



Laboratuvar Yönüyle Anti-Tg Antikor Yüksekliğinin İzleme Etkileri ve Çözüm Önerileri

Monitoring Effects of Anti-Tg Antibody Increase with Regards to Laboratory Implications and Solution Recommendations

Özlem Gülbahar

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Öz

Diferansiye tiroid kanser hastalarının tedavi sonrası takibinde Tiroglobulin (Tg) tümör belirteci olarak kullanılmaktadır. Tg ölçümü günümüzde genellikle immünoimetrik analizlerle (IMA) yapılmaktadır. Ancak, IMA yöntemleri kullanıldığında Tg antikor (TgAb) pozitif olan hastalarda Tg ölçümlerinde yanlış negatiflikle karşılaşılabilir. Bu interferansla baş edebilmek için son yıllarda kütle spektrometresi (MS) yöntemleri geliştirilmiştir. İmmün analizle yapılan Tg ölçümlerinin güvenilirliği açısından Tg testi istenilen her hastadan TgAb ölçümü de yapılmalıdır. TgAb pozitif olan hastalarda IMA ile ölçülen Tg sonuçları güvenilir olmayacağı için bir refleks strateji olarak Tg testi MS yöntemi ile ölçülmelidir. Radyoimmün analiz (RIA) yönteminin TgAb interferansına dirençli olduğu ve MS olmayan laboratuvarlarda bu yöntemle Tg ölçülebileceği söylenmektedir. Ancak RIA yönteminin de farklı interferanslara açık bir analiz olduğu unutulmamalıdır. TgAb pozitif hastalarda RIA veya MS yöntemi ile Tg doğrulaması yapılamayacaksa Tg testi rezidü veya rekürrens değerlendirmesinde kullanılamaz. Bu durumda Tg yerine TgAb vekil tümör belirteci olarak kullanılır ve takipte TgAb değişimine göre yorum yapılır. TgAb ölçümü immün yöntemlerle yapılmakla birlikte bu yöntemlerin çeşitli kısıtlılıkları söz konusudur. TgAb ölçümlerinde günümüzde uluslararası önerilen standartlar kullanılmasına rağmen yöntemler arası sonuçlar birbirinden çok farklı olabilmektedir. Bu farklılıkların sebepleri arasında yöntemlerin duyarlılık/özgüllük gibi analitik performanslarının ve eşik değerlerinin farklı olması ile kanser hastalarında mevcut olan TgAb'lerin heterojen yapıda olmaları sayılabilir. Sonuç olarak, vekil belirteç olarak kullanılan TgAb düzeylerinin takipleri aynı ölçüm yöntemi kullanılarak yapılmalı, sonuçlar değerlendirilmelidir.

Abstract

Thyroglobulin (Tg) is widely used as a biochemical tumor marker in the post-treatment follow-up of differentiated thyroid cancer patients. Tg measurement is usually done by immunometric analyzes (IMA). However false negativity is the disadvantage of IMA methods in Tg antibody positive patients. Recently, methods using mass spectrometry to detect Tg have been developed to overcome this interference. In all cases for whom Tg test is requested, serum antithyroglobulin autoantibodies (TgAb) should also be measured for the reliability of Tg measurements made by immune analysis. Tg results measured by IMA will not be reliable if samples are positive for TgAb, then Tg should be measured using MS method as a reflex strategy. It is suggested that the RIA method is resistant to TgAb interference and Tg can be measured with this method in lack of possibility performing MS method. However, it is crucial to keep in mind that the radioimmuno assay (RIA) method is also susceptible to diverse interferences. If there is no possibility for verification of Tg through RIA or MS method in TgAb positive patients, Tg test should not be used to monitor residue or recurrence. In this case, TgAb is used as a surrogate tumor marker instead of Tg, and interpretation is made according to the change of TgAb levels during the follow-up. TgAb measurement is performed by immunoassay, nevertheless, there are various limitations of these methods. In spite of the internationally recommended standards, which used in measurements of TgAb, the results between methods may show inconsistency with each other due to some matters include the analytical performances of the methods such as sensitivity/specificity, the difference in threshold values and the heterogeneous structure of TgAbs present in cancer

Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Prof. Dr. Özlem Gülbahar, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

E-posta: mdzengin@yahoo.com ORCID ID: orcid.org/0000-0003-0450-4305

©Telif Hakkı 2021 Türkiye Nükleer Tıp Derneği / Nükleer Tıp Seminerleri, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.

referans değerlerden ziyade değerler kullanılmalı, sonuçlar birbiriyle karşılaştırılmamalı ve yöntem değişikliği olduğunda klinisyen mutlaka bilgilendirilmelidir. Ayrıca Tg ölçümlerinde olduğu gibi TgAb ölçümlerinde kullanılan immün yöntemlerde de yanlış negatiflik veya yanlış pozitifliğe sebep olabilecek çeşitli interferanslar söz konusu olabilir. Klinikle uyumsuz sonuçlar için interferans araştırması yapılmalı ve sonuçlar her zaman klinik durumla birlikte değerlendirilmelidir.

Anahtar Kelimeler: İyi diferansiye tiroid kanserleri, anti-tiroglobulin, interferans

patients. In conclusion, TgAb follow-up should be done with the same measurement method; threshold values should be used for evaluating the test results, the results should not be compared with each other and the clinician must be informed about the method alterations. In addition, there may be various interferences that may cause false negativity or false positivity in immune methods used in TgAb measurements as in Tg measurements. Interference investigation for clinically incompatible results, should be performed and the results always evaluated together with the clinical situation.

Keywords: Differentiated thyroid cancers, anti-thyroglobulin, interference

Giriş

Diferansiye tiroid kanserleri (DTK) en yaygın malign endokrin tümörlerdir ve tüm tiroid kanserlerinin %90'dan fazlasını oluştururlar (1,2). DTK'lerinde tarama, tanı veya prognostik amaçlı kullanılabilecek biyokimyasal bir belirteç yoktur (3). Bununla birlikte, tiroglobulin, cerrahi ve/veya radyoaktif iyot (RAİ) tedavisi sonrası DTK hastalarını izlemede kullanılan önemli bir tümör belirteçidir (3). Tiroglobulin (Tg) ölçümü, tümör rezidüsü veya rekürrensini varlığını tespit edebilmek açısından, DTK'li hastaların takibinin vazgeçilmez bir parçasıdır (1). Tg analizi için günümüzde farklı avantajları ve dezavantajları olan 3 yöntem mevcuttur (3). İki anti-tijen-antikör bağlanma prensibine dayanan immün analiz (RIA ve IMA) iken bir tanesi son zamanlarda geliştirilen kütle spektrometresi (MS) yöntemidir. Bu yöntemler farklı duyarlılık, özgüllük ve interferans duyarlılığına sahiptirler (1). Günümüzde Tg konsantrasyonları için daha duyarlı olan ve ikinci jenerasyon veya high-sensitive olarak da isimlendirilen IMA yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır [fonksiyonel sensitivite (FS) $\leq 0,1$ ng/mL] (3). Hastanın serumunda Tg antikoru (TgAb) mevcutsa bu antikörler özellikle immüno metrik analizler (IMA) kullanılarak yapılan Tg ölçümlerinde interferansa yol açarak yanlış düşük sonuçlara neden olabilmektedir (3). TgAb varlığında Tg konsantrasyonlarının yanlışlıkla tespit edilemeyecek düzeyde çıkması tümör rekürrensini atlanmasına neden olabilir (4). DTK'li hastaların yaklaşık %20-30'u Tg antikörlerine sahiptir (3). Tg ölçümünde kullanılan immün analizlerin TgAb varlığında interfere olması nedeniyle, böyle bir durumda Tg'nin tümör belirteci olarak kullanılmaması gerektiği belirtilir (3). Serumda TgAb varsa ve Tg ölçüm yöntemi olarak son yıllarda geliştirilmiş olan ve TgAb interferansından etkilenmeyen kütle spektrofotometre kullanılamayacaksa, o zaman

Tg yerine TgAb'nin vekil tümör belirteci olarak kullanılabileceği ifade edilmektedir (3). Pratikte TgAb değişimi DTK hastalarının takibinde kullanılmaktadır. Ancak, TgAb direkt tümör belirteci değildir ve TgAb varlığı benign veya malign hastalıklarda Tg'ye karşı ortaya çıkan immün cevabı yansıtır (5).

TgAb direkt olarak immün analizlerle veya indirekt olarak geri kazanım testleriyle tespit edilebilmektedir (6). Bununla birlikte, rehberler tarafından TgAb taramasının geri kazanım testleri yerine sensitif immün analizlerle yapılması önerilmektedir (1,6). TgAb ölçümü için günümüzde Radioimmunoassay (RIA), Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Chemiluminescence immunoassay (CLIA) ve Electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) gibi çeşitli immün yöntemler mevcut olmakla birlikte en yaygın olarak CLIA veya ECLIA yöntemleri kullanılmaktadır (7). TgAb ölçüm yöntemlerinin analitik kısıtlılıkları söz konusudur. Üreticiler tarafından, standardizasyon için rehberlerde önerilen Uluslararası Referans Hazırlama (*International Reference Preparation - IRP*) MRC 65/93 kullanılmasına rağmen, immün yöntemler arasında analitik performanslardaki değişkenliğin yüksek olduğu gösterilmiştir (8). Yöntemler arasında duyarlılık, özgüllük, interferans eğilimi, referans ve eşik değerler açısından farklar vardır (8). Buna ek olarak, hastaların TgAb'lerinin heterojen yapısı ve epitop bölgelerindeki farklılıkların da analizler arası uyumsuzluklara katkısı olabileceği ifade edilmektedir (9). Tüm bu farklılıklar, DTK'li hastaların takibinde TgAb sonuçlarının yorumlanmasını ve yöntemler/laboratuvarlar arası karşılaştırmayı zorlaştırmaktadır.

Total tiroid ablasyonu yapılan ve TgAb pozitif olan hastalarda, Tg düzeylerinin tespit edilemez seviyelerde ve TgAb düzeylerinin düşme eğiliminde olmasının takipte güven verici değerlendirme kriterleri

olduğu belirtilmektedir (10). Bununla birlikte, DTK'li hastaların takibi uygulanan tedavi şekline, TgAb pozitifliğine ve TgAb ölçümü için kullanılan yöntemlere göre değişebilmektedir. Takipte Tg ve TgAb düzeylerinin kullanımına ilişkin araştırmalar devam etmektedir. Sonuç olarak, günümüzde henüz en yaygın kullanılan Tg ölçüm yöntemleri IMA yöntemleridir ve bu yöntemlerle TgAb varlığında yanlış negatif sonuçlar elde edilebilmektedir. Bu nedenle, TgAb pozitif DTK'li hastaların takibinde Tg yerine vekil belirteç olarak TgAb değişimi izlenebilmektedir. DTK'li hastalarda tümör belirteci olan Tg'nin ölçümleri için TgAb interferansından etkilenmeyen MS yöntemleri analitik performansları ve klinik laboratuvarlarda uygulanabilirlikleri açısından yeterli hale gelene kadar TgAb düzeylerinin değişimi izlenmeye devam edecektir. Bu nedenle, DTK'li hastaların takibi sırasında kullanılan TgAb ve dolayısıyla Tg sonuçlarının doğru yorumlanabilmesi için interferanslar dahil TgAb ölçüm yöntemlerinin temel özelliklerinin iyi biliniyor olması gerekmektedir.

A. TgAb Prevalansı

TgAb'lerin prevalansı ölçüm için kullanılan analiz metoduna, metodun duyarlılık ve özgüllüğüne, eşik değerlerine bağlı olarak değişir (3,8). NHANES III araştırmasında kompetitif bir immün analiz yöntemi kullanılmış ve genel popülasyondaki TgAb prevalansı yaklaşık %10 olarak belirlenmiştir (4,6). Ama farklı araştırmalarda tiroid antikorlarının genel popülasyondaki prevalansı %10 ile %20 arasında değişen rakamlarda tespit edilmiştir (3). Serum tiroid antikor konsantrasyonu yüksek olan bireylerin prevalansı yaş, cinsiyet ve ırka göre değişmektedir (3,4). Örneğin kadınlarda TgAb pozitifliği daha siktir (3,8). Gebe kadınlarda TgAb %10-20 arasında değişmektedir (3,4). DTK'li hastalarda ise prevalans %20-30 arasındadır (3,4). Ayrıca, TgAb otoimmün tiroid hastalıklarında sıklıkla (yaklaşık %60) görülmektedir (8) ve subakut tiroidit atağından sonra geçici olarak düşük antikor titreleriyle karşılaşılabilmektedir (4).

Tiroid otoantikorlarının prevalansı tip 1 diyabet ve pernisiyöz anemi gibi non-tiroid otoimmün hastalıklarda artar. Yaşlanma da tiroid otoantikorlarının görülmesi ile ilişkilidir (6).

B. TgAb Ölçümü

I. TgAb Varlığı Tg Ölçümlerini Nasıl Etkiler?

TgAb pozitifliğinde Tg sonuçlarına güvenilmemesinin ve TgAb'nin vekil belirteç olarak kullanılmasının nedeni serumda TgAb varlığının Tg sonuçlarında yanlış

negatifliğe yol açmasıdır (8,10,11,12). Bu durum 2 farklı şekilde açıklanmaktadır. İlki, yöntemle ilişkilidir (1). İkinci jenerasyon olanlar dahil Tg ölçümünde kullanılan IMA'larda, bir kural olarak, serumdaki TgAb'ler Tg'ye bağlandığı için, Tg'nin kitte bulunan antikorlara bağlanma bölgesi işgal edilir ve Tg bu antikorlara bağlanamaz. Sonuçta ışına ortaya çıkmasını sağlayan antijen-antikor kompleksini oluşturamazlar (8). İkinci açıklama ise, *in vivo* şartlarda TgAb'lerin TgAb-Tg kompleksi oluşturarak dolaşımdaki Tg'nin klirensini artırmasıdır (1). Hastalık progresyonu ile TgAb konsantrasyon artışı ve Tg'nin paradoksal olarak azalması arasındaki ilişkinin sebeplerinden birisinin bu olduğu belirtilmektedir (1). Bu da metodolojiden bağımsız olarak Tg'nin neden güvenilir bir tümör belirteci olduğunu açıklar (1). Sonuçta, TgAb varlığında yanlış düşük Tg sonuçları hastalık rekürrensini maskeleyebilir ve olumsuz sonuçlara neden olabilir (8).

TgAb pozitif hastalarda immün analizlerle yapılan Tg ölçümlerinde görülebilen bu negatif interferansın üstesinden gelebilmek amacıyla Tg ölçümleri için MS yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde tripsin ile proteinler yıkıldığı için interfere edici antikorlar da yıkılmakta ve böylece interferans elimine edilmektedir (13). Ancak, TgAb varlığında güvenilir Tg ölçümü sağlayan bu MS yönteminin, günümüzde kullanılan ikinci jenerasyon immün analizlere göre dezavantajı ise kantitasyon limitlerinin (LOQ) daha yüksek olmasıdır (1). Sonuç olarak düşük düzeylerdeki Tg'leri tespit edemeyebilir. Klinik olarak aktif olan hastalarda yapılan çalışmalarda immün yöntemlerle tespit edilemez düzeylerde çıkan Tg sonuçlarının sadece %60'ı MS yöntemi ile tespit edilebilmiştir. Ayrıca MS yöntemleri rutin analizde kullanmak için teknik olarak çok daha zor ve uzun yöntemlerdir. MS yöntemlerinin duyarlılığı iyileştirilene kadar immün yöntemler ilk tercih olmaya devam edecektir (13).

Yapılan bir çalışmada, TgAb pozitif hastalarda EIA, RIA ve MS yöntemleri ile Tg düzeyleri karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada Tg konsantrasyonları düşük ve yüksek olacak şekilde sınıflandırılmış ve TgAb pozitif olanlar içinde özellikle düşük Tg düzeylerinde EIA ile MS ve EIA ile RIA yöntemlerinin korelasyonlarının daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu düşük düzeydeki Tg'ler hastaların %40'ında MS yöntemiyle tespit edilemez düzeyde bulunurken RIA yönteminde tespit edilebilmiştir. Bunun 2 sebepten kaynaklandığı ifade edilmektedir. İlki, RIA'da yanlış pozitif sonuçlar olabileceği, ikincisi ise MS yönteminin alt ölçüm sınırı düşük olduğu için yanlış negatif sonuçlar olabileceğidir (14). TgAb pozitif

hastalarda MS yöntemine ulaşamadığı durumlarda RIA yöntemi Tg ölçümü için doğrulama yöntemi olarak kullanılabilir. IMA'da görülen TgAb interferansının RIA'da görülmeyeceği düşünülmele birlikte, analizin özelliklerine ve hastadaki TgAb immünojenitesine bağlı olarak bu yöntemle de yanlış düşük veya yanlış yüksek sonuçlar elde edilebileceği unutulmamalıdır (15).

TgAb varlığı ile Tg negatifliği arasındaki ilişkinin derecesine yönelik yapılan araştırmaların birinde, referans yöntem olarak MS kullanılmış ve 4 farklı immün analizin analitik performansı değerlendirilmiştir. Ancak, TgAb konsantrasyonu ile Tg yanlış negatifliğinin derecesi arasında ilişki olmadığı ve interferansın derecesinin yöntemle göre ve TgAb heterojenitesine göre değişebildiği gösterilmiştir (1,13). Yüksek TgAb düzeyleri interferansa yol açmayabileceği gibi, çok düşük TgAb konsantrasyonlarında interferans görülebilmektedir (16).

II. TgAb Ölçüm Yöntemleri

Takipte önemli olan TgAb'nin ölçüm metodları Tg metodlarından daha değişkendir (4). Düşük konsantrasyonlarda olsalar bile Tg ölçümlerini interfere edebildikleri için, duyarlılık ve özgüllüğü çok yüksek tarama yöntemlerine ihtiyaç vardır (4,6). TgAb ölçümü için RIA, ELISA, CLIA veya ECLIA gibi çeşitli immün yöntemler kullanılabilir (7).

RIA:

Günümüzde kullanılan RIA yöntemleri genellikle tek basamaklı yarışmalı yöntemlerdir. Poliklonal veya monoklonal insan TgAb'lerin bağlanmış olduğu tüpler içine TgAb ölçümü yapılacak serum ilave edilir. Ardından tüplere I-125 ile işaretlenmiş insan Tg'si (tracer) eklenir. Serumda yer alan TgAb'ler ve tüplerdeki solid faza bağlanmış poliklonal veya monoklonal insan TgAb'leri, I-125 ile işaretlenmiş insan Tg'sinin (tracer) epitoplarına bağlanmak için yarışır. Radyoaktivite düzeyi ile TgAb konsantrasyonları ters orantılıdır. RIA yönteminin duyarlılığı DTK hastalarının takibinde kullanılan Tg sonuçlarının validasyonunu değerlendirmek için yeterlidir (4).

ELISA:

ELISA metodunda kullanılan mikrotateler Tg antijenleri ile kaplanmıştır. Bu kuyucuklara serum eklenir ve serumdaki TgAb'lerin Tg'lere bağlanması için bir süre beklenir. Ardından enzimle (ALP vb.) işaretli TgAb'ler ilave edilir ve bu işaretli TgAb'lerin bir aşama önce oluşan Tg-

TgAb kompleksine bağlanması için karışım tekrar inkübe edilir. Son olarak enzime uygun substrat (p-nitrophenyl phosphate vb.) eklenir ve ortaya çıkan ürün belirli bir dalga boyunda ölçülür. Serumdaki TgAb ne kadar fazlaysa ortaya çıkan absorpsiyon o kadar fazla olur. ELISA yöntemi Tg ölçümlerinin güvenilirliği açısından TgAb analizi için duyarlılığı ve özgüllüğü uygun olan yöntemlerdir (4).

İmmünoimetrik Analizler (IMA)

Günümüzde klinik laboratuvarlarda en çok bu yöntemler kullanılmaktadır. Ancak immün analizler farklı formlarda ve dizaynlarda olabilirler. Tipik olarak solid faz, işaretli Tg veya işaretli TgAb içerirler. Kompetitif veya non-kompetitif yöntemler olabilir (4).

Kompetitif yöntemlerde solid faza (paramanyetik boncuklar vb.) kovalent olarak bağlı bulunan antikolar serumdaki TgAb ile sınırlı miktardaki işaretli Tg'ye bağlanmak için yarışır. Tg işareti için akrinyum esteri gibi kemilüminesan bileşikler kullanılırsa yöntemin ismi immunochemiluminescence assays (ICMA) olur, floresan bileşikler kullanılırsa immunofluorescence assays (IFMA) ve radyoizotop madde kullanılırsa immunoradiometric assay (IRMA) olur (4).

Non-kompetitif yöntemler sıralı 2 basamaklı sandviç formatında yaklaşımları kullanabilirler. İlk aşamada, Tg ile kaplı paramanyetik partiküllere veya mikromanyetik boncuklara serum ilave edilince, serumdaki TgAb ile Tg bağlanır. İkinci basamakta, karışıma işaretli Tg/TgAb ve substrat eklenerek ortaya çıkan ürünün sinyali ölçülür. CLIA veya ECLIA yöntemleri kullanılan kimyasalların yarı ömrünün uzun olması, yüksek duyarlılığa sahip olmaları, otomatize olmaları ve radyoaktif atık ortaya çıkmaması gibi avantajlar nedeniyle en çok tercih edilen yöntemlerdir (4).

III. TgAb İçin Referans Yöntem ve Standardizasyon

TgAb ölçümü için günümüzde referans yöntem yoktur (4). Ancak, yöntemlerin standardizasyonu için IRP Tıbbi Araştırma Konseyi (*Medical Research Council's* - MRC) 65/93 yaygın olarak kullanılmaktadır (4,6,8). Rehberler tarafından önerilen bu standartların kullanımı sonucu ortaya çıkan gelişmelere ve yöntemler arası korelasyonların iyi olmasına rağmen, analizlerin duyarlılıkları ve özgüllükleri değişkendir (4,6,8). TgAb ölçümünde kullanılan immün yöntemlerin en düşük ölçüm limiti (*limit of detection* - LOD), FS, referans aralık ve eşik değerleri birbirinden farklıdır. Bu değişkenliğin sebeplerinden birisi, MRC 65/93 primer standartının 50 yıldan daha fazladır kullanılıyor

olması ve DTK'li değil otoimmün tiroiditli hastalardan hazırlanmış olmasıdır (16). Ayrıca, üretici firmaların bu primer standartı kullanarak hazırladıkları kendi sekonder kalibratörleri arasında da farklılıklar mevcuttur (16). Üstelik, TgAb ölçüm kitlerinde kullanılan Tg antijenindeki (Tracer) farklılıklar da TgAb ölçüm yöntemleri arasındaki uyumsuzluklara katkıda bulunmaktadır (8). Sonuç olarak, TgAb pozitif olan DTK'li hastalarda yapılan çalışmalarda, yöntemler arası TgAb sonuçlarının farklı olması şaşırtıcı değildir.

Yöntemler arasında farklılıklar görülmesinin sebeplerinden bir tanesi de TgAb heterojenitesidir. DTK hastalarında görülen TgAb heterojenitesi otoimmün tiroid hastalıklarındaki gibi daha fazladır (6). Yöntemlerdeki TgAb afinitesi ve epitop özgüllüğündeki kalitatif farklılıklardan dolayı bu heterojen TgAb düzeyleri yöntemler arasında farklı elde edilebilmektedir (6). Bu nedenle özellikle DTK'li hastaların takibi açısından TgAb ölçüm yöntemlerinin özgüllüğünün geniş olması gerekmektedir (6). Ayrıca, Graves ve metastatik DTK'li hastalarda olduğu gibi serumda yüksek düzeyde Tg bulunması TgAb ölçümünün interfere edebilmektedir (6).

Sonuç olarak TgAb yöntemlerinin analitik kısıtlılıkları söz konusudur ve TgAb ölçümünde kullanılan Tg pürifikasyonundaki farklı yaklaşımlar, TgAb'lerin sağlıklı ve hasta bireylerdeki kalitatif farkları gibi nedenlerle ölçüm standardizasyonu hala tam olarak sağlanabilmiş değildir (4,8). Üreticilerin TgAb analitik performanslarını geliştirmeleri için CLSI rehberlerinin protokollerine uygun olarak iyileştirme çalışmalarına devam etmeleri gerekmektedir (8).

IV. TgAb Yönteminde Görülen İnterferanslar

TgAb ölçümünde immün analizler kullanılmaktadır ve bu yöntemler interferansa eğilimli yöntemlerdir (3). İnterferans, örnekte mevcut olan bir yapının test sonucunun gerçek değerini değiştirme etkisi olarak tanımlanır (17). İnterferanslar TgAb sonuçlarının yanlış yüksek veya yanlış düşük çıkmasına neden olabilir. Tg ölçüm sonuçlarında TgAb nedeniyle interferans görülmesine benzer şekilde TgAb ölçümlerinde de başka antikolar veya başka yapılar tarafından interferanslar söz konusu olabilir. TgAb test sonuçlarını doğru yorumlayabilmek için TgAb ölçümünde kullanılan immün analizlerde görülen interferansları iyi anlamak gerekir. Benzer durumlar, Tg ölçümünde kullanılan immün yöntemler için de geçerlidir (4). İmmün analizlerde çok çeşitli interferanslar görülebilmektedir (17).

İmmün Yöntemlerde İnterferans Araştırması ve Çözüm Önerileri

-İnterferans araştırması klinikle test sonucunun uyumsuz olduğu durumda interferanstan "şüpheli" edilmesi ile başlar (17). İmmün yöntemler, antijen-antikor bağlanma prensibi kullanıldığı için, doğası gereği özellikle antikolarla interferansa açık yöntemlerdir (18). Heterofil antikolar (HAb), human anti-animal antibody (HAAA), özellikle HAMA: human anti-mouse antibody ve romatoid faktör (RF) gibi endojen antikolar interferansa sebep olabilir (4,17). Endojen antikolarla oluşan interferanslarda yanlış düşük sonuçlar görülebilmekle birlikte genellikle yanlış yüksek sonuçlarla karşılaşılır (17). Benzer durum, ekzojen antikolarla da ortaya çıkabilir (19). DTK hastası olan bir olguda tedavi öncesi serum TgAb testi negatif iken tedavi sonrası pozitifleştiği tespit edilmiştir (19). Hastanın IMA yöntemleriyle çalışıldığında negatif bulunan Tg testi MS yöntemiyle de çalışılmış ve sonucun gerçek negatif olduğu doğrulanmıştır (19). Bunun üzerine TgAb testinde interferans olabileceği düşünüldüğü detaylı araştırıldığında, hastanın yaygın değişken immün yetmezlik ve dermatomiyozit tanıları nedeniyle tedavi amaçlı subkütan IgG kullandığı anlaşılmıştır (19). Sonuçta, TgAb analizinde dışardan alınan IgG sebebiyle bir interferans olduğu ve sonucun yanlış pozitif olduğu düşünülmüştür. Tedavinin azaltıldığı haftalarda TgAb düzeylerinin azalması ile TgAb ölçüm yönteminde interferans olduğu doğrulanmıştır (19).

TgAb ölçümlerinin hastanın serumundaki antikordan etkilenmediği ve yanlış yüksek sonuçlar ortaya çıkabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (3). Bununla birlikte, TgAb analizlerinde yanlış negatiflikle de karşılaşılabilir. Örneğin, Hashimoto tiroiditi olduğu kanıtlanmış bir tiroid kanserli hastada, rutin TgAb analizi negatifse interferans nedeniyle yanlış negatif çıkmış olabileceği akla gelmelidir.

Endojen antikolarla interferans şüphesi olduğunda yapılması gereken alternatif bir yöntemle ölçüm yapmaktır (17). Çünkü, üreticilerin yöntemlerde kullandığı antikolar serumdaki TgAb'nin farklı epitop bölgelerine karşı oluşturulmuş ve farklı hayvanlardan üretilen antikolar olabilir. Dolayısıyla, kitte bulunan antikolarla hastanın serumundaki interfere edici antikolar bir yöntemde çapraz reaksiyon oluştururken diğerinde oluşturmayabilir (17).

Firmaların iyileştirme çalışmaları sonucu, son yıllarda immün analizlerde görülen endojen antikor kaynaklı interferanslar oldukça azalmıştır ancak tamamen ortadan kaldırılamamıştır (17). TgAb testlerinde beklenmeyen

sonuçlar görüldüğünde HAb, HAAA veya RF gibi endojen antikorlar veya ekzojen antikorlar ile interferans olasılığı göz önünde bulundurulmalıdır. İki bölge İMA yöntemleri diğer immün analizlere göre interferansa daha eğilimli gibi görünmesine rağmen, tüm immün analizlerde böyle bir olasılık vardır (17). Klinikle uyumsuz olan test sonuçları olduğu durumda interferans ihtimali mutlaka düşünülmelidir.

-Endojen antikorların immün analizlerde sebep olduğu interferansları araştırmada, farklı üreticiler ile karşılaştırma dışında yöntemler de kullanılmaktadır (20). Seri dilüsyon (1/2, ¼, 1/8 vb.), heterofil bloke edici tüpler ve/veya kimyasallar kullanma, RF düzeylerini ölçme gibi yöntemler bunlardan bazılarıdır (17). Bununla birlikte, TgAb interferansları ile ilişkili literatürde, incelendiği kadarıyla, bu yöntemlerin kullanıldığı bir çalışmaya rastlanamamıştır.

-Analiz öncesi faktörlerin dışlanması: TgAb ölçümünde kullanılan yöntemin içeriğinde biotin varsa ve hasta dışarıdan biotin takviyesi alıyorsa interferans ihtimali göz önünde bulundurulmalıdır (17). Serumda bulunan biotin yöntemde kullanılan biotin ile etkileşerek yanlış sonuçlara neden olabilir. Bu durumda yapılması gereken biotin kullanmayan bir yöntemle TgAb ölçümünün tekrarlanmasıdır.

Hook (Kanca) Etkisi

Hook etkisi özel bir tür interferanstır. Ancak burada interferansa yol açan neden serumdaki diğer antikorlar (HAb, HAAA, RF vb.) değil analitin kendisidir (3). Özellikle İMA yöntemlerinde görülen bir durumdur. Hook etkisi TgAb ve Tg gibi analitlerin, çok yüksek konsantrasyonlarda olduğu zaman yöntem tarafından tespit edilememeleri ve yanlış düşük düzeylerde ölçümleri durumudur (3). TgAb çok yüksek konsantrasyonlarda olduğunda, yöntemde kullanılan sınırlı kapasitedeki yakalayıcı antikora TgAb'nin tamamı bağlanamaz ve bir kısmı açıkta kalır. Bu nedenle çok yüksek bulunması gerekirken ya normal miktarda ya da çok düşük düzeylerde bulunabilir (6). Böyle bir hastada, Tg sonucu da tespit edilemeyecek düzeylerde bulunursa, TgAb yanlışlıkla negatif kabul edildiği için interferans yok gibi düşünülebilir ve rekürrens atlanabilir (3). Hook etkisinden şüphelenildiği durumda dilüsyonlu bir şekilde seri ölçümler yapılmalı ve bu ölçümlerde aynı kitler ve aynı cihazlar kullanılmalıdır (3).

Hook etkisini minimize etmek için rehberler tek basamaklı yerine iki basamaklı immün analiz dizaynını önerirler (6). Pratikte kullanılan TgAb yöntemleri genellikle iki basamaklıdır ve hook etkisi çok nadir

görülür. Hook etkisi görülme ihtimali olan TgAb konsantrasyonları üretici firmalar tarafından genellikle paylaşılır ve bu düzeyler hastalarda sık görülmeyecek kadar çok yüksektir. Buna rağmen, beklenmeyen sonuçlar olduğu durumda hook etkisi ile karşılaşılabilmek ihtimali göz ardı edilmemelidir (6).

V. TgAb Referans Aralığı ve Eşik Düzeyleri

TgAb sonuçları bazı laboratuvarlarda eşik değerleri üzerinden rapor edilebildiği gibi, bazılarında referans aralık verilerek raporlanmaktadır. TgAb referans aralığı ve eşik değerleri metoda, metodun duyarlılık ve özgüllüğüne, hatta bu değerleri bulmak için araştırılan popülasyona bağlıdır (4,6). Dolayısıyla yöntemler arasında çok farklı olabilmektedir. TgAb için eşik veya üst referans sınırını (URL) tanımlamak uygun referans grubu bulmak ve Tg değerlendirmesinde kullanılacak interferansı tanımlamak zor olduğu için tartışmalıdır. Ayrıca, vekil tümör belirtici olarak kullanmak üzere uygun TgAb eşik değerini belirlemek açısından da bu zorluklar söz konusudur (4,8). Referans sınırları veya eşik değerlerini belirlemek için rehberlerin önerdiği protokoller temel alınmalıdır (6).

Üretici firmaların TgAb için önerdiği referans veya eşik düzeyleri DTK için değil otoimmün tiroid hastalıkları için belirlenen değerdir (1,8). Yani, Tg ölçümlerinde interferansa yol açan TgAb düzeylerine göre oldukça yüksek seviyededir (1). Genel olarak TgAb yöntemleri düşük tespit limiti olanlar (<10 kIU/L) ve yüksek tespit limiti (>10 kIU/L) olanlar şeklinde 2 gruba ayrılır (6).

Üreticilerin önerdiği eşik düzeyleri baz alındığında "normal" olarak değerlendirilen düşük konsantrasyondaki TgAb düzeyleri bile Tg ölçümünde klinik olarak anlamlı interferanslara yol açabilir (1,16,21). Yapılan bir çalışmada, TgAb için 4 farklı immün yöntem ve RIA yöntemi karşılaştırılmış ve üreticinin önerdiği eşik değerleri temel alınmıştır (1). Sonuçta, Tg interferansına yol açtığı gösterilmiş olmasına rağmen, örneklerin yüksek bir yüzdesinde (%21-44'ünde: yöntem göre değişen yüzdeler) TgAb düzeylerinin negatif olarak kabul edildiği ifade edilmektedir (1). Sonuç olarak, Tg interferansı açısından TgAb eşik düzeyi olarak yöntemin LOD değerinin kullanılması önerilmiştir (1). Ancak bu çalışmada interferans olduğunu göstermek amacıyla interferans konusunda geçerliliği onaylanmış olmayan bir yöntem olan RIA kullanılmıştır (1). Bu konuda daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğu açıktır.

TgAb interferansı için eşik olarak LOD yerine FS (LOQ) kullanılmasını öneren çalışmalar da vardır (1). Bununla

birlikte, LOQ kullanıldığında da analizler arasındaki uyumun optimal olmadığı çalışmalarda gösterilmiştir (1). Yaygın kullanılan TgAb yöntemleri karşılaştırılarak yapılan bir çalışmada, potansiyel olarak interfere edici TgAb varlığını göstermek için TgAb analizlerinde referans aralığı yerine LOQ değerleri kullanılması gerektiği ifade edilmektedir (13).

C. TgAb Test Sonuçlarının Yorumlanması ve Öneriler

Düşük konsantrasyonlardaki TgAb değerlerinin klinik önemi çok açık değildir (6). Sağlıklı kişilerde görülebileceği gibi tiroid cerrahisi veya RAİ tedavisine bir cevap olarak veya altta yatan bir otoimmün tiroidite bağlı olabilir (6). Düşük konsantrasyonlardaki TgAb patofizyolojik olarak önemli olmayabilir, ancak Tg testini interfere etme potansiyelinin değerlendirilmesinde düşük düzeylerde de olsa varlığı önemlidir (6). Bu nedenle, DTK hastalarının takibinde kritik olan Tg sonucunun güvenilirliği değerlendirilebilmek amacıyla Tg ve TgAb ölçümleri rutin olarak birlikte bakılmaktadır (22,23).

Günümüzde TgAb ölçümleri için rehberlerin önerdiği referans materyaller kullanıldığı halde immün yöntemler henüz harmonizasyon problemini ortadan kaldıramamıştır. Bu nedenle sonuçlar çok farklı olabilir ve birbirleri ile karşılaştırılmaz (6,8). Yapılan bir çalışmada, sağlıklı 120 kişide TgAb konsantrasyonları 11 farklı immün yöntem kullanılarak karşılaştırılmış ve metodlar arası ikili karşılaştırmalardaki r değerleri 0,17 ile 0,56 arasında bulunmuştur (8). TgAb sonuçlarının yöntemler arası değişkenliği için bakılan interquartiel range değerleri %25 için 0,24-11,5 arası, %75 için 0,59-17,97 arasında bulunmuştur (8). Ayrıca bu 11 yöntemin üretici tarafından belirtilen URL değerleri 4,11 ile 11,5 arasında değişmesine rağmen, çalışmada CLSI rehberlerinin önerdiği direkt metod tekniği ile elde edilen URL değerleri 2,63 ile 4,46 arasında değişmektedir ve birbirinden çok farklıdır (8). TgAb URL'sinin DTK'li hastaların takibinde dikkatli kullanılması gerekmektedir (8). İmmün analizlerle yapılan başka bir çalışmada, yöntemler kalitatif ve kantitatif olarak karşılaştırıldığında R² değerlerinin 0,2 ile 0,7 arasında değiştiği tespit edilmiştir (13).

Sonuç

TgAb test sonuçları yöneme ve TgAb spesifitesine bağlı olarak değişebildiği için yöntemler arasındaki sonuçlar birbiriyle karşılaştırılmamalıdır. TgAb düşük düzeylerde bile olsa Tg ölçümünde interferansa yol

açabileceği için TgAb sonuçlarını değerlendirirken eşik değerler kullanılmalıdır (15). Ayrıca, DTK'li hastaların tedavi yanıtı TgAb düzeyleri ile takip edilebildiği için TgAb ölçümlerinin aynı yöntemle ve mümkünse aynı laboratuvarında yapılması önerilir (1,15). Laboratuvarların, TgAb analizinde değişiklik olması durumunda, yeni yöntemin özellikleri ile ilgili klinisyeni bilgilendirmesi gerekmektedir (6). Eski ve yeni yöntem arasındaki ilişki değerlendirilmeli ve eğer fark >%10 ise hastanın bireysel bazal düzeyinin yeni yöntemde ne olduğu belirlenmelidir (6). Tüm bunlara rağmen klinik ve görüntüleme tetkikleri ile uyumsuz TgAb sonuçları elde edildiğinde interferans olasılığı akla gelmeli ve laboratuvar uzmanı bilgilendirilerek interferans analizi yapılmalıdır.

Kaynaklar

1. Algeciras-Schimmich A. Thyroglobulin measurement in the management of patients with differentiated thyroid cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2018;55:205-218.
2. Kim SJ, Lee SW, Pak K, Shim SR. Diagnostic performance of PET in thyroid cancer with elevated anti-Tg Ab. *Endocr Relat Cancer* 2018;25:643-652.
3. Freedman DB, Halsall D, Marshall WJ and Ellerwick C. Thyroid Disorders. In: Rifai N, Horvath AR and Wittwer C editors. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnosis*. 6th Edition. Missouri: Elsevier; 2018. p. 1572-1616.
4. Hickman PE, Koerbin G editors. *Kaplan and Pesce's Clinical Chemistry: Theory, analysis, correlation*. 5th edition. Elsevier; 2009. p. 1158-1167.
5. Zavala LF, Barra MI, Olmos R, et al. In properly selected patients with differentiated thyroid cancer, antithyroglobulin antibodies decline after thyroidectomy and their sole presence should not be an indication for radioiodine ablation. *Arch Endocrinol Metab* 2019;63:293-299.
6. Baloch Z, Carayon P, Conte-Devolx B et al. Laboratory support for the diagnosis of thyroid disease: Thyroglobulin. *The National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines (NACB)* 2002;55-65.
7. Winter WE, Schatz D, Bertholf RL. The Thyroid: Pathophysiology and thyroid function testing. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE editors. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnosis*. 5th Edition. Missouri: Elsevier; 2012. p. 1905-1945.
8. D'Aurizio F, Metus P, Ferrari A, et al. Definition of the upper reference limit for thyroglobulin antibodies according to the National Academy of Clinical Biochemistry guidelines: comparison of eleven different automated methods. *Autoimmun Highlights* 2017;8:1-10.
9. Lupoli GA, Okosieme OE, Evans C, et al. Prognostic significance of thyroglobulin antibody epitopes in differentiated thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:100-108.

10. Giovannella L. Circulating biomarkers for the detection of tumor recurrence in the postsurgical follow-up of differentiated thyroid carcinoma. *Curr Opin Oncol* 2020;32:7-12.
11. 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.
12. de Meer SGA, Vorselaars WMCM, Kist JW, et al. Follow-up of patients with thyroglobulin-antibodies: Rising Tg-Ab trend is a risk factor for recurrence of differentiated thyroid cancer. *Endocr Res* 2017;42:302-310.
13. 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;55:1987-1994.
14. Wheeler SE, Liu L, Blair HC, et al. Clinical laboratory verification of thyroglobulin concentrations in the presence of autoantibodies to thyroglobulin: comparison of EIA, radioimmunoassay and LC MS/MS measurements in an Urban Hospital. *BMC Res Notes* 2017;10:725.
15. Spencer CA, Feingold KR, Anawalt B, et al. Assay of thyroid hormones and related substances. *J Clin Endocrinol Metabol* 2017.
16. Spencer CA. Assay of Thyroid Hormones and Related Substances. 2017 Feb 20. In: Feingold KR, Anawalt B, et al. editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000. PMID: 25905337.
17. Ward G, Simpson A, Boscatto L, Hickman PE. The investigation of interferences in immunoassay. *Clin Biochem* 2017;50:1306-1311.
18. Howanitz JH, Bjerner B, Chace NM, et al. Immunoassay interference by endogenous antibodies (I/LA30A), Approved Guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2008;28:6.
19. Ogrin C, Ford BA, Stauffer SL, Krasowski MD, Azar AE. Positive Test for Antithyroglobulin Antibodies Due to Administration of Immunoglobulin Replacement Therapy in A Patient with Thyroid Cancer. *Endocr Pract* 2015;21:966-971.
20. Gulbahar O, Konca Degertekin C, Akturk M, et al. A Case With Immunoassay Interferences in the Measurement of Multiple Hormones. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:2147-2153.
21. Guber HA, Farag AF. Evaluation of endocrine function. In: McPherson Pincus editors. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 22th edition. Philadelphia Elsevier; 2011. p. 365-402.
22. Tiroid hastalıkları tanı ve tedavi kılavuzu. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği (TEMED) 2020.
23. Yin N, Sherman SI, Pak Y, Litofsky DR, Gianoukakis AG; National Thyroid Cancer Treatment Cooperative Study Group. The De Novo Detection of Anti-Thyroglobulin Antibodies and Differentiated Thyroid Cancer Recurrence. *Thyroid* 2020;30:1490-1495.