

임상적 치료 결정을 위한 갑상선 미결정 결절의 분자 표지자 검사

아주대학교 의과대학 외과학교실

김형규, 소의영

Molecular Testing of Thyroid Indeterminate Nodules for Clinical Management Decision

Hyeung Kyoo Kim and Euy Young Soh

Department of Surgery, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

Thyroid nodules are the most common endocrine tumor. Ultrasonography and fine-needle aspiration (FNA) are currently accurate diagnostic tools for evaluating thyroid nodules. However, 10-30% of FNA specimens are cytologically indeterminate. Making an accurate diagnosis between benign and malignant nodules is important so that patients with malignant nodule receive proper treatment and patients with benign nodule can avoid unnecessary treatment. Several genetic changes such as point mutations of the BRAF or RAS and rearrangements of the RET/PTC1, RET/PTC3, PAX8/PPARY are used to adjust to indeterminate FNA. Such a mutational analysis has an excellent positive predictive value (PPV), but there is a weakness in the low negative predictive value (NPV). Gene-expression classifier (GEC) has been found helpful in identify nodules that are benign rather than malignant. GEC has an excellent NPV, but there is a weakness of low PPV. Multiplatform mutational and miRNA test (MPT) and next-generation sequencing assay (NGS) are being studied to compensate for these weaknesses. Molecular tests appear to be a good solution for improving the accuracy of indeterminate FNA cytology specimens and support the clinical management decisions in patients with indeterminate cytologic nodules, but further prospective multicenter trials are required for validation of reported findings and need evaluation of cost-effectiveness. This paper will review recently available molecular diagnostic tools of thyroid nodule.

Key Words: Thyroid cancer, Indeterminate thyroid nodules, Molecular testing

서 론

갑상선결절은 내분비 종양에서 가장 흔한 것으로 50세 이상의 여성에서 50% 이상, 남성에서는 20% 이상의 빈도를 보인다.¹⁾ 이러한 갑상선결절에 대한 양성과 악

성의 정확한 감별은 악성인 환자인 경우 적절한 수술적 치료를 받게 하고, 양성인 환자의 경우에는 불필요한 치료를 피하게 함으로써 치료 방향의 결정이 매우 중요하다. 초음파유도 세침흡인세포검사(fine needle aspiration biopsy, FNAB)는 최근까지 갑상선결절의 양성과 악성을 분류하는 데 비교적 정확한 정보를 제공

Received January 31, 2019 / Revised 1st February 26, 2019, 2nd April 13, 2019 / Accepted April 26, 2019
Correspondence: Euy Young Soh, MD, PhD, Department of Surgery, Ajou University School of Medicine, 164 Worldcup-ro, Yeongtong-gu, Suwon 16499, Korea
Tel: 82-31-219-5201, Fax: 82-31-219-5755, E-mail: sohey@aumc.ac.kr

This is a review article for 11th Bumsan Academic Awards.

Copyright © 2019, the Korean Thyroid Association. All rights reserved.
© This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

해 왔다.²⁾ 하지만 세침흡인세포검사의 10-30%는 세포 병리학적 검사만으로는 진단이 불확실하여,³⁾ 임상적 치료 결정에 어려움이 있다. 진단이 불확실한 결과는 2009년 발표된 갑상선 세포병리분류 체계인 베데스다 시스템(Bethesda system) 중 3가지 범주인 비정형(atypia of undetermined significance or follicular lesion of undetermined significance; AUS/FLUS), 여포종양 혹은 여포종양 의심(Follicular neoplasm or suspicious for follicular neoplasm), 악성 의심(suspicious for malignancy)으로 이를 미결정 결절(indeterminate nodule)로 분류한다.^{3,4)}

미결정 결절에 대한 2015년 ATA (American Thyroid Association) 가이드라인과 2016년 대한갑상선학회 갑상선결절 및 암 진료 권고안에 따르면 초음파 소견 및 크기 증가 여부, 종양의 위치 등의 여러 가지 임상적 상황과 외과 의사나 환자의 선호도에 따라 2차 FNAB, 경과관찰 또는 진단 및 치료적 절제술을 권하고 있다.^{5,6)} 미결정 결절의 범주별로 좀 더 자세히 살펴보면 베데스다 III의 비정형 결절의 경우 10% 정도의 암 위험성을 가지며 이는 경과관찰, 반복적인 세침흡인검사, 또는 진단적 절제술을 할 수 있다. 베데스다 IV인 여포종양 혹은 여포종양 의심의 경우 약 20% 정도의 암 위험성을 가지며 일반적으로 세침검사를 통해 정확한 진단이 불가능하기 때문에 진단적 절제술을 하게 된다. 베데스다 V인 악성 의심의 경우 70% 이상의 암 위험성을 가지며 암에 준하여 수술적 치료를 하고 동결병리검사를 통해 암을 확진한다(Table 1).^{5,6)} 하지만 이러한 환자의 15-35% 만이 수술 이후에 최종 병리 결과가 악성으로 진단되어,³⁻⁵⁾ 65-85%의 환자가 불필요한 수술을 받게 된다. 이러한 환자 중 일부는 수술 합병증과 갑상선 호르몬 보충요법 등으로 삶의 질을 감소시킬 수도 있다. 또한 최종 결과의 불일치는 불필요한 치료 내지 적절한 치료 시기를 놓치는 임상적 오점뿐 아니라 환자 와 의료진 간의 불신과 의료분쟁 요인이 되고 있다.

Table 1. Management option for indeterminate thyroid nodules on FNA

Bethesda III (AUS/FLUS), 10% cancer risk
Diagnostic lobectomy, repeat FNA, observation
Bethesda IV (Follicular neoplasm), 20% cancer risk
Diagnostic lobectomy
Bethesda V (Suspicious malignancy), 70% cancer risk
Diagnostic lobectomy with frozen section

AUS: atypia of undetermined significance, FLUS: follicular lesion of undetermined significance, FNA: fine needle aspiration

이러한 혼란 중에 최근에는 갑상선암에 대한 분자생물학적인 기술의 발달로 여러 가지 분자 표지자(molecular marker)검사가 소개되고 있다. 이러한 분자 표지자들은 세침흡인세포검사를 통해 얻은 검사 대상물에 대한 진단의 정확도를 높여 미결정 결절의 진단에 대한 문제점을 해결할 수 있는 해결안의 하나로 대두되고 있어 이에 대해 고찰해 보고자 한다.

본 론

2015년 ATA guideline과 2016년 대한갑상선학회 갑상선결절 및 암 진료 권고안은 미결정 결절에 대한 추가 검사로 분자 표지자 검사의 의의에 대해 명기한 바 있다(권고수준 2).^{5,6)} 일반적으로 갑상선암의 60-70%는 적어도 1개 이상의 유전자 변이를 가지고 있다. 따라서 유전자 변이 검사는 단일 유전자를 검사하거나 여러 개의 유전자를 한꺼번에 이용하는 변이패널(mutation panel)을 사용한다. 현재 국내에서도 진단이 불확실하거나 확정적이지 않은 베데스다 분류체계 3-5단계인 비정형, 여포종양 혹은 여포종양의심, 및 악성의심 소견의 경우에 단일 유전자 변이 분석을 흔히 적용해 왔으며, 많이 이용하는 대표적인 단일 유전자 검사로 BRAF가 있다.

최근 분자 생물학적 연구 및 유전자 분석 기술의 발달로 분자 표지자적 검사는 비약적으로 발전하고 있는데 대표적으로 유전자 변이 검사와 유전자 발현 프로파일로 나눌 수 있다. 두 가지 검사는 각각의 장, 단점과 적용에 있어 상이한 부분이 있어 각각에 대해 살펴 보겠다(Table 2).

유전자 변이 검사(Mutation Analysis)

BRAF는 유두상 갑상선암에서 발현되며, 갑상선암 중 유두상 갑상선암이 90% 이상을 차지하기 때문에 미결정 결절의 2차 검사 시 많이 이용된다. 또한 BRAF 유전자 변이는 특이도가 100%에 가까워 미결정 결절에서 BRAF가 있으면 최종 병리 결과는 유두상암으로 분류한다.⁷⁾ 이러한 수술 전 진단의 결과는 미결정 결절에서 치료 계획을 세우는 데 도움을 준다.

이와 더불어 BRAF 유전자 변이가 있는 경우 수술 후 예후가 좋지 않다는 보고가 이어지면서 갑상선 전 절제술 및 중심경부림프절청소술 등의 수술 범위를 결정하는 데에도 영향을 주었다.^{8,9)} 그러나 BRAF 유전자 변이 검사는 높은 특이도를 보이지만 민감도는 낮은 한계가 있다.^{6,8,10)} 최근에는 이와 유사하게 분화갑상선

Table 2. Molecular test in indeterminate cytology

	Mutational analysis (DNA)	Gene expression classifier (mRNA)
Target	– Oncogene; point mutation, rearrangement – Tumor suppression gene	– Gene expression from mRNA
Results	– High specificity, excellent PPV – Not very sensitive, low NPV	– High sensitivity, excellent NPV – Not very specific, low PPV
Significance	– A good “rule in test” – If the test is positive, it is a cancer – If no mutations are found, can still be a cancer	– A good “rule out test” – If the test is benign, it is not a cancer – Many GEC “suspicious” tumor are not cancer
Advantage	– Avoid sub-optimal surgery	– Avoid unnecessary surgery
When to use it for diagnosis	– When a more certain diagnosis of cancer will change : Decision to operation (III: AUS/FLUS) : Extent of operation (IV: FN) : Need for frozen section (V: SM)	– Use it for Bethesda classification III & IV
When not to use it for diagnosis	– Bethesda II or VI – Probably not useful for Bethesda V	– At extreme pretest probability : Bethesda classification II, V, VI – If there are other indication for surgery : Local symptoms : High risk of malignancy (F/H, radiation Hx.)

AUS: atypia of undetermined significance, DNA: deoxyribonucleic acid, F/H: family history, FLUS: follicular lesion of undetermined significance, FN: fine needle aspiration, GEC: gene expression classifier, Hx.: history, mRNA: messenger ribonucleic acid, NPV: negative predictive value, PPV: positive predictive value, SM: suspicious for malignancy

암에서 TERT 유전자 변이가 갑상선암의 나쁜 예후와 관련됨이 보고되면서 이에 대한 임상 적용이 시도되나,^{11,12)} 낮은 발현율로 인해 국내에서는 광범위하게 임상 적용이 되고 있지 못하였으나 최근 신의료기술로 인정됨에 따라 그 사용이 증가할 것으로 예상된다.

갑상선유두암 중 최근 진단이 늘어나고 있는 여포변형 갑상선유두암(follicular variant PTC, fVPTC)과 유두상 핵을 가진 비침습성 여포성 갑상선 종양(non-invasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features; NIFTP)은 RAS 유전자의 발현이 진단과 치료 방향 설정에 도움을 줄 수 있다.^{13,14)} Patel 등¹³⁾은 RAS 유전자 변이가 있는 분화갑상선암은 fVPTC 진단할 수 있어, FNA검사 결과 미결정 결절이며 RAS 유전자 양성인 경우 일엽 갑상선절제를 권고하였다. 또한 Paulson 등¹⁴⁾은 RAS 유전자 변이가 있는 경우 갑상선암의 59%, 미결정 결절의 63%는 NIFTP임을 보고하며 치료 방침을 결정하는데 도움을 주고 있다. 그러나 이러한 여러 시도에도 불구하고 단일 유전자 변이 표지자의 사용은 낮은 민감도(sensitivity)와 음성예측률(negative predictive value; NPV)을 가지는 한계가 있다.

이러한 미결정 결절의 악성 위험도를 예측하기 위해서 BRAF 유전자 변이나 RAS 유전자 변이와 같은 점 돌연변이(point mutation)뿐 아니라 RET/PTC1, RET/PTC3, PAX8/PPARY과 같은 유전자 재배열(rearrangement) 등

이 사용될 수 있는데,¹⁵⁾ 이를 조합하면 모든 분화갑상선암의 약 90%에서 이러한 변이 중 하나가 발견되기 때문에 진단이 불확실한 세포병리 결과에서 악성종양을 예측하는 데 좀 더 도움이 될 수 있다. 따라서 다수의 유전자 분석을 한꺼번에 시행하는 변이 패널의 사용이 대두되었고 다수의 유전자 분석법(multigene assay)은 단일 유전자 분석에 비해 좀 더 정확한 진단 결과를 제공할 수 있게 되었다.^{15,16)} Nikiforov 등¹⁵⁾은 7개의 유전자 변이 패널(BRAF, NRAS, HRAS, KRAS, RET/PTC1, RET/PTC3, PAX8/PPARY)을 이용하여 미결정 결절에서 양성예측률(positive predictive value; PPV)을 87-95%로 향상시켰고, 단일 유전자 변이 표지자 검사의 단점이었던 민감도를 63-80%까지 상승시켰다고 보고하였다.^{15,16)}

일반적으로 유전자 변이 검사는 이 검사에서 양성인 경우 암으로 진단할 수 있는 매우 좋은 양성예측률을 보이지만, 이 검사에서 유전자 변이가 없어도 암일 가능성은 여전히 있는 낮은 음성예측률을 갖는다. 이러한 특성은 차선적(Sub-optimal) 수술을 피하는 장점이 있어 베데스다 III, IV 단계의 미결정 결절의 수술을 결정하는 데에 도움이 되나, 베데스다 V 단계의 미결정 결절에 적용하는 것의 유용성은 떨어진다(Table 2).

유전자 발현 프로파일(Gene-expression Profile; GEC)

유전자 변이 검사가 낮은 음성예측률을 단점으로 하지만 유전자 발현 프로파일(GEC) 검사는 매우 뛰어난 음성예측률을 보임으로써 갑상선 양성 결절에 대한 진단율을 높일 수 있다.

GEC는 167개의 mRNA 발현을 이용한 검사이다. Alexander 등¹⁷⁾은 전향적 다기관 연구를 통해 85개의 최종적으로 악성으로 진단된 265개의 미결정 결절에 대하여 GEC검사를 시행하였고, 그 결과를 양성 또는 악성의심으로 분류하였다. 그 결과 최종 조직검사에서 악성으로 진단된 85명 중 78명이 GEC검사에서 악성으로 분류되어 92%의 민감도와 52%의 특이도를 보였다.¹⁷⁾ 특히 GEC검사를 통해 미결정 결절 중 비정형에서 95%, 여포종양 혹은 여포종양의심에서 92%, 악성의심에서 85%의 음성예측률을 가짐을 보고하였고,¹⁷⁾ 이를 근거로 저자들은 음성예측률이 높은 GEC를 이용함으로써 미결정 결절에서 불필요한 진단적 엽절제를 피할 수 있다고 주장하였다.^{18,19)}

mRNA 발현을 이용한 GEC검사는 유전자 변이 검사에 비해 이 검사에서 양성이라 할지라도 암으로 진단할 수는 없는 낮은 양성예측률을 갖지만 반면 이 검사에서 음성인 경우 암을 배제할 수 있는 매우 높은 음성예측률을 가지는 것을 장점으로 한다. 이러한 특징은 미결정 결절의 불필요한 수술을 피할 수 있는 장점이 있어 암 위험성이 비교적 낮은 베테스다 III, IV 단계에 적용하여 치료방향을 결정하는 데에 도움을 받을 수 있다. 반면 확률이 비교적 극단에 있는 베테스다 II, V, VI의 결절과 증상이 있거나 악성의 고위험에 있는 환자에게 적용하는 데에는 한계가 있다(Table 2). 이러한 낮은 양성예측률을 갖는 단점이 있기 때문에 GEC검사는 이에 대한 추가적인 타당성 검증 연구(validation study)가 필요하며 현재 모든 결절에 널리 이용되고 있지는 못하다.

멀티플랫폼 유전자 변이와 마이크로RNA검사(Multi-platform Mutation and miRNA Test [MPT])

앞서 기술한 유전자 변이 검사와 유전자 발현 프로파일검사는 두 검사 모두 세침흡인검사서 미결정 결절을 평가하는 데 각각의 제한점과 한계를 갖는다. 그러한 단점들을 보완하기 위해 Labourier 등²⁰⁾은 7개의 유전자 변이 검사와 10개의 마이크로RNA 발현을 조합하여 분자 표지자 검사를 진행하였다. 저자들은 세침흡인세포검사서 비정형 또는 여포종양 혹은 여포종

양의심 소견을 보이는 109명의 환자에게 이 검사를 적용한 결과 94%의 높은 음성예측률과 74%의 비교적 높은 양성예측률을 보였다.²⁰⁾ 이러한 시도와 결과는 유전자 변이 검사의 장점인 높은 양성예측률과 유전자 발현 프로파일 검사의 높은 음성예측률의 장점을 동시에 갖게 되었다. 따라서 검사에서 양성 소견을 보이는 환자에게는 수술적 치료를, 음성 소견을 보이는 환자에게는 경과관찰을 권하였고, 결과적으로 베테스다 분류체계 III와 IV 환자에서 진단적 갑상선절제술을 68-76%에서 10-11%로 감소시킬 수 있다고 보고하였다.²⁰⁾

차세대 유전자 염기서열 분석(Nest-Generation Sequencing Assay [NGS])

다수의 유전자를 분석함으로써 양성예측률을 높이는 것과 RNA 발현을 이용하여 음성예측률을 높이는 검사를 조합하는 것과 더불어, 검사하는 유전자 수와 방법을 증가시켜 검사의 정확도를 높이려는 시도는 지속해서 이루어지고 있다.

세침흡인세포검사서 약 10%를 차지하는 여포종양 혹은 여포종양의심 소견을 가진 환자에서 암의 위험도는 25-40% 사이로 보고되고 있다.⁹⁾ 하지만 아직까지 이러한 베테스다 범주로 진단된 결절을 악성으로 진단함에 있어 높은 민감도와 특이도를 가진 검사는 없다. Nikiforov 등²¹⁾은 143개의 여포종양 혹은 여포종양의심 소견을 가진 세침흡인검사 검체와 환자들의 최종 수술 후 조직검사를 이용하여 ThyroSeq.V2라는 차세대유전자염기서열(NGS) 패널을 적용한 결과 90%의 민감도와 93%의 특이도, 83%의 양성예측률, 96%의 음성예측률, 92%의 정확도를 보였다고 보고하였다. 이 검사는 갑상선 암에서 나타나는 13개의 점 돌연변이와 42개의 유전자를 조합하여 동시에 조사하는 것으로 이는 이전에 보고했던 7개의 유전자 변이 패널에 비해 음성예측률을 35%에서 96%로 크게 개선하였다. 하지만 이러한 유전자 변이의 검사 수를 증가시킴에도 불구하고 양성예측률은 83%로 이전 연구인 7개의 유전자 변이 패널 연구의 결과인 86%와 비교하여 별 차이는 보이지 않았다.^{15,16,22)} 그럼에도 불구하고 여포종양 혹은 여포종양의심 소견을 가진 환자에서 임상적 치료결정을 함에 있어서 이러한 시도는 도움을 제공하고 있다.

광범위한 분자 표지자 검사 적용의 한계

이러한 비약적인 기술 발전에도 불구하고 단일 유전자변이 검사 이외에 새로이 개발되는 분자 표지자 검사들이 대중화되기 위해서는 여러 한계점이 있다. 일

차적으로 유전자 검사가 현재는 고가이기 때문에 진단적 수술 및 보편화한 유전자 변이 검사에 비해 비용 대비 효과의 문제는 아직 해결되지 못하고 있다. Lee 등²³⁾의 보고에 의하면 캐나다에서는 미국에서 시행하고 있는 이러한 유전자 검사를 시행하는 것보다, 현재의 치료 행태를 유지하는 것이 가장 비용 대비 효과적이라고 보고하였다. 미국과 같은 의료비가 고가인 지역에서는 일부 비용 대비 효과적인 측면이 보고되는 경우가 있지만,²⁴⁾ 실제 국내와 같은 국가보장보험에 의해 의료비가 통제되거나 이러한 분자 표지자 검사가 가능하지 못한 나라에는 현실적인 적용에 어려움이 있다.

또한 현재 보고된 연구는 대규모 타당성 검증 및 장기 추적관찰 결과가 부족하고, 국내 환자를 대상으로 한 검증된 연구 결과가 부족하여 향후 지속적인 연구와 임상적 논의가 필요할 것으로 보인다.

결론

분자 생물학적 연구 및 유전자 분석 기술의 발달로 분자 표지자적 검사는 최근 비약적으로 발전해 왔다. 그러한 결과로 분자 표지자 검사 및 유전자 검사는 미결정 결절을 가진 갑상선종양 환자의 치료 방향 결정에 좋은 해결책으로 대두되고 있어 이러한 진단적 도구의 적용은 필요해 보인다. 하지만 이러한 진단을 광범위하게 적용함에 있어 국내적 상황을 고려한 비용 대비 효과에 대한 분석과 향후 추가적인 타당성 검증 연구를 위해 대규모 다기관 연구 및 논의가 뒷받침되어야 할 것이다.

중심 단어: 갑상선 암, 미결정 갑상선 결절, 분자표지자 검사.

References

- 1) Mazzaferri EL. Management of a solitary thyroid nodule. *N Engl J Med* 1993;328(8):553-9.
- 2) Gharib H, Goellner JR. Fine-needle aspiration biopsy of the thyroid: An appraisal. *Ann Intern Med* 1993;118(4):282-9.
- 3) Cibas ES, Ali SZ; NCI Thyroid FNA State of the Science Conference. The Bethesda system for reporting thyroid cytopathology. *Am J Clin Pathol* 2009;132(5):658-65.
- 4) Horne MJ, Chhieng DC, Theoharis C, Schofield K, Kowalski D, Prasad ML, et al. Thyroid follicular lesion of undetermined significance: Evaluation of the risk of malignancy using the two-tier sub-classification. *Diagn Cytopathol* 2012;40(5):410-5.
- 5) Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, et al. 2015 American Thyroid Association management guidelines for adult patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: The American Thyroid Association guidelines task force on thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2016;26(1):1-133.
- 6) Yi KH, Lee EK, Kang HC, Koh Y, Kim SW, Kim IJ, et al. 2016 Revised Korean Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and thyroid cancer. *Int J Thyroidol* 2016;9(2):59-126.
- 7) Nikiforova MN, Nikiforov YE. Molecular diagnostics and predictors in thyroid cancer. *Thyroid* 2009;19(12):1351-61.
- 8) Adeniran AJ, Hui P, Chhieng DC, Prasad ML, Schofield K, Theoharis C. BRAF mutation testing of thyroid fine-needle aspiration specimens enhances the predictability of malignancy in thyroid follicular lesions of undetermined significance. *Acta Cytol* 2011;55(6):570-5.
- 9) Mekel M, Nucera C, Hodin RA, Parangi S. Surgical implications of B-RafV600E mutation in fine-needle aspiration of thyroid nodules. *Am J Surg* 2010;200(1):136-43.
- 10) Kim SK, Hwang TS, Yoo YB, Han HS, Kim DL, Song KH, et al. Surgical results of thyroid nodules according to a management guideline based on the BRAF(V600E) mutation status. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(3):658-64.
- 11) Liu X, Bishop J, Shan Y, Pai S, Liu D, Murugan AK, et al. Highly prevalent TERT promoter mutations in aggressive thyroid cancers. *Endocr Relat Cancer* 2013;20(4):603-10.
- 12) Liu R, Xing M. Diagnostic and prognostic TERT promoter mutations in thyroid fine-needle aspiration biopsy. *Endocr Relat Cancer* 2014;21(5):825-30.
- 13) Patel SG, Carty SE, McCoy KL, Ohori NP, LeBeau SO, Seethala RR, et al. Preoperative detection of RAS mutation may guide extent of thyroidectomy. *Surgery* 2017;161(1):168-75.
- 14) Paulson VA, Shivdasani P, Angell TE, Cibas ES, Krane JF, Lindeman NI, et al. Noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features accounts for more than half of "carcinomas" harboring RAS mutations. *Thyroid* 2017;27(4):506-11.
- 15) Nikiforov YE, Ohori NP, Hodak SP, Carty SE, LeBeau SO, Ferris RL, et al. Impact of mutational testing on the diagnosis and management of patients with cytologically indeterminate thyroid nodules: a prospective analysis of 1056 FNA samples. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(11):3390-7.
- 16) Nikiforov YE, Steward DL, Robinson-Smith TM, Haugen BR, Klopfer JP, Zhu Z, et al. Molecular testing for mutations in improving the fine-needle aspiration diagnosis of thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94(6):2092-8.
- 17) Alexander EK, Kennedy GC, Baloch ZW, Cibas ES, Chudova D, Diggans J, et al. Preoperative diagnosis of benign thyroid nodules with indeterminate cytology. *N Engl J Med* 2012;367(8):705-15.
- 18) Duick DS, Klopfer JP, Diggans JC, Friedman L, Kennedy GC, Lanman RB, et al. The impact of benign gene expression classifier test results on the endocrinologist-patient decision to operate on patients with thyroid nodules with indeterminate fine-needle aspiration cytopathology. *Thyroid* 2012;22(10):996-1001.
- 19) Alexander EK, Schorr M, Klopfer J, Kim C, Sipos J, Nabhan F, et al. Multicenter clinical experience with the Afirma gene

- expression classifier. J Clin Endocrinol Metab* 2014;99(1):119-25.
- 20) Labourier E, Shifrin A, Busseniers AE, Lupo MA, Manganelli ML, Andrus B, *et al.* Molecular testing for miRNA, mRNA, and DNA on fine-needle aspiration improves the preoperative diagnosis of thyroid nodules with indeterminate cytology. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100(7):2743-50.
- 21) Nikiforov YE, Carty SE, Chiosea SI, Coyne C, Duvvuri U, Ferris RL, *et al.* Highly accurate diagnosis of cancer in thyroid nodules with follicular neoplasm/suspicious for a follicular neoplasm cytology by ThyroSeq v2 next-generation sequencing assay. *Cancer* 2014;120(23):3627-34.
- 22) Gupta N, Dasyam AK, Carty SE, Nikiforova MN, Ohori NP, Armstrong M, *et al.* RAS mutations in thyroid FNA specimens are highly predictive of predominantly low-risk follicular-pattern cancers. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98(5):E914-22.
- 23) Lee L, How J, Tabah RJ, Mitmaker EJ. Cost-effectiveness of molecular testing for thyroid nodules with atypia of undetermined significance cytology. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99(8):2674-82.
- 24) Wu JX, Lam R, Levin M, Rao J, Sullivan PS, Yeh MW. Effect of malignancy rates on cost-effectiveness of routine gene expression classifier testing for indeterminate thyroid nodules. *Surgery* 2016;159(1):118-26.