

Thyreoglobuline, een update

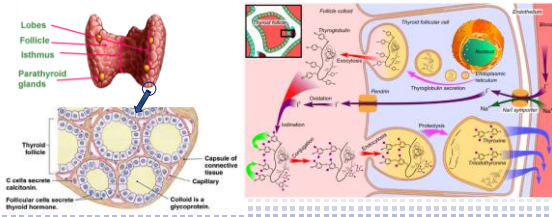
Yolanda de Rijke, PhD
klinisch chemicus-endocrinoloog, Erasmus MC
y.derijke@erasmusmc.nl

Onderwerpen die aan bod komen

- (Patho)Fysiologie
- Toepassingsgebied thyreoglobuline
- Pitfalls:
 - Standaardisatie
 - Antistoffen tegen Tg
- Gevoeligheid Tg bepaling
- Externe QC (LWBA)
- Combineren van immunoassays met massaspectrometrie?
- Take-home messages

Thyreoglobuline - Fysiologie

- 660 kDa glycoproteïne - productie in de schildklier
- Opslag alleen in folliculair colloïd
- Voorloper eiwit t.b.v. synthese van schildklierhormonen T3 en T4



Thyreoglobuline - Pathofysiologie

- Afwezige productie in foetus
- Overproductie in gedifferentieerde maligne schildklierellen (DTC)



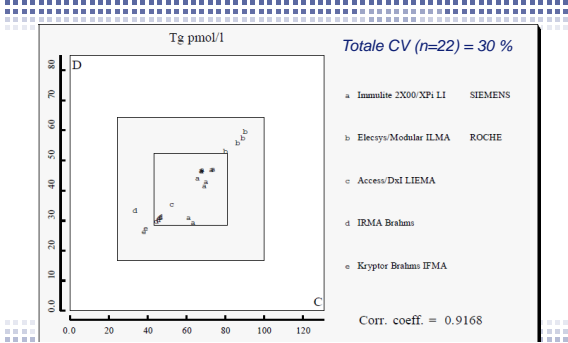
Thyreoglobuline - toepassing

- **Evaluatie Congenitale Hypothyreoïdie (CHT)** bij een pasgeborene
- **Follow-up DTC na thyreoïdectomie en ablatieve ¹³¹I therapie**
 - Tg (huidige assays) heeft een hoge sensitiviteit, m.n. bij:
 - Onttrekken van schildklierhormoon (endogene TSH stimulatie)
 - Exogene stimulatie met rhTSH
 - Geen productie in gedifferentieerde of anaplastische schildklier carcinoemen
- **Niet** voor diagnostiek van schildklier carcinoom of andere schildklier ziektes
 - Tg kan o.a. verhoogd zijn bij:
 - M. Graves
 - Multi-nodulair struma
 - Thyreoiditis

Thyreoglobuline - Pitfalls (standaardisatie)

- In 1988: **40 – 60%** variatie tussen methoden
- Vanaf 1996: BCR 457 Certified Reference Material
Variatie tussen de immunometrische assays rond **30%**

Thyreoglobuline – SKML/LWBA ronde 2014/5



Thyreoglobuline - Pitfalls (standaardisatie)

- In 1988; 40 – 60% variatie tussen methoden
- Door CRM 457 (start 1996) is de variatie teruggebracht tot rond 30%
- Standaardisatie van assays wordt bemoeilijkt door:
 - Verschillende antistoffen – detectie verschillende epitopen
 - Biologische heterogeniteit van Tg (post-translatie modificaties)
 - Verschillen in immunoreactiviteit door synthese van Tg "varianten" door tumorcellen
 - Verschil in interferentie met endogene auto-antistoffen

Thyreoglobuline - Pitfalls

10 – 30% patiënten met DTC heeft detecteerbaar anti-Tg!

Gevolg voor assay:

- Circulerende anti-Tg antistoffen kunnen de assays verstoren en kunnen zowel vals-positieve als vals-negatieve Tg uitslagen veroorzaken

Gevoelige Tg assays - TSH stimulatie overbodig?

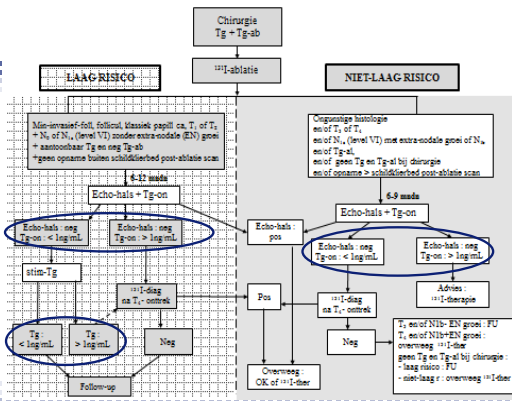
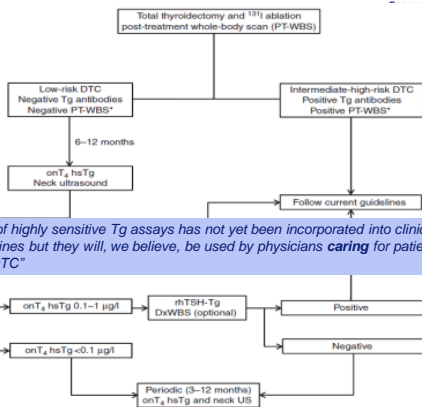
- Sensitiviteit van huidige/oude Tg assays liggen rond 0,5 µg/L - 1 µg/L, terwijl de **beslisgrens** vooralsnog 1 µg/L is (in afwezigheid anti-Tg)
 - Advies: gebruik Tg i.c.m. (endogene/exogene) stimulatie van TSH
- Recent 3rd generatie Tg assays (functionele sens = 0,1 µg/L) die **stimulatie/ontrekken overbodig** maken

Table 2 Technical and analytical characteristics of different highly sensitive Tg immunoassays.

Assay	Manufacturer	Method	Standardisation BCR 457	Analytical sensitivity (manufacturers data)		
				LOD	LOQ	FS
Access Tg	Beckman Coulter (USA)	ICMA	Yes	0.1*	NO	0.1
ELIASON TgCa	Jason (Austria)	ELISA	Yes	0.01	0.1	0.02
ELECSYS Tg II	Roche	ECLIA	Yes	0.04	0.1	NO
KRYPTOR waTg	BRAHMS (Germany)	TRACE	Yes	0.09	NO	0.15

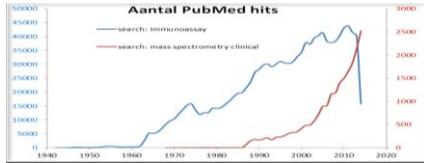
ECLIA, electrochemiluminescence immunoassay; FS, functional sensitivity; ICMA, immunochemiluminometric assay; LOD, limit of quantification; No, not available; NO, not quoted; TRACE, time-resolved amplified cryptate emission.
 *Package insert reports the term "analytical sensitivity".
 Giovannella et al. *Eur J Endocrin*, 2014, 171(2), R33-R46

G



Immunoassay → LCMS/MS

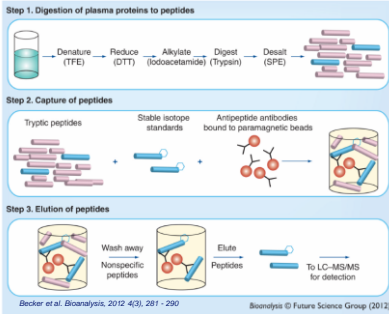
- Rond 1950 → immunoassay
- Rond 1985 → klinische toepassing LCMS (kleine moleculen, bv steroïden/hormonen)



- 2004: Experimentele toepassing combinatie immunoaffiniteit en MS
 - Met name voor specifieke eiwitten




Hoe werkt Immunoaffiniteit-LCMS/MS een mogelijke approach



Waarom zouden we IA en LC-MS/MS combineren?

- Mogelijkheid tot zoeken naar een naald (target peptide/eiwit) in een hooiberg (serumeiwitten)

	Peptide immunoenrichment	
	Before	After
Proteins in plasma	1,796	
Peptides in plasma digest	252,519	253
Peptides with the correct mass	486	1
Peptides with the correct mass and fragment	8	1
Peptides with the correct mass, fragment, and retention time	1	1

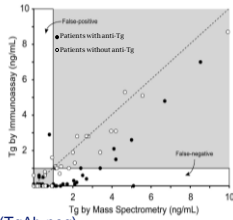


Hooftagle et al., JCEM, 2013, 98(4): 1343-1352



Waarom combineren IA en LC-MS/MS?

- Geen interferentie met endogene Ab!
- Verbreken eiwitbindingen
 - HAb
 - Auto-antistoffen
- Detectie Tg proteotypische peptiden
- Goede vergelijking met immunoassay (TgAb neg)
- LOQ Tg : 0,5-1,0 ug/L



Hoedaghe et al., JCEM, 2013, 98(4):1343-1352

Klinische evaluatie Tg meting m.b.v. IA-LCMS/MS

- 25 – 30% DTC patiënten heeft anti-Tg waarvoor nu geen goede sensitieve/betrouwbare diagnostiek mogelijk is.
- De analytische, maar nog niet de **klinische, relevantie** van gebruik IA-LC-MS/MS voor Tg is aangetoond. Going on in Erasmus MC



Take-home messages

- Tg bepaling is de **gevoeligste marker** voor de follow-up van patiënten met gedifferentieerde schildklierkanker post-therapie.
- **Interlabvariatie** ondanks gebruik referentiemateriaal nog steeds ≈ 30%
- **hsTg** kan mogelijk exogene of endogene stimulatie met TSH overbodig maken
- **IA-LC-MS/MS** heeft potentie om oplossing te bieden aan immunometrische assay problemen