



## Test immunoradiométrique pour le dosage de la Thyroglobuline (Tg) dans le sérum humain

### INTRODUCTION

La trousse Thyroglobuline RIA est utilisée pour le dosage quantitatif et ultra-sensible de la thyroglobuline humaine dans le sérum. D'un point de vue biochimique, la thyroglobuline doit être considérée plutôt comme une famille complexe de molécules. Elle est microhétérogène avec des variations inter- et intra-individuelles (degré d'iodation, teneur en carbohydrates...). Il existe aussi des dimères et plusieurs fragments. Une hétérogénéité supplémentaire est due à la différenciation maligne. Des facteurs spécifiques ou non spécifiques peuvent interférer individuellement dans certains sérums entraînant des problèmes analytiques (voir section suivante). C'est pourquoi aujourd'hui encore le dosage de la thyroglobuline est délicat.

La Tg fournit les substrats nécessaires à la synthèse des hormones thyroïdiennes. Seul le tissu thyroïdien (même de nature maligne, mais à condition d'être encore différencié) a la capacité de produire, de stocker et de sécréter la Tg. En conséquence la Tg est spécifique d'organe et de tissu. C'est la base de l'indication principale du dosage de la Tg, le suivi post-opératoire du cancer différencié de la thyroïde. Son intérêt clinique majeur consiste en la détection précoce (ou en l'exclusion) des métastases osseuses et des rechutes tumorales ainsi qu'au suivi des traitements radioiodés. Les dosages de Tg à intervalles réguliers sont alors particulièrement utiles. Après thyroïdectomie totale (et ablation radiothérapique), la Tg sérique n'est plus détectable chez les patients sans métastases ni tumeur (rémission totale). Même sous stimulation endogène de la TSH, la Tg demeure normalement indétectable. A l'inverse, des valeurs détectables de Tg sont constitutives d'un sérieux indice de la persistance ou du développement d'une néoplasie. Ont une signification particulière, les valeurs de Tg qui sont déjà détectables lors d'un traitement freinateur de la TSH par les hormones thyroïdiennes ou qui présentent une augmentation constante pendant ce traitement médicamenteux. Un autre critère utile est une augmentation significative de la Tg après arrêt de la prise d'hormones thyroïdiennes. Dans l'hypothèse où aucun tissu résiduel thyroïdien non tumoral n'a été laissé, la Tg est normalement indétectable lors d'un traitement supresseur de la TSH. Cependant lorsqu'il existe du tissu résiduel (plus grand que approximativement 3 ml) ou toute autre maladie thyroïdienne coexistante non tumorale, on peut détecter de la thyroglobuline. Si le patient est sous stimulation de la TSH, il faut tenir compte de l'existence de tissus résiduels comme étant l'origine potentielle d'une valeur mesurable de Tg.

Dans le diagnostic différentiel d'une ectopie et d'une athyréose, le dosage de la thyroglobuline permet de différencier entre ces deux causes d'hypothyroïdie congénitale. Des taux de Tg indétectables même sous stimulation de la TSH permettent de conclure à l'agénésie thyroïdienne, tandis que des concentrations de Tg mesurables évoquent la présence de tissu thyroïdien ectopique.

Le dosage de la Tg sérique permet également de différencier les thyrotoxicoses : dans le cas d'une élévation anormale des hormones thyroïdiennes induite par l'amiodarone, les taux de thyroglobuline sont élevés. En cas de thyrotoxicose factice, les concentrations sériques de Tg sont très faibles ou indétectables (à confirmer par une faible captation d'iode à la scintigraphie).

Dans les maladies thyroïdiennes bénignes, on peut observer des valeurs plus ou moins élevées de Tg par rapport à la population normale. Plusieurs facteurs (fumeur, oestrogènes, grossesse, médicaments goïtrogènes, carence iodée, Ac anti-récepteur TSH,..) et en particulier des perturbations liées à l'intégrité

morphologique de la glande (goitre, nodules, destructions cellulaires ou thyroïde autonome, etc) réagissent souvent de façon complexe et fréquemment conduisent à des élévations de Tg. La Tg sérique est stimulée par la TSH et diminue normalement après administration d'hormones thyroïdiennes (et d'iode sous certaines conditions).

## **PRINCIPE DU TEST**

SELco Tg est un dosage immunoradiométrique de diagnostic in vitro (IRMA). L'un des deux anticorps monoclonaux spécialement sélectionnés est immobilisé sur la surface des tubes (tubes revêtus). L'autre est marqué à l'iode 125 et réagit comme traceur. Les deux anticorps sont utilisés en excès et lient la Tg par des épitopes différents, qui sont relativement dépourvus d'interférences. En conséquence des complexes de type sandwich fixés à la phase solide se forment. Après élimination de la radioactivité non liée, deux étapes de lavage sont réalisées afin d'atteindre la sensibilité la plus élevée possible dans la zone des faibles valeurs de Tg. Ensuite la radioactivité restant dans les tubes est mesurée. Plus la concentration en Tg de l'échantillon est élevée, plus le traceur se lie spécifiquement, correspondant au signal (cpm) de la fraction liée (B) qui est proportionnelle à la concentration en Tg. En cas d'absence de Tg dans l'échantillon, il n'y a pas formation d'immunocomplexe. Une courbe d'étalonnage est réalisée à partir des valeurs mesurées des signaux (cpm) ou de la liaison B/T (%) de concentrations de Tg correspondantes aux standards 1- 6. A partir de cette courbe d'étalonnage on peut mesurer la concentration d'un échantillon inconnu dans le domaine de mesure 0.3-250 ngTg/ml.

Si les valeurs de Tg sont supérieures à 200 ng/ml, les échantillons doivent être dilués 1:100 (ou plus 1:500 pour être dans la zone de mesure adéquate avec le sérum diluant exempt de Tg (composant 0) fourni. Ces échantillons sont à nouveau analysés. De cette façon des concentrations de 25000 à 125000 ngTg/ml deviennent accessibles. L'utilisation d'un standard zéro n'est pas conseillée. Il est recommandé d'analyser le sérum diluant 0 comme un échantillon inconnu 1, représentant un contrôle Tg négatif. Son échantillon correspondant (0R) surchargé en Tg sert de contrôle pour la valeur à 100 % du test de surcharge.

**Remarque importante :** la manière de gérer les interférences causées par la présence d'anticorps anti-thyroglobuline dans le sérum de certains patients peut différer selon les pays. En France, il est recommandé d'effectuer systématiquement un dosage quantitatif des anti-g sur tous les échantillons plutôt que d'effectuer un test de récupération (Pacini F. and Schlumberger M. Europ J of Endocrinol 2006 ; 154 :787-803 ; Ann Endocrinol 2007 ; 68 : suppl 2 S53-94).

## **PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS**

### Nature des prélèvements et conservation

Le sang est prélevé par ponction veineuse. Après coagulation, le sérum est séparé par centrifugation. Seul le sérum est recommandé.

Les échantillons doivent être conservés à + 2 - 8 °C au maximum trois jours, au-delà ils doivent être congelés à - 20 °C. Les congélations et décongélations successives sont à proscrire. Si nécessaire il faut effectuer initialement des aliquotes avant de congeler.

### Préparation avant utilisation

Avant la réalisation du dosage, amener tous les échantillons à la température du laboratoire. Prendre garde de bien agiter les échantillons sériques afin d'en assurer l'homogénéité.

## **RÉACTIFS FOURNIS**

**A (CT)** – 2 x 50 tubes revêtus avec un anticorps monoclonal de souris anti-g. Prêts à l'emploi.

**D (TRAC)** – 1 flacon de 21 ml de traceur contenant une solution d'anticorps monoclonal de souris anti-g marqué à l'iode 125 (<700 kBq). Prêt à l'emploi.

**B (WASHB)** – 1 flacon de 20 ml de tampon de lavage (concentré pour 500 ml)

**1-6 (CAL)** – 6 flacons contenant chacun 0,7 ml de sérum avec des concentrations en Tg différentes (voir fiche séparée incluse dans la trousse). Prêts à l'emploi. Remarque : le standard 0 n'est pas nécessaire.

**C I – II (CONTROL)** – 2 flacons contenant chacun 0,7 ml de sérum avec des concentrations en Tg différentes (voir fiche séparée incluse dans la trousse). Prêts à l'emploi.

**0 (DIL)** – 1 flacon de 5 ml de diluant pour traceur (absence de Tg, peut également servir de contrôle négatif). Prêt à l'emploi.

**R (REC)** – 1 flacon de 1 ml d'échantillon de surcharge contenant une concentration en Tg de 500 ng/ml (pour test de recouvrement). Prêt à l'emploi. Son utilisation n'est pas recommandée en France.

#### Stockage des réactifs

Le test SELco Tg a été développé pour permettre de réaliser 100 déterminations, ce qui correspond à l'analyse de 20 échantillons inconnus en duplicats si l'on inclut les tests de recouvrement, les standards et les contrôles.

La date d'expiration de chaque composant du coffret est inscrite sur sa propre étiquette et celle du coffret complet figure sur l'étiquette extérieure (max. 8 à 9 semaines).

A réception du coffret, tous les réactifs doivent être conservés à 2 – 8°C dans la boîte d'origine. Les tubes revêtus doivent rester à l'obscurité (recouverts d'aluminium)

#### Préparation avant utilisation

Avant d'être utilisés, tous les composants du coffret doivent être remis à température ambiante. Attention, les tubes revêtus restent à l'obscurité entourés d'aluminium.

Le réactif B (tampon de lavage) doit être reconstitué en ajoutant 480 ml d'eau distillée.

Tous les autres réactifs sont prêts à l'emploi.

## **DOSAGE**

Remarque : utiliser 2 tubes non revêtus pour le dosage de la radioactivité totale T.

1. Numéroté les tubes de la façon appropriée

2. Pipeter et ajouter dans les tubes correspondants suivant le schéma de la procédure (voir annexe) :

- 100 µl de standards

- 100 µl de contrôles

- 100 µl d'échantillon 1

- 100 µl d'échantillon 1 plus 10 µl d'échantillon de surcharge (**R**) (**non recommandé en France**)

- (etc...)

3. Ajouter 200 µl de traceur (D) à chacun des tubes (y compris les tubes T pour la radioactivité totale)

Remarque : à ce stade, les tubes T sont mis de côté et tenus séparés des autres tubes jusqu'à ce que la mesure de radioactivité soit faite (étape 8).

4. Après une courte agitation des tubes afin d'assurer des conditions de réaction homogènes, incuber toute la nuit (minimum 15 heures) à température ambiante.

5. Ajouter 1 ml de tampon de lavage (reconstitué à partir du réactif B) à chaque tube.

6. Aspirer ou décanter

7. Répéter le lavage (étapes 5 et 6) deux fois. Ces étapes doivent être réalisées avec beaucoup de précautions.

Afin d'enlever le liquide restant, inverser les tubes (5 – 10 minutes) et absorber les gouttes en tapotant sur un papier absorbant.

8. Mesurer la radioactivité de chaque tube en incluant les tubes T pour la radioactivité totale, dans un compteur à scintillations gamma pendant 1 minute.

## CALCUL DES RÉSULTATS

Les moyennes des cpm des standards 1 - 6 sont rapportées en ordonnée (échelle log.) en fonction des concentrations (abscisse, échelle log.) pour établir la courbe d'étalonnage.

Les concentrations en Tg des contrôles, des échantillons sériques et des tests de surcharge sont obtenues en ngTg/ml par interpolation sur la courbe.

Le calcul des résultats peut également se faire par ordinateur avec un logiciel adapté pour les dosages de type sandwich (IRMA).

Toute extrapolation de la courbe d'étalonnage au-delà de 250 ngr/ml (standard 6) est à proscrire. Les sérums de patients, présentant de telles valeurs élevées doivent être dilués au 1:100 (et au 1:500 si nécessaire) avec le sérum diluant exempt de Tg (composant 0 fourni). Ces sérums doivent être analysés une seconde fois (y compris les tests de surcharge). Dans ces conditions des valeurs de 25000 à 125000 ng/ml peuvent être mesurées sans difficulté.

Note: des valeurs de Tg supérieures à 2 millions ng/ml ont déjà été observées.

Toute extrapolation de la courbe d'étalonnage pour des valeurs inférieures à 0.3 ng/ml (standard 1) est aussi déconseillée, même avec l'aide d'un standard zéro défini arbitrairement ou du sérum diluant (composant 0). Cependant le domaine de mesure des concentrations de Tg du kit SELco® Tg commence dès le premier standard (0,3 ng/ml).

### Exemple de courbe d'étalonnage

(approximativement 4 semaines avant la date d'expiration)

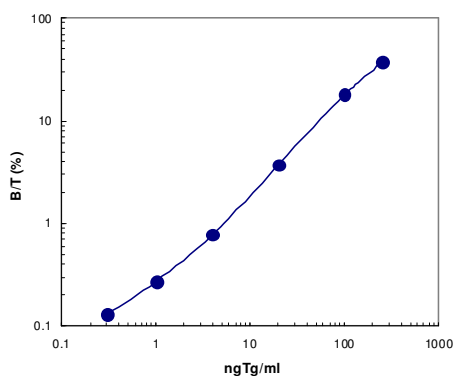
Tubes testés	cpm (a)	opm (b)	cpm (moyenne)	B/T %	ngTg/ml
Radioactivité totale T	287463	288145	287804	--	--
Standard 1	395	385	380	0,13	0,3
Standard 2	738	806	772	0,27	1,0
Standard 3	2175	2321	2248	0,78	4,0
Standard 4	10562	10902	10732	3,73	20,0
Standard 5	51694	51270	51482	17,9	100,0
Standard 6	103461	104161	103811	37,1	250,0
Contrôle I	se reporter à la feuille en annexe				
Contrôle II	se reporter à la feuille en annexe				
Echantillon 1	207	253	230	0,08	<0,3
Echantillon 1R	27364	27111	27238	9,46	50

Calcul de la récupération (test de surcharge) (non recommandé en France, voir remarque importante section « principe du test »)

$$\frac{\text{Echant. 1R (ngTg/ml)} - \text{Echant. 1 (ngTg/ml)}}{50 \text{ (ngTg/ml)}} \times 100 = \% \text{ Récupération Echantillon 1}$$

Au lieu de 50 ng/ml au dénominateur, le résultat de la récupération de l'échantillon 0R (ngTg/ml) du sérum diluant 0 peut être aussi utilisé.

## Courbe d'étalonnage



## VALEURS DE RÉFÉRENCE

Il est recommandé à chaque laboratoire d'établir ses propres valeurs de référence pour la population normale et pour des situations pathologiques. Par conséquent, les valeurs mentionnées ci-dessous ne sont fournies qu'à titre indicatif.

**Carcinome différencié de la thyroïde en complète rémission après ablation totale de la thyroïde**  
inférieure à 0,5 - 1 ngTg/ml sous traitement supprimeur de la TSH avec hormones thyroïdiennes, absence d'augmentation de la Tg sous stimulation à la TSH.

Des valeurs de Tg au-dessus de cette zone grise (particulièrement lors d'un traitement supprimeur) nécessitent des investigations diagnostiques. **Confirmation:** Augmentation significative de la Tg après stimulation à la TSH.

Tout tissu thyroïdien résiduel doit être pris en compte, particulièrement sous stimulation endogène de la TSH par l'arrêt du traitement aux hormones thyroïdiennes.

### **Personnes normales**

approximativement. 2- 70 ngTg/ml (médiane approx. 13 ng/ml),  
légèrement plus basse dans les zones non carencées en iode (approx. 1 - 35 ng/ml, médiane approx. 10 ng/ml).

## PERFORMANCES ANALYTIQUES

### Capacité de liaison

La capacité de liaison maximale du SELco® Tg est définie par la moyenne obtenue pour le standard le plus élevé (B<sub>0</sub>/T %), elle est normalement comprise entre 30 et 40 %.

### Standardisation

La trousse SELco® Tg est calibrée sur la première préparation internationale de référence CRM 457 (Community Bureau of Reference, BCR, Union Européenne, Bruxelles, Belgique), qui est cependant qu'une préparation préliminaire

### Parallélisme des standards et des échantillons sériques

Les dilutions de la préparation de référence réalisées dans du sérum humain exempt de Tg avec la trousse SELco® Tg présentent des résultats satisfaisants. Les sérums humains de forte concentration en Tg et dilués dans les conditions requises conduisent aux résultats attendus, en utilisant le sérum diluant exempt de Tg (0).

Patient	Facteur de dilution	Valeurs observées (ng/ml)	Valeurs obs. / Valeurs attendues (%)
1	pur	>250	-
	1/5	625	(100,0 %)
	1/10	651	104,0 %
	1/50	645	103,0 %
	1/100	634	101,0 %
2	pur	126	(100,0 %)
	1/2	124	98,0 %
	1/8	128	102,0 %
	1/16	128	102,0 %
	1/32	125	99,0 %

### Reproductibilité

6 pools de sérum représentatifs du domaine de mesure ont été testés sur une période de 4 mois en essais inter-lots. Les coefficients de variation demeurent inférieurs à 11% (nombre de mesures n= 30).

Pools de sérum	Valeur moyenne (ng/ml)	CV
1	0,4	8,2 %
2	1,1	10,5 %
3	2,5	7,3 %
4	5,2	5,9 %
5	53,3	4,1 %
6-	107,2	6,9 %

Au-delà de la sensibilité fonctionnelle, les coefficients de variation intra-essais doivent être trouvés inférieurs à 10 %.

### Spécificité, test de surcharge, effet crochet

Aucune réaction croisée avec la thyroxine, la triiodothyronine, l'albumine sérique humaine, n'a pu être détectée pour des concentrations supra-physiologiques.

Les erreurs de détermination de Tg dues à l'action spécifique ou non de facteurs sériques (anti-Tg, anti-TPO) peuvent être en principe exclues. Cependant chaque valeur de Tg doit être validée par un test de surcharge : détermination parallèle de l'échantillon surchargé par une quantité connue de Tg (10 µl de l'échantillon de surcharge R).

Si le test de surcharge ne montre pas d'interférence (100 % de recouvrement) pour le test SELco® Tg, la valeur de Tg mesurée pour l'échantillon surchargé est supérieure de 50 ng/ml à la valeur de l'échantillon initial. En routine, les résultats du test de surcharge compris entre 70 et 130 % sont considérés comme acceptables. En dessous de 70 % et au-dessus de 130% le test de surcharge indique une interférence et les valeurs de Tg dosées dans l'échantillon sont probablement sous-estimées.

Dans le but de vérifier la fiabilité des résultats du test, il est recommandé de réaliser également le test de surcharge avec la sérum diluant 0 qui constitue le contrôle négatif de la trousse. Le résultat de l'échantillon OR doit fournir un recouvrement de 100%.

Avec le test SELco® Tg, les taux sériques compris entre 250 ng/ml et 20000 ng/ml ont toujours des valeurs en cpm plus élevées que celles du standard 6 de la trousse (250 ng/ml). Au-delà de 20000 ng/ml, les valeurs du signal en cpm peuvent être trouvées inférieures à celle du standard 6 en raison d'un effet crochet. Dans un essai réalisé 4 semaines après la date du marquage, l'activité totale était de 280000 cpm, le standard 6 a été mesuré à 114000 cpm (B/T = 40,7 %). Un échantillon sérique dilué au 1/4 à 12500 ng/ml a été mesuré à 136000 cpm (B/T=48,5 %) et ce même échantillon dilué au 1/2 à 25000 ng/ml a fourni une mesure de 101000 cpm (B/T = 36 %). Cet essai a confirmé l'apparition d'un effet crochet à partir de 12500 ng/ml avec

une influence sur le résultat à partir de 20000 ng/mlTg. Le test de surcharge, dans ce contexte, est très important car il met en évidence l'effet crochet. Le test de récupération fournit un résultat proche de 0%. Il faut alors diluer l'échantillon sérique avec le sérum diluant 0.

#### Sensibilité (concentration minimale détectable)

La définition la plus appropriée et statistiquement acceptable de la concentration minimale détectable de tout dosage est à présent la sensibilité fonctionnelle du dosage.

La sensibilité fonctionnelle d'un dosage représente généralement la concentration qui correspond à un coefficient inter-essais de 20 % déterminé à partir d'un profil de précision établi dans les valeurs basses. Dans des conditions correctes d'utilisation du SELco® Tg, la sensibilité du dosage se situe à environ 0,3 ngTg/ml.

En conséquence, les valeurs de Tg inférieures à ce seuil ne correspondent pas aux critères statistiques de fiabilité définis par les bonnes pratiques de laboratoire, et ne peuvent pas être distinguées du zéro avec une précision statistique suffisante.

### LIMITATIONS DE LA MÉTHODE

Les échantillons présentant un trouble, une hémolyse, une hyperlipémie, ou contenant de la fibrine peuvent donner des résultats inexacts. Ne pas extrapoler les valeurs des échantillons au-delà du dernier standard. Diluer les échantillons et les redoser.

### SCHÉMA DE LA PROCÉDURE

1	Numéroter Tubes revêtus (A)	S 1 - 6	I - II	Pat. 1	Pat. 1 R (surcharge)	T
2	Pipetter Calibrateurs 1 - 6 Contrôles CI / CII  Echantillon 1 Echantillon 1 + <b>Echantillon surcharge( R)</b> etc.	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl 10 µl	
3	Pipetter Traceur (D)	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
4	Incuber*	Une nuit ( <b>15 heures minimum</b> ) à température ambiante				
5	Pipetter Solution de lavage	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	
6	Décanner ou aspirer					
7	Laver ( étapes 5 et 6 )	<b>Répéter deux fois</b>				
8	Mesurer la radioactivité	Temps de comptage: 1 minute				

\*Avant l'incubation agiter brièvement les tubes pour assurer une bonne homogénéité de la réaction.

## **PRÉCAUTIONS D'EMPLOI**

Les produits d'origine humaine contenus dans cette trousse ont subi un dépistage négatif vis à vis des anticorps anti-VIH1, anti-VIH2, anti-VHC et de l'antigène Hbs, mais doivent cependant être manipulés comme des produits potentiellement infectieux. Il faut donc appliquer les mesures de précaution usuelles lors de la manipulation des réactifs et des prélèvements de patients.

Certains réactifs contiennent de faible quantité d'azoture de sodium (<0,1%) utilisé comme conservateur. Ils ne doivent pas être avalés ou mis en contact avec la peau ou les muqueuses. La formation d'azotures de métaux lourds peut être évitée en rinçant abondamment avec de l'eau.

Les produits radioactifs seront stockés dans leur conditionnement d'origine dans un local approprié.

Un cahier de réception et de stockage des produits radioactifs sera tenu à jour.

Le matériel de laboratoire et la verrerie qui ont été contaminés doivent être éliminés au fur et à mesure afin d'éviter une contamination croisée de plusieurs isotopes.

Chaque contamination ou perte de substance radioactive devra être résolue selon les procédures établies.

Toute mise aux déchets de matière radioactive se fera en accord avec les réglementations en vigueur.

Ne pas manger, ni boire, ni fumer, ni appliquer des cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés.

Les réactifs radioactifs ne peuvent être vendus qu'à des personnes habilitées à manipuler des substances radioactives, en respectant les règles de base de protection contre les rayonnements ionisants.

Ne pas pipeter les solutions radioactives avec la bouche.

Eviter le contact direct avec la peau ou les muqueuses de tout produit radioactif en utilisant des blouses et des gants de protection.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- Schlumberger M. Papillary and Follicular Carcinoma. N. Engl. J. Med (1998) 338, 297

- Schlumberger M. et col, Serum thyroglobulin determination in the follow-up of patients with differentiated thyroid carcinoma. Eur. J. Endocrinol. (1988) 138, 249

- Solomon B. L et col. Current trends in the management of well differentiated papillary thyroid carcinoma. J. Clin. Endocrinol. Metab. (1996) 81, 333

- Tenenbaum F et col. Thyroglobulin measurement and postablative iodine 131 total body scan after total thyroidectomy for differentiated thyroid carcinoma in patients with no evidence of disease. Eur. J. Cancer (1996) 32A, 1262

- Pineda J. D et col. Iodine 131 therapy for thyroid cancer patients with elevated thyroglobulin and negative diagnostic scan. J. Clin. Endocrinol Metab. (1995) 80,1488