatif olarak daha doğru ölçülmesini sağlayan yöntemlerdendir. Anti- tg ve Tg arasındaki interferansdan kaçınmada da umut vericidir.

Tg-MS yöntemi ilk kez Hoofnagle ve arkadaşları tarafından uygulanmıştır³⁵. Temel olarak peptidin kantitatif olarak değerlendirilmesidir. Bu yöntemde, tripsin ile parçalanması sonrası ortaya çıkan peptidin (Tg'ye spesifik peptit) immün olarak yakalanmasıdır. Tg'nin miktar olarak tanınmasında kullanılan temel peptitler: VIFDANAPVAVR ve FSPDDSAGASALLR'dır. Bu peptitlerin saflaştırılmasında, SISCAPA olarak adlandırılan, patentli anti-peptit antikorları kullanılmaktadır (36). Tg-MS yönteminde, VIFDANAPVAVR, Tg'nin posttranlasyon sonrası korunan, saklanan ve tanınmayı sağlayan kısmıdır (26).

Tripsin ile muamele edilmesinin en önemli avantajlarından biride anti-tg ve HA dahil olmak üzere bütün proteinleri ayrıştırarak interferansın önlenmesidir. Tg-MS yönteminin anti-tg bulunmasından etkilenmediği gösterilmiştir (18,28). Anti-tg negatif olduğu durumda ise yaygın olarak kullanılan Tg-IMA yöntemiyle paralel sonuçlar verdiği ve farklılık oranlarının <%10 az olduğu bildirilmiştir (18,37). Anti-tg negatif örneklerde belli oranda farklılık olmasının kalibrasyon yöntemlerine bağlı olduğu düşünülmüştür. Tg konsantrasyonu, anti-tg pozitif olanların çoğunda, Tg-IMA ölçümüne göre daha yüksek saptanmıştır. Tg-IMA yönteminde, kesin Tg konsantrasyonu belirtmede, saptanamayan

oranın %86'a kadar ulaştığı bildirilmiştir (18). Tg-MS yönteminin en önemli özelliği, anti-tg pozitifliğinde immün yöntemlerle saptanamayan Tg'nin gösterilebilmesidir. Kushnir ve arkadaşları immünoassay yöntemiyle bakılan anti-tg pozitif vakaların %23' ün de Tg <0.1 µg/L olup saptanamazken Tg-MS yöntemiyle Tg değerleri 0.7-11 µg/L değerlerinde saptanmıştır (26). Netzel'in yaptığı çalışmada da anti-tg pozitif vakaların %22'sinde immün yöntemlerle saptanamayıp Tg-MS ile saptanan Tg olmuştur (18).

Tg-MS yönteminin sensitivitesinin düşük olması, Tg'lerin tripsin ile işlem sonrası ortaya çıkan fragmanların çoğaltılması süreci ve Tg genindeki polimorfizimin polipeptit sekanslarındaki modifikasyon hedef proteinin tanınmasını etkilemektedir. Tg geninde farklı tekli nükleotid polimorfizimin neden olduğu aminoasit değişimi (38) ve tümör hücresinde %2.7 oranında görülen somatik mutasyondur. Tg geni çok sayıda polimorfizm taşımakta ve bunların bazılarında otoimmün tiroid hastalığıyla ilişkilidir (39). Hem farklı tiroid dokularında hem de tümör örneklerinde farklı Tg-RNA eklemeleri içeren değişimler yüksek oranda görülebilmektedir (40).

Posttranlasyonel modifikasyon sonucu peptitlerde meydana gelen değişim, Tg-MS yöntemiyle, Tg'nin tanınmasını azaltarak sonuçların yanlışlıkla düşük veya negatif değerlerde okunmasına neden olmaktadır. Metastatik DTK hastada tümör dokusunun ürettiği Tg molekülünün peptit sekansı tam olmasına rağmen arginin glikolizasyona uğramazsa, bu peptit Tg-MS yöntemiyle saptanamamaktadır (41).

Tg-IMA'nın anti-tg ile olan interferansından dolayı Tg-MS'yi önermekle birlikte klinik performansını değerlendiren çalışmalar sınırlıdır. Netzel ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda, anti-tg negatif olanlarda, Tg-IMA ve Tg-MS arasında klinik sensitivite ve spesifitenin benzer oranlarda olduğu gösterilmiştir (sensitivite %100, spesifite % 84-94). Anti-tg pozitiflerde Tg-MS yönteminde, persistant vakaların %40'ında Tg saptanamamıştır. Azmat ve arkadaşlarının yaptığı retrospektif çalışmada, anti-tg pozitif 116 vakanın yapısal hastalıkla birlikte olmasına rağmen %44 ünde Tg-MS ile Tg saptanamamıştır⁴². Spencer ve arkadaşları, Tg-MS metoduyla, anti-tg pozitif olan persistant vakaların, %23'ün de Tg sınırda veya saptanamamıştır (17). Ancak klinik çalışmalar, rekürans veya rezidüel hastalığı olan anti-tg pozitif vakalarda fonksiyonel sensitivitesi $\leq 0.1 \mu\text{g/L}$ olan Tg-IMA yöntemiyle karşılaştırıldığında güncel Tg-MS yöntemlerinin klinik sensitivitesinin yüksek olmadığı gösterilmiştir. Eğer fonksiyonel sensitivite değerleri her iki test için $0.5 \mu\text{g/L}$ alınırsa o zaman Tg-MS'nin, anti-tg pozitif vakalarda hafif oranda daha iyi olduğu söylenebilir. Tg-MS ve Beckman Tg-IMA aynı fonksiyonel değerlerde sensitivite oranları %63.6'ya %45.5 olmuştur. Tg-MS yönteminde fonksiyonel sensitiviteyi daha da artıracak girişimler, testin klinik kullanımını ve performansını artıracaktır (14).

Tg-MS yöntemiyle, yapısal hastalığı olanlarda, Tg'nin saptanmamasının birçok nedeni vardır. Tg'nin farklı varyant şekillerinde olması tripsinin parçalama etkisine karşı koyarak, Tg peptit kısmının saptanmasını önleyerek, Tg'nin saptanmasına engel olmaktadır. Birden

fazla peptidin tanınmasını sağlayan, Tg-MS yöntemi bu gibi hatalara düşmeyi önleyebilir. İkinci olarak, rezidüel veya nüks hastalığı olanlarda, TgAb pozitif olanlarda, Tg'nin metabolik klirensinin artması bunlarda Tg'nin saptanmasını engelleyebilir. Bu durum aynı zamanda tümör kaynaklı Tg'nin polimorfizm nedeniyle hedef peptidin çoğaltılamaması veya anti-tg ve Tg molekülünden oluşan kompleksin temizlenme süresinin uzamasına bağlanmıştır (43-45). Üçüncü olarakta hem Tg-MS hem de immünoassay yöntemlerinde, bazı DTK hastaların patolojilerinin iyi differansiye tiroid kanseri olmasına rağmen, Tg sekresyonunun olmamasına bağlanmaktadır. Bu mekanizmaların açıklanması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Tg-MS yöntemleri, kalibrasyon farklılıklarından dolayı farklı Tg sonuçlarına neden olabilmektedir. Tg-MS ölçüm yönteminin kullanıldığı dört farklı firma sonuçlarının birbirleriyle korelasyon gösterdiği ancak bunların kalibrasyon sistemlerinde önemli farklılık olduğu gösterilmiştir (46).

Tg-MS yönteminin başlangıçtaki zorluklarına rağmen immün yöntemlerle saptanmayan vakaların %98'ini saptayabilmektedir (45). Proteotipik peptit içeren geniş paneller oluşturulduğunda Tg-MS'in, hem sensitivite hem de spesifiteyi artırarak yanlış negatif olasılığını azaltacaktır. Bu problemi çözümlenmek için; değişik metotlar önerilmektedir, periferik kanda Tg mRNA ölçümü (47), metilasyon belirteçlerin saptanması (48), ve serum TSH reseptör mRNA ölçülmesi (49) gibi değişik metotlar önerilmiştir. Bu metotların hiçbirini klinik kullanım için yeterince sensitif değildirler.

Tg ölçüm interferansları

Anti-Tg antikorları

DTK'li hastaların takibinde, anti-tg pozitifliği klinisyenler için dikkat edilmesi gereken bir durumdur. Bu durum daha fazla laboratuvar ve görüntüleme testlerin yapılmasında neden olmaktadır.

Anti-tg, Doniach ve Roitt tarafından 1956 yılında otoimmün tiroid hastalığında ilk tanımlanan antikordur (50,51). Follikül içi antikor olup immün hücreler ve antijenlere, doku hasarı olup olmamasından bağımsız olarak bağlanır. Tiroid glandın şiddetli destrüksiyonu Tg'de strüktürel değişikliğe neden olur. Tg'de bulunan T-hücre epitoplalarının otoreaktif T hücreleri tarafından tanınması için iyodinyasyona ihtiyaç vardır (52). Bu durum fazla iyot alanlarda anti-tg pozitif insidansının yüksek olmasını açıklamaktadır (53). Bununla beraber yüksek Tg düzeyi, antikor üretimi için zorunlu değildir. Anti-tg düzeyi antijene maruz kalma süresine bağlıdır (54). Tg üzerinde yaklaşık 40 kadar epitop bildirilmesine rağmen bunların bir kısmı immünojeniktir (55). Anti-tg'nin kendisi tiroisit yıkımına neden olmaz. Epitoplar çapraz bağ oluşturamayacak kadar birbirlerinden uzakta olmalarından dolayı kompleman fiksasyonuna neden olamazlar (35). Anti-tg'nin paterni otoimmün tiroid ile diğer hastalıklarda farklıdır (56).

Anti-tg, genel popülasyonun yaklaşık %10'unda, DTK hastaların ise %30'unda pozitifdir (9,57,58). Anti-tg interferansı, hastadan hastaya ve kullanılan Tg ölçüm yöntemlerine göre değişebilmektedir. Tg-IMA yöntemiyle çalışıldığında anti-tg, interferansa neden olarak Tg'nin yanlış olarak düşük saptanmasına neden olmaktadır (9,14,59).

Tg-RIA yönteminin ise anti-tg interferansına karşı oldukça dirençli olmasına rağmen yanlışlıkla yüksek veya yanlışlıkla düşük değerler bildirilmiştir (24-26). İnterferansın derecesi anti-tg konsantrasyonu ile korele değildir (49,60-62). DTK hastaların takibinde, Tg sonuçlarının doğru değerlendirilebilmesi için, anti-tg ölçümü yapılırken, mutalaka serum Tg ile birlikte ölçülmelidir^{32,63,64,65}. Anti-tg varlığı ya direkt immün yöntemiyle ya da dolaylı olarak Tg recovery testiyle araştırılır. Recovery testi; alınan seruma bilinen miktarda Tg eklenmesi öncesi ve sonrasında Tg ölçülmesi prensibine dayanır. Recovery test sonucu >%80 ise interferansa neden olacak anti-tg olmadığını düşündürebilir. Spencer ve arkadaşları saptanabilir düzeyde anti-tg olduğunda, recovery testinin yetersiz kaldığını ve aynı zamanda Tg ölçümlerinde (RIA ve IMA) farklı sonuçlar bildirilmiştir (9). Recovery testi rehberlerde rutin olarak önerilmemektedir. Örneklerin, Tg için değerlendirilmeden önce, tercihen sensitif immün yöntemlerle, anti-tg için taranmalıdır (14,32,66).

Ati-tg ölçümleri için 65/93 uluslararası standardizasyonu rehber alınmaktadır. Yine de ölçüm tekniklerindeki kısıtlamalar nedeniyle anti-tg tahlilleri oldukça değişkenlik gösterebilmektedir (22,62,67). DTK hastalarında; anti-tg heterojenitenin olması ve ayrıca immünodominan epitop için yapılan hazırlama işleminin farklı epitoplarda yetersiz kalması gibi nedenler sayılmaktadır (14). Farklı ölçüm yöntemleri ve değerlendirmedeki farklılıklardan dolayı, anti-tg ölçümlerinde konsantrasyon ve sınıflandırılmada klinisyenler arasında bir fikir birliği sağlanamamıştır. Bu sorunu en aza indirmek için, DTK hasta

takibinde klinisyenler mutalaka aynı anti-tg ölçüm yöntemini ve laboratuvarı kullanmalıdırlar (31). Laboratuvarlarda, anti-tg ölçüm yönteminde herhangi bir modifikasyon ve değişiklik olduğunda, en az bir ölçümün her iki yöntemle beraber çalışılarak tekrar yeni bazal değerin saptanması (re-basaline) ve bunun klinisyene bildirilmesi önemli olacaktır (14).

Ani-tg'nin hangi limit değerinde pozitif kabul edileceğide bir diğer önemli sorundur. Otoimmün tiroid hastalığı tanısı koyduran anti-tg değerleri, Tg ile interferansa neden olan anti-tg konsantrasyonundan, oldukça yüksek değerlerdir. Düşük anti-tg konsantrasyonu (ticari firma referansına göre normal olan değerler) klinik önemi olan Tg ölçümüyle interferansa neden olabilmektedir. 362 vakanın anti-tg pozitif saptandığı durumda, üç ayrı sistemle bakıldığında ise 141' in de anti-tg pozitif saptanmıştır (63). Birçok çalışmada da anti-tg pozitif sonuçlar arasında önemli farklılıklar gösterilmiştir (14,23,62). Tiroid kanseri hastasında tiroidektomi sonrası patoloji raporunda tiroidit bildirilmişse, rutin ölçüm yönteminde anti-tg negatif saptanırsa, bir başka ölçüm yöntemiyle tekrar çalışılmalıdır (68).

Anti-tg pozitif hastalarda, Tg kullanımının güvenilir olmadığı zaman, serum anti-tg konsantrasyonu hastalık takibinde Tg'nin yerine kullanılabilir. Tiroidektomi izleyen birkaç yıl içinde anti-tg konsantrasyonu azalarak saptanmayacak düzeylere inmektedir (69,70). Hastalarda anti-tg konsantrasyonunun giderek azalması, stabil veya artmasına nazaran, persistant veya nüks açısından düşük risk oluşturmaktadır

(71). Birinci yılın sonunda anti-tg konsantrasyonunun %50 den fazla azalması, nüks açısından düşük riskli ve hastaliksız sağkalım ise yaklaşık % 80'dir (70).

Çalışmalarda yüksek düzeyde anti-tg'lerin saptanmasının yüksek oranda hastalık rekürrensi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (71-73). Anti-tg düzeylerinde yeni başlayan artış, tümör rekürrensi için işaret olabilir (73,74). Bununla birlikte anti-tg pozitifliği tek başına kötü prognozla direkt ilişkili değildir. Anti-tg konsantrasyonundaki artış veya azalış yönündeki eğilim hastalık sonucuyla daha ilgilidir (72). Bunun dışında hastalarda anti-tg antikörlerinin yeniden belirmesi, tümör kökenli Tg'nin antijenik özelliğinin arttığı gösterilmesi bakımından bir belirteç olabilir (41).

İn vivo çalışmalarda anti-tg'nin pozitif olması, Tg'nin dolaşımdan temizlenmesini artırmaktadır. Tavşanlarda Tg ile immünizasyon sonrası gelişen anti-tg'lerin endojen Tg'lerin dolaşımdan temizlenmesine neden olmuştur⁷⁵. İnsanlarda subtotal tiroidektomi sonrasında anti-tg'nin, Tg'nin dolaşımdan temizlenmesini artırdığı gösterilmiştir⁷⁶. Eğer in vivo olarak Tg-anti-tg kompleks oluşumuyla dolaşımda Tg temizlenmesi artıyorsa, hastalıkların ilerlemesiyle artan anti-tg konsantrasyonu paradoksal olarak Tg değerinin düşmesine neden olacaktır. Bu durum kullanılan yöntemden bağımsız olarak Tg ölçümünü güvenilir olmaktan çıkaracaktır (14).

Anti-tg pozitif hastalarda; Tg mRNA, tirotropin reseptör mRNA veya tiroid peroksidaz mRNA gibi alternatif yöntemler vardır. Bu yöntemler çalışmalarda klinik faydası olacak

sensitivite ve spesifite düzeylerine ulaşamamıştır (77).

Heterofil antikor (HA)

HA, insan antikorları olup, hayvan antijenlerine bağlananları kast etmektedir. Tg-IMA kullanımına bağlı olarak DTK hastaların yaklaşık %0.5'inde HA interferansı gösterilmiştir (14,30,78). Tg-IMA yönteminde nadiren yanlışlıkla düşük Tg değerlerine neden olmaktadır (79). Günlük pratik uygulamada rutin HA interferans taraması yapılmamaktadır. HA interferansı, Tg sonuçlarıyla klinik sonuçlar uyumsuz olduğu zaman araştırılmalıdır. HA interferansına neden olan sorunu çözmek için çeşitli yöntemler vardır. Öncelikle interferanstan, serum seri şekilde seyretilmesine rağmen doğrusal olmayan cevabın görülmesi durumunda şüphelenilmelidir. Bir diğer yöntemde HA bloke edecek antijenle işleme tabii tutulması sonrası çıkan sonucun bunun işlem öncesi sonuçlarla kıyaslanmasıdır⁷⁹. Netzel ve arkadaşları HA interferansı gösteren hastaların, Tg-MS yöntemiyle daha iyi sonuç vereceğini bildirmişlerdir (Tablo-1) (14,15).

Klinik pratikte serum Tg ölçümü

Klinik pratikte tiroid hormon ve antikor testleri birlikte istenmektedir. Bu testlerin belirli kriterlere göre istenmesi maliyet ve doğru takip açısından önemli olacaktır. Tg ölçümü için anti-tg negatif ise Tg-IMA veya RIA yönteminin (17,23), anti-tg pozitif ise Tg-MS yönteminin kullanılması tercih edilmektedir (26-28).

Klinik pratikte karşılaşılan bir diğer sorunda Tg'nin ölçümünde farklı yöntemlerin kullanılması durumunda çok

değişken sonuçlarla karşılaşılmasıdır (80). Anti-tg pozitif olup, Tg-IMA yöntemiyle Tg saptanamayan vakalara, Tg-MS yönteminin kullanılmasıyla, yaklaşık %30 oranında yeni anti-tg pozitif vaka eklenmiştir (27). Bununla birlikte günümüzde kullanılan yeni kuşak Tg-MS yöntemlerinde fonksiyonel sensitivite değerlerinin suboptimal olması nedeniyle Tg 0.1-0.5µg/L arasında negatif sonuçlara neden olabilmektedir. Alternatif olarak RIA metodunun kullanılması ek pozitif vaka tanımlayabilir. Ancak Tg-RIA metodunda, yüksek anti-tg konsantrasyonu ve düşük Tg konsantrasyonu olanlarda, Tg'yi olduğundan yüksek gösterebilir. Tg-IMA ile anti-tg pozitif saptanan vakalarda eğer klinik olarak uyumsuzluk görülüyorsa, Tg konsantrasyonun, Tg-MS veya Tg-RIA ile ölçülmesi yine de faydalı olabilir. Anti-tg negatif hastalarda, Tg-IMA fonksiyonel sensitivite değerinin 0.1µg/L olması, bu yöntemi ön sıraya almaktadır.

Tg molekülünün farklı epitoplarmı hedefleyen monoklonal antikorlarla takip sırasında Tg değerlerinde farklılıklar görülmektedir (78,799). Bu monoklonal antikorlar, normal tiroid doku kaynaklı Tg den üretilirken, tümör kaynaklı olanlar farklı epitoplara göre üretildiğinden ölçüm metotlarına göre farklı sonuçlar çıkmaktadır. Bu durum aktif hastalığı olanlarda, yanlışlıkla, negatif Tg ölçümlerine neden olmaktadır (66,80).

Tg ölçüm yöntemleri veya serum anti-tg durumunda değişiklik olduğunda mutlaka yeniden bazal değerleri saptanmalı ve klinisyen bu duruma göre yeni takip stratejisini belirlemelidir¹⁴.

İnce iğne aspirasyon ile Tg ölçümü (Tg yıkama)

Tg yıkama; DTK hastalarda metastatik lenf nodundan şüphelenildiğinde, ince iğne aspirasyonundan (İİAB) sonra yapılan bir tamamlayıcı işlemdir. İlk kez Pacini tarafından önerilmiştir (81). Tg yıkama işlemi tanısal oranı sitoloji ile karşılaştırabilir düzeydedir. Sitolojinin nondiagnostik olduğu durumlarda tanının doğrulanmasını sağlayabilmektedir (14). Toplam 24 çalışmanın dahil edildiği, 2865 lenf nodu, metaanalizde uygulamanın sensitivitesi %95 spesifitesi %94 bildirilmiştir (82). Çalışmalar arasında farklı sensitivite ve spesifite değerlerinin bildirilmesi, hasta seçimi, tekniğin uygulaması, klasifikasyon için kullanılan tanısal değerlerin farklı olmasına bağlanmıştır (83).

Tiroid dokusu olmayanlarda İİAB de Tg yıkama sonuçları oldukça değerlidir. Tiroid glandı olan 140 hastanın dahil edildiği çalışmada testin sensitivitesi %86.2 spesifitesi %90.2 saptanmıştır (84). Sadece tiroidektomi yapılanlarda sensitivite %96.9'a spesifitesi %94.1'e yükselmektedir⁸⁴. Tiroid dokusu sağlam olan vakalarda Tg yıkama uygulamasında prosedür olarak kan kontaminasyonuna bağlı olarak Tg yüksek çıkabilmektedir. Bu uygulamanın en önemli avantajı çoğu zaman sitolojik değerlendirme için kullanılan iğnenin işlem sonrası düşük miktarda salin ile yıkama işleminden elde edilen materyalin değerlendirilmesine dayanır. Bu yöntemin uygulamasında fosfat içerikli salin tamponlar veya Tg içermeyen serumlar gibi değişik prosedürler bildirilmiştir (85). Borel ve arkadaşları Tg'nin toplandığı ortam içeriğinin (Tg içermeyen serum, salin veya albümin içerikli salin solüsyonları) değerlendirilmesinde, salin kullanılmasında

herhangi bir tüp ortamından kaynaklanan etki görmemişlerdir (85,86). Ancak diğer çalışmalarda Tg-yıkama değerlerinde salin kullanılmasının Tg değerlerinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (85,86). Snozek ve arkadaşlarının ekzojen Tg'nin sade salin kullanımının Tg-yıkama değerlerini yaklaşık %25 yüksek çıkardığını bildirmişlerdir⁸⁷. Toplama tüplerinden (sade, serum ayırıcı ve lityum-heparin içerikli) sade içerikli tüplerdeki Tg sonuçları diğerlerine göre daha yüksek saptanmaktadır. Lityum-heparin içerikli örneklerde yanlış negatif sonuçlar görülebilmektedir (88) Serum veya plazmada bulunmayan lenf nodu matriksinin Tg-yıkama sonuçlarını etkileyebileceği düşünülmüştür (14,85,86).

Tg-yıkama sonuçlarının değerlendirilmesinde tanı için gerekli eşik değer belirsizliği devam etmektedir. Tg-yıkama sonucunu değerlendirirken farklı yaklaşımlar söz konusudur. Bunlar, benign lenf nodundan yapılan iki ölçümün standart ortalamasının alınması (84,87); ROC curve analiz (85,88,89) ile değerlendirme, Tg-yıkama sonucunun serum Tg konsantrasyonuna oranı (90) ile serum Tg referans aralığının üst sınırını kullanmaktır.

Çalışmalarda anti-tg durumuna göre Tg-yıkama sonuçlarının değerlendirilmesinde çelişkili sonuçlar görülmektedir. Bazıları Tg-yıkama sonucunun anti-tg pozitif veya negatif olmasının manalı değişikliğe neden olmadığını bildirmişlerdir (14,91). Boi ve ark. yaptığı çalışmada anti-tg varlığında Tg-yıkama sonuçlarının doğrulunun çok etkilenmediğini, ancak bir dereceye kadar daha az tanımlandığını bildirmişlerdir (929). Jeon ve ark. yaptığı çalışmada, DTK hastaların metastatik lenf nodundan yapılan

Tg-yıkamanın anti-tg ile interferansı nedeniyle; Tg-yıkama sonucunun yanlışlıkla düşük veya saptanamayacak değerlerde raporlandığını bildirmişlerdir (93).

Tg-yıkama ölçümü; LAP incelemesinde sitolojinin yetersiz, şüpheli ve ultrason görünümünde şüphe olduğunda önerilmektedir. Tg-yıkama çalışılması ATA rehberinde desteklenmektedir. Ancak tiroid gland varlığında sonucun yorumunda zorluk olabileceği bildirilmiştir (329). Tg-yıkama, sitolojik tetkike tamamlayıcı bir test olarak kullanılmalıdır. Tiroidektomi, papiller tiroid kanseri olan US da şüpheli görüntü ve serum Tg yüksek olanlarda, Tg-yıkama eşik değeri 1µg/L olarak alındığında, sitolojiden daha yüksek oranda sensitivite ve spesifite değerleri olduğu bildirilmiştir (94,95).

Sonuç

Total tiroidektomi sonrasında rezidüel veya nüks hastaların erken dönemde tanınması ve takibin iyi yapılabilmesi oldukça önemlidir. DTK nedeniyle tedavi almış ve takipte olanlarda serum Tg ölçümü standart yaklaşımdır. Tg molekülünü tespit edilme oranını artıran yeni teknikler önem kazanmaktadır. Yüksek fonksiyonel sensitiviteye sahip ölçüm yöntemlerinin değeri giderek artmaktadır. Bazı dezavantajlarına rağmen, Tg-MS'nin ideal bir yöntem olarak klinikte kullanımı giderek artmaktadır. Anti-tg ve HA pozitifliğinde Tg-MS kullanımı önerilmektedir.

Yeni ölçüm yöntemlerinin özellikle de anti-tg pozitif hastalarda klinik kullanımda doğru değerlendirmeler için klinik ve laboratuvar destekli çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kaynaklar

1. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ et al. American Thyroid Association (ATA) Guidelines Taskforce on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer; Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2009;19:1167–214.
2. Grebe SKG. Diagnosis and management of thyroid carcinoma: focus on serum thyroglobulin. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism* 2009;4:25–43.
3. Demers LM, Spencer CA. Laboratory medicine practice guidelines: laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease. *Clin Endocrinol.* 2003;58:138–40.
4. Giovanella L. Highly sensitive thyroglobulin measurements in differentiated thyroid carcinoma management. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2008;46:1067–73.
5. Zo'phel K, Wunderlich G, Smith BR. Serum thyroglobulin measurements with a high sensitivity enzyme-linked immunosorbent assay: is there a clinical benefit in patients with differentiated thyroid carcinoma? *Thyroid* 2003;13:861–5.
6. Iervasi A, Iervasi G, Ferdeghini M, Solimeo C, Bottoni A, Rossi L et al. Clinical relevance of highly sensitive Tg assay in monitoring patients treated for differentiated thyroid cancer. *Clinical Endocrinology* 2007; 67:434–41.
7. Smallridge RC, Meek SE, Morgan MA, Gates GS, Fox TP, Grebe S al. Monitoring thyroglobulin in a sensitive

- immunoassay has comparable sensitivity to recombinant human TSH-stimulated thyroglobulin in follow-up of thyroid cancer patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2007;92:82–7.
8. Giovanella L, Clark PM, Duntas LC, Elisei R, Feldt-Rasmussen U, Leenhardt L et al. Thyroglobulin measurement using highly sensitive assays in patients with differentiated thyroid cancer: a clinical position paper. *European Journal of Endocrinology* 2014;171:33–46.
 9. Spencer CA, Takeuchi M, Kazarosyan M, Wang C, Guttler RB, Singer PA et al. Serum thyroglobulin autoantibodies: prevalence, influence on serum thyroglobulin measurement, and prognostic significance in patients with differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1121–27.
 10. Diessl S, Holzberger B, Maeder U, Grelle I, Smit JW, Buck AK et al. Impact of moderate vs stringent TSH suppression on survival in advanced differentiated thyroid carcinoma. *Clinical Endocrinology* 2012;76:586–92.
 11. Verburg FA, Mader U, Tanase K, Thies ED, Diessl S, Buck AK et al. Life expectancy is reduced in differentiated thyroid cancer patients R45 years old with extensive local tumour invasion, lateral lymph node, or distant metastases at diagnosis and normal in all other DTC patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2013;98:172–80.
 12. Pacini F. Follow-up of differentiated thyroid cancer. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2002;29:492–6.
 13. Giovanella L, Feldt-Rasmussen U, Verburg FA, Grebe SK, Plebani M, Clark PM. Thyroglobulin measurement by highly sensitive assays: focus on laboratory challenges. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:1301–14.
 14. Alicia Algeciras-Schimnich. Thyroglobulin measurement in the management of patients with differentiated thyroid cancer. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 2018;55:205–18.
 15. Spencer C, Fatemi S. Thyroglobulin antibody (TgAb) methods –Strengths, pitfalls and clinical utility for monitoring TgAb-positive patients with differentiated thyroid cancer. *Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2013;27:701–12.
 16. Baloch Z, Carayon P, Conte-Devolx B, Demers LM, Feldt-rasmussen U, Henry JF et al. Laboratory medicine practice guidelines. Laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease. *Thyroid* 2003;13:3–126.
 17. Spencer C, Petrovic I, Fatemi S, LoPresti J. Serum thyroglobulin (Tg) monitoring of patients with differentiated thyroid cancer using sensitive (second generation) immunometric assays can be disrupted by false-negative and false-positive serum thyroglobulin autoantibody misclassifications. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:4589–99.
 18. Spencer CA, Bergoglio LM, Kazarosyan M, Fatemi S, LoPresti JS. Clinical impact of thyroglobulin (Tg) and Tg autoantibody method differences on the management of patients with differentiated thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:5566–75.

19. Van Herle AJ, Uller RP, Matthews NI. Radioimmunoassay for measurement of thyroglobulin in human serum. *J Clin Invest* 1973;52:1320–7.
20. Schlumberger M, Tubiana M, De Vathaire F, Hill C, Gardet P, Travagli JP et al. Long-term results of treatment of 283 patients with lung and bone metastases from differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;63:960–7.
21. Spencer C, Petrovic I, Fatemi S. Current thyroglobulin autoantibody (TgAb) assays often fail to detect interfering TgAb that can result in the reporting of falsely low/undetectable serum Tg IMA values for patients with differentiated thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:1283–91.
22. Spencer C, LoPresti J, Fatemi S. How sensitive (second-generation) thyroglobulin measurement is changing paradigms for monitoring patients with differentiated thyroid cancer, in the absence or presence of thyroglobulin autoantibodies. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2014;21:394–404.
23. Schneider AB, Pervos R. Radioimmunoassay of human thyroglobulin: effect of antithyroglobulin autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 1978;47:126–37.
24. Weightman DR, Mallick UK, Fenwick JD. Discordant serum thyroglobulin results generated by two classes of assay in patients with thyroid carcinoma: correlation with clinical outcome after 3 years of follow-up. *Cancer* 2003;98:41–7.
25. Jahagirdar VR, Strouhal P, Holder G, Gama R, Singh BM. Thyrotoxicosis factitia masquerading as recurrent Graves' disease: endogenous antibody immunoassay interference, a pitfall for the unwary. *Ann Clin Biochem* 2008;45:325–7.
26. Clarke NJ, Zhang Y, Reitz RE. A novel mass spectrometry- based assay for the accurate measurement of thyroglobulin from patient samples containing antithyroglobulin autoantibodies. *J Investig Med* 2012;60:1157–63.
27. Netzel BC, Grebe SK, Carranza Leon BG. Thyroglobulin (Tg) testing revisited: Tg assays, TgAb assays, and correlation of results with clinical outcomes. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:1074–83.
28. Spencer C, Fatemi S, Singer P, Nicoloff J, LoPresti J. Serum Basal thyroglobulin measured by a second-generation assay correlates with the recombinant human thyrotropin- stimulated thyroglobulin response in patients treated for differentiated thyroid cancer. *Thyroid*. 2010;20:587–95.
29. Giovanella L, Treglia G, Sadeghi R, Trimboli P, Ceriani L, Verburg FA. Unstimulated highly sensitive thyroglobulin in follow-up of differentiated thyroid cancer patients: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:440–7.
30. Haugen BR. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for adult patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: what is new and what has changed? *Cancer* 2017;123:372–81.
31. Pacini F, Sabra MM, Tuttle RM. Clinical relevance of thyroglobulin doubling time in the management of patients with differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2011;21:691–2.
32. Piechaczyk M, Bouanani M, Salhi SL, Baldet L, Bastide M, Pau B. Antigenic domains on the human thyroglobulin molecule recognized by autoantibodies

- in patients' sera and by natural autoantibodies isolated from the sera of healthy subjects. *Clin Immunol Immunopathol* 1987;45:114–21.
33. Ruf J, Carayon P, Lissitzky S. Various expressions of a unique anti-human thyroglobulin antibody repertoire in normal state and autoimmune disease. *Eur J Immunol* 1985;15:268–72.
 34. Verburg FA, Luster M, Cupini C, Chiovato L, Duntas L, Elisei R, et al. Implications of thyroglobulin antibody positivity in patients with differentiated thyroid cancer: a clinical position statement. *Thyroid* 2013;23:1211-25.
 35. Anderson NL, Anderson NG, Haines LR, Hardia DB, Olafson RW, Pearson TW. Mass spectrometric quantitation of peptides and proteins using Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies (SISCAPA). *J Proteome Res* 2004;3:235–44.
 36. Kushnir MM, Rockwood AL, Roberts WL, Abraham D, Hoofnagle AN, Meikle AW. Measurement of thyroglobulin by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in serum plasma in the presence of antithyroglobulin antibodies. *Clin Chem* 2013;59:982-90.
 37. Netzel BC, Grebe SK, Algeciras-Schimmich A. Usefulness of a thyroglobulin liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for evaluation of suspected heterophile interference. *Clin Chem* 2014;60:1016–18.
 38. Akdi A, Perez G, Pastor S, Castell J, Biarnes J, Marcos R, et al. Common variants of the thyroglobulin gene are associated with differentiated thyroid cancer risk. *Thyroid* 2011;21:519-25.
 39. Vono-Toniolo J, Kopp P. Thyroglobulin gene mutations and other genetic defects associated with congenital hypothyroidism. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2004;48:70-82.
 40. Bertaux F, Noel M, Malthiery Y, Fragu P. Demonstration of a heterogeneous transcription pattern of thyroglobulin mRNA in human thyroid tissues. *Biochem Biophys Res Comm* 1991;178:586-92.
 41. Azmat U, Porter K, Senter L, et al. Thyroglobulin liquid chromatography-tandem mass spectrometry has a low sensitivity for detecting structural disease in patients with antithyroglobulin antibodies. *Thyroid* 2017;27:74–80.
 42. Weigle WO, High GJ. The behavior of autologous thyroglobulin in the circulation of rabbits immunized with either heterologous or altered homologous thyroglobulin. *J Immunol* 1967;98:1105-14.
 43. Feldt Rasmussen U, Petersen PH, Date J, Madsen CM. Sequential changes in serum thyroglobulin (Tg) and its autoantibodies (TgAb) following subtotal thyroidectomy of patients with preoperatively detectable TgAb. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1980;12:29-38.
 44. van der Laken CJ, Voskuyl AE, Roos JC, Stigter van Walsum M, de Groot ER, Wolbink G, et al. Imaging and serum analysis of immune complex formation of radiolabelled infliximab and antiinfliximab in responders and nonresponders to therapy for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007;66:253-6.
 45. Netzel BC, Grant RP, Hoofnagle AN, Rockwood AC, Grebe SKG. First steps toward harmonization of LC-MS/MS thyroglobulin assays. *Clin Chem* 2016;62:297-9.

46. Spencer C, Petrovic I, Fatemi S, LoPresti J. Serum thyroglobulin (Tg) monitoring of patients with differentiated thyroid cancer using sensitive (second-generation) immunometric assays can be disrupted by false-negative and false-positive serum thyroglobulin autoantibody misclassifications. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:4589-99.
47. Boldarine VT, Maciel RM, Guimaraes GS, Nakabashi CC, Camacho CP, Andreoni DM, et al. Development of a sensitive and specific quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction assay for blood thyroglobulin messenger ribonucleic acid in the follow-up of patients with differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:1726-33.
48. Hu S, Ewertz M, Tufano RP, Brait M, Carvalho AL, Liu D, et al. Detection of serum deoxyribonucleic acid methylation markers: a novel diagnostic tool for thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:98-104.
49. Milas M, Shin J, Gupta M, Novosel T, Nasr C, Brainard J, et al. Circulating thyrotropin receptor mRNA as a novel marker of thyroid cancer: clinical applications learned from 1758 samples. *Ann Surg*. 2010;252:643-51.
50. Roitt IM, Doniach D, Campbell PN, Hudson RV. Auto-antibodies in Hashimoto's disease (lymphadenoid goitre). *Lancet* 1956;271:820-1.
51. Rose NR, Witebsky E. Studies on organ specificity. V. Changes in the thyroid glands of rabbits following active immunization with rabbit thyroid extracts. *J Immunol* 1956;76:417-27.
52. Barin JG, Talor MV, Sharma RB, Rose NR, Burek CL. Iodination of murine thyroglobulin enhances autoimmune reactivity in the NOD.H2 mouse. *Clin Exp Immunol* 2005;142:251-9.
53. Li Y, Teng D, Shan Z, Teng X, Guan H, Yu X et al. Antithyroperoxidase and anti thyroglobulin antibodies in a five-year follow-up survey of populations with different iodine intakes. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:1751-7.
54. Fröhlich E, Wahl R. Thyroid autoimmunity: role of anti-thyroid antibodies in thyroid and extra-thyroidal diseases. *Front Immunol* 2017;8:521.
55. Gentile F, Ferranti P, Mamone G, Malorni A, Salvatore G. Identification of hormonogenic tyrosines in fragment 1218-1591 of bovine thyroglobulin by mass spectrometry. Hormonogenic acceptor TYR-12donor TYR-1375. *J Biol Chem*. 1997;272:639-46.
56. Jo K, Lim DJ. Clinical implications of anti-thyroglobulin antibody measurement before surgery in thyroid cancer. *Korean J Intern Med* 2018;33:1050-7.
57. Gorges R, Maniecki M, Jentzen W, Shue SY, Mann K, Bockisch A et al. Development and clinical impact of thyroglobulin antibodies in patients with differentiated thyroid carcinoma during the first 3 years after thyroidectomy. *Eur J Endocrinol* 2005;153:49-55.
58. Hollowell JG, Staehling NW, Flanders WD, Hannon WH, Gunter EW, Spencer CA et al. Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:489-99.
59. Okosieme OE, Evans C, Moss L, Parkes AB, Premawardhara LDK, Lazarus JH. Thyroglobulin antibodies in serum of patients with differentiated thyroid

- cancer: relationship between epitope specificities and thyroglobulin recovery. *Clin Chem* 2005;51:729–34.
60. Rosario PW, Maia FF, Fagundes TA, Vasconcelos FP, Cardosa LD, Purisch S. Antithyroglobulin antibodies in patients with differentiated thyroid carcinoma: methods of detection, interference with serum thyroglobulin measurement and clinical significance. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2004;48:487–92.
 61. Verburg FA, Hartmann D, Grelle I, Giovenella L, Buck AK, Reiners C. Relationship between antithyroglobulin autoantibodies and thyroglobulin recovery rates using different thyroglobulin concentrations in the recovery buffer. *Horm Metab Res* 2013;45:728–35.
 62. Katrangi W, Grebe SKG, Algeciras-Schimmich A. Analytical and clinical performance of thyroglobulin autoantibody assays in thyroid cancer follow-up. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1987–94.
 63. Leenhardt L, Erdogan MF, Hegedus L, Mandel SJ Paschke R, Rago T. 2013 European thyroid association guidelines for cervical ultrasound scan and ultrasound-guided techniques in the postoperative management of patients with thyroid cancer. *Eur Thyroid J* 2013;2:147–59.
 64. Gharib H, Papini E, Garber JR, Daniel SG, Herrell RM, hegedis L et al. American Association of Clinical Endocrinologists, American College of Endocrinology, and Associazione Medici Endocrinologi Medical Guidelines for clinical practice for the diagnosis and management of thyroid nodules–2016 update. *Endocr Pract* 2016;22:622–39.
 65. La'ulu SL, Slev PR, Roberts WL. Performance characteristics of 5 automated thyroglobulin autoantibody and thyroid peroxidase autoantibody assays. *Clin Chim Acta* 2007;376:88–95.
 66. Hoofnagle AN, Becker JO, Wener MH, Heinecke JW. Quantification of thyroglobulin, a low-abundance serum protein, by immunoaffinity peptide enrichment and tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2008;54:1796–804.
 67. Latrofa F, Ricci D, Montanelli L, Rocch R, Piaggi P, Sisiti E et al. Lymphocytic thyroiditis on histology correlates with serum thyroglobulin autoantibodies in patients with papillary thyroid carcinoma: impact on detection of serum thyroglobulin. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97:2380–7.
 68. Thomas D, Liakos V, Vassiliou E, Hatzimarkou F, Tsatsoulis A, Kaldrimides P. Possible reasons for different pattern disappearance of thyroglobulin and thyroid peroxidase autoantibodies in patients with differentiated thyroid carcinoma following total thyroidectomy and iodine-131 ablation. *J Endocrinol Invest.* 2007;30:173–80.
 69. Kim WG, Yoon JH, Kim WB, Kim YT, Kim YE, Kim JY et al. Change of serum antithyroglobulin antibody levels is useful for prediction of clinical recurrence in thyroglobulin-negative patients with differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:4683–9.
 70. Pacini F, Mariotti S, Formica N, Elisei R, Anelli S, Capotorti E et al. Thyroid autoantibodies in thyroid cancer: incidence and relationship with tumour

- outcome. *Acta Endocrinol* 1988;119:373–80.
71. Seo JH, Lee SW, Ahn BC, Lee J. Recurrence detection in differentiated thyroid cancer patients with elevated serum level of antithyroglobulin antibody: special emphasis on using (18)F-FDG PET/ CT. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2010;72:558-63.
 72. Chung JK, Park YJ, Kim TY, So Y, Kim SK, Park DJ, et al. Clinical significance of elevated level of serum antithyroglobulin antibody in patients with differentiated thyroid cancer after thyroid ablation. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002;57:215-21.
 73. Feldt-Rasmussen U, Verburg FA, Luster M, Cupini C, Chiovato L, Duntas L, et al. Thyroglobulin autoantibodies as surrogate biomarkers in the management of patients with differentiated thyroid carcinoma. *Curr Med Chem* 2014;21:3687-92.
 74. Weigle WO, High GJ. The behavior of autologous thyroglobulin in the circulation of rabbits immunized with either heterologous or altered homologous thyroglobulin. *J Immunol* 1967;98:1105–14.
 75. Feldt-Rasmussen U, Petersen PH, Date J. Sequential changes in serum thyroglobulin (Tg) and its autoantibodies (TgAb) following subtotal thyroidectomy of patients with preoperatively detectable TgAb. *Clin Endocrinol* 1980;12:29–38.
 76. Verburg FA, Lips CJ, Lentjes EG, de Klerk JM. Detection of circulating Tg-mRNA in the follow-up of papillary and follicular thyroid cancer: how useful is it? *Br J Cancer* 2004;91:200–4.
 77. Giovanella L, Keller F, Ceriani L, Tozzoli R. Heterophile antibodies may falsely increase or decrease thyroglobulin measurement in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Clin Chem Lab Med*. 2009;47:952–4.
 78. Preissner CM, O’Kane DJ, Singh RJ, Morris JC, Grebe SKG. Phantoms in the assay tube: heterophile antibody interferences in serum thyroglobulin assays. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:3069–74.
 79. Spencer C, LoPresti J, Fatemi S. How sensitive (second-generation) thyroglobulin measurement is changing paradigms for monitoring patients with differentiated thyroid cancer, in the absence or presence of thyroglobulin autoantibodies. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2014;21:394-404.
 80. Schulz R, Bethauser H, Stempka L, Heilig B, Moll A, Hufner M. Evidence for immunological differences between circulating and thyroid tissue-derived thyroglobulin in men. *Eur J Clin Invest* 1989;19:459-63.
 81. Pacini F, Fugazzola L, Lippi F, Centoni R, Miccoli P, Elisei R et al. Detection of thyroglobulin in fine needle aspirates of nonthyroidal neck masses: a clue to the diagnosis of metastatic differentiated thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;74:1401–04.
 82. Baskin HJ. Detection of recurrent papillary thyroid carcinoma by thyroglobulin assessment in the needle washout after fine-needle aspiration of suspicious lymph nodes. *Thyroid* 2004;14:959–63.
 83. Grani G, Fumarola A. Thyroglobulin in lymph node fine-needle aspiration washout: a systematic review and meta-analysis of diagnostic accuracy. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:1970–82.
 84. Borel AL, Boizel R, Faure P. Significance of low levels of thyroglobulin in fine needle aspirates

- from cervical lymph nodes of patients with a history of differentiated thyroid cancer. *Eur J Endocrinol* 2008;158:691–8.
85. Snozek CL, Chambers EP, Reading CC, Reading CC, Sebo TJ, Sistrunk JW et al. Serum thyroglobulin, high-resolution ultrasound, and lymph node thyroglobulin in diagnosis of differentiated thyroid carcinoma nodal metastases. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:4278–81.
 86. Frasoldati A, Toschi E, Zini M, Flora M, Caroggio A, Dotti C et al. Role of thyroglobulin measurement in fine-needle aspiration biopsies of cervical lymph nodes in patients with differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 1999;9:105–11.
 87. Giovanella L, Suriano S, Ceriani L, Verburg FA. Undetectable thyroglobulin in patients with differentiated thyroid carcinoma and residual radioiodine uptake on a postablation whole-body scan. *Clin Nucl Med* 2011;36:109–12.
 88. Lee YH, Seo HS, Suh SI, Lee NJ, Kim JH, Seol HY et al. Cut-off value for needle washout thyroglobulin in athyrotropic patients. *Laryngoscope* 2010;120:1120–4.
 89. Chung J, Kim EK, Lim H, Son EJ, Yoon JH, Youk H et al. Optimal indication of thyroglobulin measurement in fine-needle aspiration for detecting lateral metastatic lymph nodes in patients with papillary thyroid carcinoma. *Head Neck* 2014;36:795–801.
 90. Martins-Costa MC, Maciel RMB, Kasamatsu TS, Camacho CP, Ikejiri ES, Mamone MCO et al. Clinical impact of thyroglobulin (Tg) and Tg autoantibody (TgAb) measurements in needle washouts of neck lymph node biopsies in the management of patients with papillary thyroid carcinoma. *ArchEndocrinol Metab* 2017;61:108–14.
 91. Boi F, Baghino G, Atzeni F, Lai ML, Faa LG, Mariotti S. The diagnostic value for differentiated thyroid carcinoma metastases of thyroglobulin (Tg) measurement in washout fluid from fine-needle aspiration biopsy of neck lymph nodes is maintained in the presence of circulating anti-Tg antibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:1364–9.
 92. Jeon MJ, Kim WG, Jang EK, Choi YM, Lee YM, Sung TY et al. Thyroglobulin level in fine-needle aspirates for preoperative diagnosis of cervical lymph node metastasis in patients with papillary thyroid carcinoma: two different cutoff values according to serum thyroglobulin level. *Thyroid* 2015;25:410–6.
 93. Giovanella L, Bongiovanni M, Trimboli P. Diagnostic value of thyroglobulin assay in cervical lymph node fine-needle aspirations for metastatic differentiated thyroid cancer. *Curr Opin Oncol* 2013;25:6–13.
 94. Grani G, Fumarola A. Thyroglobulin in lymph node fine-needle aspiration washout: a systematic review and meta-analysis of diagnostic accuracy. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:1970–62.

