

# TİROGLOBULİN ÖLÇÜMLERİNİN DÜŞÜK TİTRELERDEKİ ANTI-TİROGLOBULİNLE İNTERFERANSININ ARAŞTIRILMASI

## THE INVESTIGATION OF INTERFERATION OF THYROGLOBULIN MEASUREMENT

Mehmet Ramazan ŞEKEROĞLU<sup>1</sup>, Bedia BATI<sup>2</sup>, Erdem ÇOKLUK<sup>1</sup>, Mustafa ÖZTÜRK<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Sakarya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, 54100, Sakarya, Türkiye

<sup>2</sup>Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı, 65100, Van, Türkiye

<sup>3</sup>Medipol Üniversitesi, Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları, 34100, İstanbul, Türkiye

**Cite this article as:** Şekeroğlu MR, Bati B, Çokluk E, Öztürk M. The Investigation of Interferation of Thyroglobulin Measurement. Med J SDU 2019; 26(3): 296-304.

### Öz

#### Giriş

Tiroglobulin (Tg), tiroid follikülü için spesifik bir marker olarak kullanılır. Ancak Tg ölçümlerinde ve dolayısıyla klinik olarak değerlendirilmesindeki en önemli zorluk tiroglobulin antikorlarının (TgAb) sebep olduğu interferanstır. Yüksek konsantrasyondaki TgAb'ların serum Tg ölçümünü interfere ettiği bilinmektedir. Bu çalışmada; düşük konsantrasyonda TgAb bulunan serumların ve negatif TgAb'lu otoimmün tiroiditli hasta serumlarının Tg standartlarına ilavesinin Tg ölçümü üzerine interferansının araştırılması amaçlandı.

#### Gereç-Yöntem

Bu amaçla düşük ve yüksek TgAb konsantrasyonuna sahip serum havuzlarından alınan örnekler Tg standartları içerisine ilave edilerek 1/2, 1/10 ve 1/20 dilüsyonla TgAb konsantrasyonu 5, 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 IU/ml olan numuneler hazırlandı. Aynı sulandırma işlemi TgAb negatif serum havuzları için de yapıldı ve örneklerde Tg ölçümleri yapılarak geri kazanımlar (recovery) hesaplandı.

#### Bulgular

TgAb pozitif numunelerdeki recovery sonuçları % 21- % 56 oranında değişirken, TgAb negatif numunelerindeki % 88 - % 96 arasında bulundu.

### Sonuç

Bu çalışmanın sonuçları TgAb mevcudiyetinin düşük titrelerde bile Tg ölçümlerini önemli oranda interfere ettiğini, dilüsyon oranının bu etkiyi değiştirmedeğini göstermektedir. Ayrıca TgAb dışındaki diğer otoimmün antikorların Tg ölçümlerinde interferansa sebep olmadığı ya da çok az olabileceğini söyleyebiliriz.

**Anahtar Kelimeler:** İmmunometrik ölçüm, tiroglobulin, tiroglobulin antikor, interferans.

### Abstract

#### Objective

Thyroglobulin is used as a specific marker for thyroid follicle. But the most important problem in Tg assays and in its clinical evaluation of interfere that caused by endogenous Tg antibodies (TgAb). It is known that TgAbs with high concentrations interfere with serum Tg assay. In this study it was aimed to explore the interference in Tg assays of adding serum with low concentration of TgAb and serum of patients with autoimmune thyroiditis with negative TgAb into Tg standards.

#### Materials and Methods

For this purpose samples taken from serum pools with high and low TgAb concentration are added into Tg standards and using 1/2, 1/10 and 1/20 dilutions 5,

**İletişim kurulacak yazar/Corresponding author:** erdemcokluk@sakarya.edu.tr

**Müracaat tarihi/Application Date:** 26.09.2018 • **Kabul tarihi/Accepted Date:** 19.02.2019

Available online at <http://dergipark.gov.tr/sdutfd>

Makaleye <http://dergipark.gov.tr/sdutfd> web sayfasından ulaşılabilir.

10, 20, 40, 60, 80 and 100 IU/ml TgAb samples were prepared. The same dilution was done for TgAb negative serum pools and the recoveries were estimated by doing Tg assays on the samples.

### Results

While the recover results were variable from 21 % to 56 % in TgAb positive samples, in TgAb negative samples they varied it was from 88 % to 96 %.

### Conclusion

It can be said from the results of this study that even low titers, of TgAb TgAb existence interferes Tg assays to a great extend and that the dilution rate would not change this effect. And also it can be said that otoimmun antibodies other than TgAb don't cause interference in Tg assays or that they can have very little effect.

**Keywords:** Immunometric assay, thyroglobulin, thyroglobulin antibody, interference.

## Giriş

Molekül ağırlığı 660 kDa olan tiroglobulin (Tg), tiroid bezinde sentezlenen ve tiroid hormonlarının yapımı için gerekli olan bir glikoproteindir (1). Normalde Tg salınımı tiroid uyarıcı hormonun (TSH) kontrolü altındadır ve serum Tg seviyelerinin ölçümü tiroid bezi için spesifik bir biyobelirteçtir (2). Dolayısıyla serum Tg seviyesi, normal ya da tümoral tiroid dokusunun durumu hakkında bilgi verir. Bundan dolayı Tg ölçümleri tiroid kanserlerinin takibinde oldukça önemlidir (3,4). Serum Tg seviyesi özellikle differensiyel tiroid karsinomalarının postoperatif takibinde spesifik ve sensitif bir tümör biyobelirteci olarak kullanılmaktadır (5). Ancak serumda Tg antikorlarının (TgAb) bulunması immünometrik Tg ölçümlerini interfere etmekte ve serum Tg seviyelerinin düşük ölçülmesine neden olmaktadır (6,7). Tg ölçümlerinde ve dolayısıyla klinik olarak değerlendirilmesindeki en önemli zorluk TgAb'un sebep olduğu interferanstır. Ortamdaki TgAb'ler düşük Tg ölçümlerine sebep olmakta, bu da klinik değerlendirmeyi etkilemektedir. Nitekim TgAb pozitif serumlarda interferans nedeniyle Tg geri kazanım testlerinin %70-80 daha düşük ölçüldüğü bildirilmektedir (8,9). Genellikle sporadik guatr, multinodüler guatr ve kanser hastalarında TgAb seviyeleri genel popülasyondan daha fazladır. Yine Graves ve Hashimoto tiroiditi gibi otoimmün hastalıklarda da TgAb seviyeleri yüksektir. Benzer şekilde differensiyel tiroid karsinomalı hastalarda TgAb seviyesi % 10-30 aralığındadır (6,7). Bu nedenle TgAb pozitif hastalarda Tg seviyeleri değerlendirilirken klinisyenlerin bu duruma dikkat etmeleri gerekmektedir. Özellikle postoperatif tümör takibinde bu durum oldukça önemlidir. Yüksek konsantrasyondaki TgAb seviyelerinin serum Tg seviyesini düşürdüğü iyi bilinmesine rağmen acaba düşük TgAb seviyelerinde ya da dilüsyonla konsantrasyonu azaltılan TgAb'li serumlarda Tg ölçümleri nasıl etkilenmektedir? Bu çalışmada immünometrik ölçüm tekniği kullanılarak yapılan serum Tg ölçümü üzerine düşük konsantrasyondaki TgAb etkisinin araştırılması amaçlandı. Ayrıca negatif TgAb'lu Has-

himato tiroidli hastaların serumlarından Tg ölçümlerinin etkilenip etkilenmediği araştırıldı. Böylece TgAb dışındaki antikorların Tg ölçümüne etkisinin olup olmadığı belirlendi.

## Gereç ve Yöntem

Bu çalışma rutin hormon laboratuvarına gelen hasta kan numunelerinde rutin tetkikler çalışıldıktan sonra arta kalan serumlarda gerçekleştirildi. Dolayısıyla numune elde etmek için hastalardan ayrıca kan örnekleri alınmadı. Hasta serumlarından oluşturulan serum havuzları TgAb seviyelerine göre gruplandırıldı. Gruplandırma yapılırken standardizasyon sağlanması açısından kalibre edilmiş aynı hacimdeki pipetler kullanıldı.

### Gruplandırma

Gruplandırma yapılırken hastaların bireysel olarak bazal antikor seviyeleri ölçüldü ve amaçlanan konsantrasyonlara uyumlu antikor seviyesi olan serumlar bir araya getirilerek gruplar oluşturuldu. Bu grupların amaçlanan antikor seviyeleri eksik kalanlar, matriksin seyreltilmesini en aza indirmek için uygun konsantrasyondaki kalibratörlerin ilavesiyle tamamlandı. Detayı aşağıda belirtildiği şekilde uygun Tg standardı kullanılarak 1/2, 1/10 ve 1/20 oranında dilüsyonla, TgAb konsantrasyonları yaklaşık olarak 5, 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 IU/ml ile uyumlu şekilde serum havuzları oluşturuldu. Buna göre;

1/2 dilüsyon için; TgAb konsantrasyon seviyeleri yaklaşık 10, 20, 40, 80, 120, 160 ve 200 IU/ml olan serum havuzları,

1/10 dilüsyon için; TgAb konsantrasyon seviyeleri yaklaşık 50, 100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 IU/ml olan serum havuzları,

1/20 dilüsyon için; TgAb konsantrasyon seviyeleri yaklaşık 100, 200, 400, 800, 1200, 1600 ve 2000 IU/ml olan serum havuzları oluşturuldu.

Ayrıca otoimmün tiroiditi olan ancak TgAb negatif olan hastalardan (Hashimoto tiroiditi hastalar) gelen numunelerden de farklı bir serum havuzu oluşturuldu. Bu grup, TgAb seviyesi negatif olduğu için kontrol grubu olarak değerlendirildi.

Oluşturulan her bir serum havuzu, yaklaşık 10 farklı hastanın serumundan elde edildi. Numuneler çalışılincaya kadar -70 OC de bekletildi.

### Dilüsyonların Yapılması

Az miktarda numune eklemenin, büyük miktarlarda yapılan eklemelerden daha etkili olduğu bilindiğinden (10) klinik karar verme seviyesine yakın numune konsantrasyonu oluşturacak şekilde dilüsyonlar yapıldı. Oluşturulan serum havuzlarında Tg ve TgAb ölçümleri yapıldıktan sonra, her bir serum havuzundan alınan numuneler konsantrasyonu belirli olan düşük (2,17 ng/ml) ve orta (10,5 ng/ml) seviyedeki Tg standartları üzerine ilave edilerek dilüsyonlar sağlandı. Buna göre;

1/2 dilüsyon için; 1 kısım Tg standardı içerisine +1 kısım numune,

1/10 dilüsyon için; 9 kısım Tg standardı içerisine +1 kısım numune,

1/20 dilüsyon için; 19 kısım Tg standardı içerisine +1 kısım numune ilave edildi ve karıştırıldı. Böylece bütün sulandırmalarda (1/2, 1/10 ve 1/20) yukarıda ifade edildiği gibi elde edilen TgAb seviyesi yaklaşık olarak 5, 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 IU/ml olacak şekilde yapılmış oldu. Ayrıca kontrol grubu olarak değerlendirilen Hashimoto tiroiditli hastalardan alınan numuneler de aynı şekilde Tg standartlarıyla 1/2, 1/10 ve 1/20 oranında sulandırıldı.

### Numunelerin Çalışılması

Sulandırılan bütün örnekler bir gün boyunca buzdolabında (2-80 C) bekletilerek Tg ve TgAb etkileşiminin gerçekleşmesi sağlandı. Daha sonra her örnekte Tg ölçümü çift yapılarak ortalaması alındı ve Tg'lerin geri kazanım yüzdeleri hesaplandı. Her sistem için, sağlanan reaktifler ve kalibrasyon materyalleri kullanıldı ve analizler, üreticinin talimatlarına göre gerçekleştirildi. Test sonuçlarının kalitesini izlemek için Bio-Rad sisteminden (Bio-Rad Laboratories Inc., Irvine, CA, ABD) immün belirteçler için kalite kontrol materyalleri kullanıldı. Tüm örnekler sadece kalite kontrol ölçüldükten ve kabul edilebilir aralıkta olduklarından emin olduktan sonra ölçüldü. Serum Tg ve TgAb düzeyleri Immulite 2000 (Siemens Healthineers USA), marka hazır ticari kitler kullanılarak aynı marka otoanalizörde gerçekleştirildi. TgAb ve Tg ölçümleri; bir katı faz,

enzim işaretli kemilüminesans immunometrik ölçüm (IMA)'dür. Tg analizi, 0,3 - 84 ng/ml ölçüm aralığında ve 0,3 - 55 ng/l arasında bir normal aralıkta 0,9 ng/ml analitik hassasiyete sahiptir. Tg-Ab analizi ise 3-1000 IU/ml ölçüm aralığı ve 4,11 IU/ml kesim değerine sahip, 0,31 IU/ml analitik hassasiyete sahipti. Tg ölçümleri için ortalama CV % 5,6 (% 0,5 -% 10,2) ve TgAb için ise CV % 6.1 (% 0,9-% 11,8) idi. % geri kazanım değerleri :  $[\text{Ölçülen Tg seviyesi (ng/ml)} / \text{Beklenen Tg Seviyesi (ng/ml)}] \times 100$  formülü kullanılarak hesaplandı.

### İstatistiksel Analizler

Tg değerlerinin beklenen ve ölçülen seviyelerine ait tanımlayıcı istatistikler; ortalama, standart hata, ortanca değer (medyan), minimum ve maksimum değer olarak verildi. Tg'nin beklenen ve ölçülen değerlerini karşılaştırmada Wilcoxon testi kullanıldı. Ayrıca % geri kazanım değerleri de Wilcoxon testi ile karşılaştırıldı. Karşılaştırmalarda istatistiksel anlamlılık düzeyi % 5 olarak alındı.

### Bulgular

1/2, 1/10 ve 1/20 dilüsyonla elde edilen 100, 80, 60, 40, 20, 10 ve 5 IU/ml'lik TgAb seviyelerine sahip örneklerde, düşük ve orta seviyedeki standartlara göre her bir örnek için beklenen ve ölçülen Tg seviyelerinden geri kazanım yüzdeleri hesaplandı. Tüm ölçülen değerler fonksiyonel duyarlılığın arasında idi. 1/2 dilüsyonda kullanılan düşük Tg standardı 2,17 ng/ml, orta seviyedeki Tg standardı 10,5 ng/ml idi. Buna göre; 1/2 dilüsyon için düşük Tg standardı kullanıldığında hesaplanan % geri kazanım değerleri %30 ile %56 arasında değişim gösterdi. TgAb konsantrasyon seviyeleri azaldıkça yüzde geri kazanımda artış izlenmedi. Orta seviyede Tg standardı kullanıldığında hesaplanan % geri kazanım değerleri %26 ile %56 arasında değişmiş olup, düşük konsantrasyonlu Tg standardına benzer nitelikte TgAb konsantrasyon seviyeleri azaldıkça yüzde geri kazanımda artış izlenmedi. Hesaplanan yüzde geri kazanım değerleri tablo 1 ve tablo 2'de gösterildi.

1/10 dilüsyonda düşük Tg standardı kullanıldığında hesaplanan % geri kazanım değerleri %22 ile %56 arasında idi. Orta seviyede Tg standardı kullanıldığında hesaplanan % geri kazanım değerleri ise %32 ile %45 arasında idi. Hem düşük hem de orta seviyede Tg standardı kullanıldığında hesaplanan değerlerde, TgAb konsantrasyon seviyeleri azaldıkça, yüzde geri kazanımda artış izlendi, fakat bu artış bir trend gösterir nitelikte değildi. Hesaplanan % geri kazanımlara ait değerler tablo 3 ve 4'te sunuldu.

1/20 dilüsyonda, düşük Tg standardı kullanıldığında hesaplanan % geri kazanım değerleri %20 ile %31, orta seviyede Tg standardı kullanıldığında hesapla-

nan % geri kazanım değerleri ise %33 ile %44 arasında idi. Hesaplanan yüzde geri kazanım değerleri tablo 5 ve 6'da gösterildi.

Otoimmün tiroiditi olan ancak TgAb negatif olan hastaların (Hashimoto tiroiditli hastalar) numunelerinden hazırlanan serum havuzunda hesaplanan yüzde geri kazanım değerleri 1/2, 1/10 ve 1/20 dilüsyon ve Tg standart seviyeleri düşük ve orta konsantrasyona sa-

hip olanlar için sırasıyla %95, %91; %88, %96; %81, %91 olup, tablo 7'de gösterildi.

Ayrıca, 1/2, 1/10 ve 1/20 dilüsyonda beklenen ve ölçülen Tg değerlerinin istatistiksel karşılaştırmaları tablo 8, 9 ve 10'da verildi. Bu tablolara bakıldığında gerek düşük gerekse orta seviyedeki Tg standartları ile yapılan tüm dilüsyonlarda ölçülen Tg değerleri beklenen değerlerden düşük bulundu ( $p < 0,05$ ).

Tablo 1

Düşük seviyede Tg standardı (2,17 ng/ml) ile yapılan 1/2 dilüsyonda hesaplanan % geri kazanımlar

Yaklaşık TgAb seviyesi (IU/ml)	Beklenen Tg Seviyesi (ng/ml)	Ölçülen Tg seviyesi (ng/ml)	% geri kazanım
100	1,180	0,532	45
80	1,17	0,347	30
60	0,88	0,267	30
40	0,87	0,363	42
20	1,44	0,742	52
10	1,52	0,849	56
5	0,87	0,385	44

Tablo 2

Orta seviyede Tg standardı (10,5 ng/ml) ile yapılan 1/2 dilüsyonda hesaplanan % geri kazanımlar

Yaklaşık TgAb seviyesi (IU/ml)	Beklenen Tg Seviyesi (ng/ml)	Ölçülen Tg seviyesi (ng/ml)	% geri kazanım
100	5,35	1,80	34
80	5,35	1,39	26
60	4,40	1,42	32
40	4,40	1,53	35
20	5,35	2,89	54
10	5,35	3,01	56

Tablo 3

Düşük seviyede Tg standardı (2,17 ng/ml) ile yapılan 1/10 dilüsyonda hesaplanan % geri kazanımlar

Yaklaşık TgAb seviyesi (IU/ml)	Beklenen Tg Seviyesi (ng/ml)	Ölçülen Tg seviyesi (ng/ml)	% geri kazanım
100	1,79	0,595	33
80	1,77	0,383	22
60	1,64	0,559	34
40	1,77	0,372	21
20	1,76	0,756	43
10	1,77	0,980	55
5	1,97	1,10	56

Yine TgAb pozitif numunelerin düşük ve orta seviyedeki Tg standardı ile yapılan 1/2, 1/10 ve 1/20 dilüsyonlarının % geri kazanım değerlerinin karşılaştırılması tablo 11'de sunuldu.

(1/2, 1/10, 1/20) dilüsyon yapıldıktan sonra beklenen ve ölçülen Tg değerlerinin grup içi karşılaştırmalarında anlamlı fark tespit edilirken ( $p<0.05$ ), orta konsantrasyonda Tg standardı eklenmiş serum havuzlarında bu fark anlamlı değildi ( $p>0.05$ ).

Tablo 11'de görüldüğü gibi, düşük konsantrasyonda Tg standardı eklenmiş serum havuzlarında, üç farklı

Tablo 4

Orta seviyede Tg standardı (10,5 ng/ml) ile yapılan 1/10 dilüsyonda hesaplanan % geri kazanımlar

Yaklaşık TgAb seviyesi (IU/ml)	Beklenen Tg Seviyesi (ng/ml)	Ölçülen Tg seviyesi (ng/ml)	% geri kazanım
100	9,00	3,13	35
80	8,99	2,85	32
60	8,87	2,94	33
40	8,99	3,31	37
20	8,98	4,28	48
10	8,99	4,07	45
5	9,47	4,20	44

Tablo 5

Orta seviyede Tg standardı (10,5 ng/ml) ile yapılan 1/10 dilüsyonda hesaplanan % geri kazanımlar

Yaklaşık TgAb seviyesi (IU/ml)	Beklenen Tg Seviyesi (ng/ml)	Ölçülen Tg seviyesi (ng/ml)	% geri kazanım
100	2,57	0,505	20
80	2,54	0,668	26
60	2,51	0,776	31
40	2,46	0,698	28
20	2,43	0,503	21
10	2,46	0,610	25
5	2,52	0,682	26

Tablo 6

Orta seviyede Tg standardı (10,5 ng/ml) ile yapılan 1/20 dilüsyonda hesaplanan % geri kazanımlar

Yaklaşık TgAb seviyesi (IU/ml)	Beklenen Tg Seviyesi (ng/ml)	Ölçülen Tg seviyesi (ng/ml)	% geri kazanım
100	8,78	3,42	39
80	8,75	3,70	42
60	8,73	3,83	44
40	8,68	3,07	35
20	8,64	3,27	38
10	8,67	2,89	33
5	8,73	3,72	43

Tablo 7

Farklı konsantrasyonlarda Tg standardı ilavesi ile TgAb negatif serum havuzlarında 1/2, 1/10 ve 1/20 dilüsyon yapıldıktan sonra bazal ve ölçülen değerler ile hesaplanan % geri kazanım değerleri

Dilüsyon oranı	Tg standart seviyesi	Beklenen Tg seviyesi (ng/ml)	Ölçülen Tg seviyesi (ng/ml)	% geri kazanım
½	Düşük	27,65	26,20	95
½	Orta	31,75	27,80	91
1/10	Düşük	7,45	6,56	88
1/10	Orta	14,83	14,30	96
1/20	Düşük	4,92	3,98	81
1/20	Orta	12,72	11,60	91

Tablo 8

İki farklı konsantrasyonda Tg standardı eklenmiş serum havuzlarında, 1/2 dilüsyon yapıldıktan sonra beklenen ve ölçülen Tg değerlerinin grup içi karşılaştırmaları

Grup	Median ng/ml	Standart hata	Minimum ng/ml	Maksimum ng/ml	
Düşük Tg standartlı dilüsyonlu beklenen değer	1,17	0,104	0,87	1,52	Z=2,367
Düşük Tg standartlı dilüsyonlu ölçülen değer	0,385	0,083	0,267	0,849	P=0,028
Orta Tg standartlı dilüsyonlu beklenen değer	5,350	0,192	4,40	5,35	Z=2,67
Orta Tg standartlı dilüsyonlu ölçülen değer	1,800	0,258	1,390	3,010	P=0,018

Tablo 9

İki farklı konsantrasyonda Tg standardı eklenmiş serum havuzlarında, 1/10 dilüsyon yapıldıktan sonra beklenen ve ölçülen Tg değerlerinin grup içi karşılaştırmaları

Grup	Median ng/ml	Standart hata	Minimum ng/ml	Maksimum ng/ml	
Düşük Tg standartlı dilüsyonlu beklenen değer	1,77	0,037	1,64	1,97	Z=2,367
Düşük Tg standartlı dilüsyonlu ölçülen değer	0,595	0,107	0,372	1,100	P=0,018
Orta Tg standartlı dilüsyonlu beklenen değer	8,99	0,073	8,87	9,47	Z=3,67
Orta Tg standartlı dilüsyonlu ölçülen değer	3,310	0,235	2,850	4,280	P=0,018

Tablo 10

İki farklı konsantrasyonda Tg standardı eklenmiş serum havuzlarında, 1/10 dilüsyon yapıldıktan sonra beklenen ve ölçülen Tg değerlerinin grup içi karşılaştırmaları

Grup	Median ng/ml	Standart hata	Minimum ng/ml	Maksimum ng/ml	
Düşük Tg standartlı dilüsyonlu beklenen değer	2,51	0,019	2,43	2,57	Z=2,367
Düşük Tg standartlı dilüsyonlu ölçülen değer	0,652	0,038	0,503	0,776	P=0,018
Orta Tg standartlı dilüsyonlu beklenen değer	8,73	0,019	8,64	8,78	Z=3,67
Orta Tg standartlı dilüsyonlu ölçülen değer	3,420	0,135	2,890	3,830	P=0,018

Tablo 11

Düşük ve orta konsantrasyonda Tg standardı eklenmiş serum havuzlarında, üç farklı (1/2, 1/10, 1/20) dilüsyon yapıldıktan sonra beklenen ve ölçülen Tg değerlerinin grup içi karşılaştırılmaları. Farklı harfli grup medianları arasındaki fark anlamlıdır

Grup	Median ng/ml	Standart hata	Minimum ng/ml	Maksimum ng/ml	p
Düşük Tg standartlı 1/2 dilüsyon	0,44 a	0,037	0,30	0,56	0,016
Düşük Tg standartlı 1/10 dilüsyon	0,34 b	0,054	0,21	0,56	
Düşük Tg standartlı 1/20 dilüsyon	0,26 c	0,015	0,20	0,31	
Orta Tg standartlı 1/2 dilüsyon	0,35	0,045	0,26	0,56	0,924
Orta Tg standartlı 1/10 dilüsyon	0,37	0,025	0,32	0,48	
Orta Tg standartlı 1/20 dilüsyon	0,39	0,015	0,33	0,44	

- a: Düşük konsantrasyonlu Tg standardı ile yapılan 1/2 dilüsyonun, 1/10 ve 1/20 dilüsyon sonuçları ile karşılaştırılması  
b: Düşük konsantrasyonlu Tg standardı ile yapılan 1/10 dilüsyonun 1/2 ve 1/20 dilüsyon sonuçları ile karşılaştırılması  
c: Düşük konsantrasyonlu Tg standardı ile yapılan 1/20 dilüsyonun 1/2 ve 1/10 dilüsyon sonuçları ile karşılaştırılması

## Tartışma ve Sonuç

Tg ölçümlerinde genellikle radyoimmunoassay (RIA) ve immunometrik assay (IMA) metotları kullanılmaktadır. Bu metotlardan ilk rutin kullanıma gireni; poliklonal tavşan antikörlerinin kullanıldığı kompetitif RIA metodudur. Daha sonra monoklonal antikörlerin kullanımındaki gelişmelere bağlı olarak IMA metotlarının kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır (6). IMA metotlarının, RIA'ya göre; daha kısa inkübasyon süresinin olması, daha geniş dinamik ölçüm aralığının oluşu, daha stabil işaretli reaktife sahip oluşu, daha hassas oluşu ve otomasyona daha uygun olması gibi avantajları vardır (6,11). Dolayısıyla artık çoğu rutin hormon laboratuvarında IMA ya da yeni gelişen teknolojilerle birlikte Tg ve TgAb ölçümleri için farklı bir metot olarak elektro kemilüminesans immunoassay (ECLIA) yöntemi de yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin ölçüm limitleri ve hassasiyetleri daha keskindir (6, 21). TgAb'lar Graves ve Hashimoto gibi otoimmün tiroid hastalarında olduğu gibi, sporadik guatr, multinodüler guatr ve tiroid kanserli hastalarda da genel popülasyondan daha yaygındır (6). Yine diferensiyel tiroid kanserli hastaların % 10-30'unda TgAb'un pozitif olduğu rapor edilmiştir (12-14). Dolayısıyla bu tür hastalarda TgAb'lar interferansa sebep olarak, hastanın kliniği ile uyumlu olmayan düşük Tg ölçümlerine neden olabilmektedir. TgAb interferansını belirlemek için çoğunlukla eksojen Tg geri kazanım çalışmaları yapılmaktadır. Yapılan bu çalışmalar; TgAb pozitif serumlarda, interferans nedeniyle Tg geri kazanım testlerinin % 70-80 daha düşük ölçülebildiğini göstermiştir (8,9). Ancak bu tür çalışmaların bir kısmında yüksek TgAb seviyeli serumlarda normal geri kazanım, bir kısmında da düşük TgAb'lu serumlarda bozulmuş geri kazanım gibi sonuçlar gösterildiğinden,

TgAb seviyesi ile interferans seviyesi arasında net bir ilişki gösterilememiştir. Dolayısıyla eksojen geri kazanım testlerine kuşku ile yaklaşılmaktadır. Bu yüzden Gao ve ark. (7) serum Tg ve TgAb arasındaki karşılıklı analitik interferansı araştırmak için diferensiyel tiroid kanserli şahıslardan hazırladıkları farklı Tg ve TgAb seviyesine sahip serum havuzlarından elde ettikleri numuneleri değişik oranlarda birbiri ile karıştırarak hem Tg hem de TgAb için endojen geri kazanım test çalışması yapmışlar ve Tg ve TgAb arasında hastadan hastaya değişiklik gösteren konsantrasyona bağımlı ancak eşit olmayan karşılıklı interferans olduğunu göstermişlerdir. Böylece endojen geri kazanım çalışmalarının eksojen geri kazanım çalışmalarından daha iyi sonuç verebileceği gösterilmekle birlikte; yine de Tg ölçümlerinde TgAb interferansının hangi TgAb seviyesinde ne kadar olacağı hususunda net bir yaklaşım ortaya çıkmamıştır. Çalışmamızda Tg standardı içerisinde; düşük ve yüksek TgAb seviyesine sahip serum havuzlarından yine düşük ve yüksek sulandırma ile ( 1/2, 1/10 ve 1/20) yaklaşık 5-100 IU/ml arasında sabit konsantrasyona sahip TgAb seviyeli numuneler hazırlandı ve bunlarda Tg ölçümleri yapılarak eksojen Tg geri kazanım testi yapıldı. Aynı işlemler hem düşük hem de orta seviyedeki Tg standartları ile gerçekleştirildi. Gerek düşük gerekse orta seviyedeki Tg standartları ile yapılan her üç sulandırmada da ölçülen Tg değerleri beklenen değerden önemli oranda düşük bulundu. Yaptığımız tüm sulandırmalarda % geri kazanım değerleri yaklaşık olarak birbirine benzer şekilde % 21-56 arasında değişmiştir. Bu sonuçlar düşük titredeki TgAb pozitif serumlarda bile Tg ölçümlerinin interfere olduğu ve hatalı düşük ölçümlere sebep olduğunu göstermiştir. Bunun aksine TgAb negatif ancak otoimmün Hashimoto tiroiditli hastalardan alınan serum numunesinde her üç sulandırmada da ölçülen Tg değerleri beklenen değerden önemli oranda düşük bulundu. Yaptığımız tüm sulandırmalarda % geri kazanım değerleri yaklaşık olarak birbirine benzer şekilde % 21-56 arasında değişmiştir. Bu sonuçlar düşük titredeki TgAb pozitif serumlarda bile Tg ölçümlerinin interfere olduğu ve hatalı düşük ölçümlere sebep olduğunu göstermiştir. Bunun aksine TgAb negatif ancak otoimmün Hashimoto tiroiditli hastalardan alınan serum numunesinde her üç sulandırmada da ölçülen Tg değerleri beklenen değerden önemli oranda düşük bulundu.

dırmada da % geri kazanım değerleri oldukça yüksek olarak (% 88-96) hesap edilmiştir. Bu sonuç da Tg ölçümlerinde hatalı düşük ölçümlere TgAb'larının son derece etkili olabileceğini düşündürmektedir. Yapılan bir eksojen Tg geri kazanım çalışmasında, % geri kazanım oranının TgAb negatif serumlarda % 82 - % 103, TgAb pozitif serumlarda ise % 27- % 99 arasında değiştiği rapor edilmiştir (15). Çalışmamızın bulguları da bu çalışma ile uyumludur. TgAb'ların sebep olduğu interferansın tipi ve miktarının ölçüm metoduna özgü olduğu da bildirilmektedir (15). Tg çoğu kompetitif immuno ölçümde yüksek ölçülürken, nonkompetitif immünometrik ölçümde düşük ölçülmektedir. IMA'da otoantikorların Tg'yi bağlayarak, ölçümde kullanılan antikorlarla antijen-antikor etkileşimini önlemek suretiyle, hatalı düşük ölçümlere neden olduğu rapor edilmiştir (16). Bu durumda muhtemelen nonkompetitif IMA ölçümlerinde; TgAb pozitif numunedeki serbest Tg ölçülürken, TgAb'larla bağlanarak kompleks bir oluşum meydana getirmiş olan Tg ölçülemez ve böylece Tg düzeyleri hatalı bir şekilde düşük tespit edilmektedir (14). Tg ölçümlerinde otoantikor interferansını tam olarak ortadan kaldırdığı ispatlanmış hiçbir ölçüm metodu olmamasına rağmen, TgAb pozitif serumlu hastalarda yüksek affiniteli tavşan poliklonal antikor kullanılarak bir ölçüm metodunun klinik olarak faydalı sonuçlar verdiği rapor edilmiştir (17). Tg ölçümlerinde TgAb interferansını tanımlamak için kullanılan geri kazanım çalışmalarının tatmin edici bir sonuç ortaya koyamamalarının ve serum TgAb seviyesi ile interferansın derecesi oranında bir korelasyonun olmamasının en önemli sebeplerinden biri de Tg ve TgAb heterojenitesi olabilmektedir. Özellikle TgAb heterojenitesi sebebiyle TgAb konsantrasyonu ile geri kazanım arasında ilişkinin olmadığı da gösterilmiştir (15,16,18). Bu yüzden yapılan son çalışmalar geri kazanım çalışmalarının bu amaçla kullanımını tavsiye edici nitelikte değildir (15,19,20). Hatta Spencer (15), Tg ölçümlerinde Tg antikorların sebep olduğu önemli orandaki bu interferansı ortaya çıkaracak (önleyecek) güvenilir bir test elde edilinceye kadar TgAb içeren hiçbir serumda (numunede) Tg sonucunun rapor edilmesini tavsiye etmiştir. Yine immüno ölçüm metodlarındaki farklılıktan dolayı, TgAb'larının sebep olduğu interferans ölçüm metodlarını farklı etkileyeceğinden özellikle kanser hastası gibi uzun süre takibi gereken hastaların Tg ölçümlerinde aynı metodun (aynı laboratuvarın) kullanılması, laboratuvar değişikliğine gidilmemesi gerektiği de tavsiye edilmektedir (6).

Sonuç olarak, bu çalışmanın bulgularından TgAb mevcudiyetinin düşük titrelere bile Tg ölçümünü interfere ederek hatalı düşük ölçümlere neden olduğunu, kullanılan Tg konsantrasyonunun ya da yapılan dilüsyon oranının bu interferansı değiştirmeye önemli

bir katkı sağlamadığını söyleyebiliriz. Yine Tg ölçümü istenen numunelerde mutlaka TgAb düzeylerinin de istenmesi/çalışılması gerektiği ve TgAb pozitif sonuçlarda klinisyenlerin Tg sonuçlarını değerlendirirken mutlaka interferansı göz önüne alması gerektiğini belirtebiliriz.

Çalışmamızın kısıtlayıcı özelliği serumda immünasay interferansına sebep olabilecek başka faktörlerin (diğer otoimmün antikorlar) değerlendirilmemiş olmasıdır. Fakat hasta numunelerinin kullanılması ve serum havuzları oluşturulurken minimum hacimde standartların kullanılması matriks etkisinin tüm ölçümlerde benzer olmasına dolayısı ile diğer interfere edici ajanların tüm ölçümlerde aynı düzeyde etki etmesine sebep olacağını söyleyebiliriz. .

### Kaynaklar

- Berksöz E. Tiroid Hormonları İnsan Biyokimyası. Onat T, Emerk K, Sönmez EY. editör. 2. baskı. Palme Yayıncılık;2006. p.517-520.
- Fureraç, T., et al.. Role of thyroglobulin in the follow up of the differentiated thyroid cancer in Albania. *Cancer* 2009;19: 1167-1214.
- Emerk K. Kanser İnsan Biyokimyası. Onat T, Emerk K, Sönmez EY. editör. 2. baskı. Palme Yayıncılık;2006. p. 717-727.
- Giovanella, L., et al. Unstimulated highly sensitive thyroglobulin in follow-up of differentiated thyroid cancer patients: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99(2): 440-447
- Taylor, P. N., et al. "A review of the clinical consequences of variation in thyroid function within the reference range. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98(9): 3562-3571.
- Ajjan, R. and A. Weetman. Thyroid autoantibody measurement. *Thyroid function testing*, Springer 2010; 109-124.
- Gao Y, Yuan Z, Yu Y, Lu H Mutual interference between serum thyroglobulin and antithyroglobulin antibody in an automated chemiluminescent immunoassay. *Clin Biochem* 2007; 735-738-40.
- Ajjan, R. and A. Weetman Thyroid autoantibody measurement. *thyroid function testing*, Springer 2010 109-124.
- Giovanella, L., et al.. Thyroglobulin measurement by highly sensitive assays: focus on laboratory challenges. *Clin Chem Lab Med* 2015; 53(9): 1301-1314.
- Zhou, W., et al. Matrix effects and application of matrix effect factor, *Future Science*(. 2017;9(23).
- Gharib, H., et al. American association of clinical endocrinologists, american college of endocrinology, and association medici endocrinologi medical guidelines for clinical practice for the diagnosis and management of thyroid nodules—2016 update. *Endocr Pract* 2016; 22(s1): 1-60.
- Okosieme OE, Evans C, Moss L, Parkes AB, Premawardhana LD, 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.
- Rosario PW, Maia FF, Fagundes TA, Vasconcelos FP, Cardoso LD, Purisch S. Antithyroglobulin antibodies in patients with differentiated thyroid carcinoma: methods of detection, interference with serum thyroglobulin measurement and clinical significance. *Arg Bras Endocrinol Metabol* 2004; 48:487-92.
- Park, J. Y. and L. J. Kricka Interferences in immunoassay. *The Immunoassay Handbook (Fourth Edition)*, Elsevier 2013; 403-



416.

16. Spencer, C. A.. Clinical utility of thyroglobulin antibody (TgAb) measurements for patients with differentiated thyroid cancers (DTC). *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96(12): 3615-3627.
17. Stanojevic, M., et al. Comparison of the influence of thyroglobulin antibodies on serum thyroglobulin values from two different immunoassays in post surgical differentiated thyroid carcinoma patients. *J Clin Lab Anal* 2009; 23(5): 341-346.
18. Spencer, C. and S. Fatemi. Thyroglobulin antibody (TgAb) methods—strengths, pitfalls and clinical utility for monitoring TgAb-positive patients with differentiated thyroid cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2013; 27(5): 701-712.
19. Dufour, D. R.). Thyroglobulin antibodies and their measurement. *thyroid cancer*, springer 2016; 443-447.
20. Dufour, D. R.. Thyroglobulin antibodies—failing the test, 2011;Oxford University Press.
21. Perros, P., et al. Guidelines for the management of thyroid cancer. *Clin Endocrinol* 2014; 81(s1): 1-122.
22. Wang, Z., et al. "Serum thyroglobulin reference intervals in regions with adequate and more than adequate iodine intake." *Medicine* (2016;95(48).

