

2017-2018

# THÈSE

pour le

## DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

Qualification en BIOLOGIE MÉDICALE

### VALIDATION DE MÉTHODES DE DOSAGE DE LA THYROGLOBULINE DANS LES LIQUIDES DE RINÇAGE DES AIGUILLES DE CYTOPONCTION DANS LE CADRE DES CARCINOMES DIFFÉRENCIÉS DE LA THYROÏDE – ETUDE MULTICENTRIQUE

**BELOEIL Rémi**

Né le 06 Février 1989 à Longjumeau (91)

Sous la direction de Mme BOUX DE CASSON Florence

Membres du jury

M. le Pr RODIEN Patrice	Président
Mme le Docteur BOUX DE CASSON Florence	Directrice
M. le Pr EVEILLARD Matthieu	Membre
Mme le Docteur DUFOUR Diane	Membre
Mme le Docteur BRIS Céline	Membre
Mme le Docteur MOAL Valérie	Membre

Soutenue publiquement le :  
Mardi 16 Octobre 2018



**FACULTÉ  
DE SANTÉ**  
UNIVERSITÉ D'ANGERS



# ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné **Rémi BELOEIL**, déclare être pleinement conscient que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signé par l'étudiant le **12/09/2018**

# LISTE DES ENSEIGNANTS DE L'UFR SANTÉ D'ANGERS

---

**Directeur de l'UFR** : Pr Nicolas LEROLLE

**Directeur adjoint de l'UFR et directeur du département de pharmacie** : Pr Frédéric LAGARCE

**Directeur du département de médecine** : Pr Cédric ANNWEILER

## PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

ABRAHAM Pierre	Physiologie	Médecine
ANNWEILER Cédric	Gériatrie et biologie du vieillissement	Médecine
ASFAR Pierre	Réanimation	Médecine
AUBE Christophe	Radiologie et imagerie médicale	Médecine
AUGUSTO Jean-François	Néphrologie	Médecine
AZZOUZI Abdel Rahmène	Urologie	Médecine
BARON-HAURY Céline	Médecine générale	Médecine
BAUFRETON Christophe	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire	Médecine
BENOIT Jean-Pierre	Pharmacotechnie	Pharmacie
BEYDON Laurent	Anesthésiologie-réanimation	Médecine
BIGOT Pierre	Urologie	Médecine
BONNEAU Dominique	Génétique	Médecine
BOUCHARA Jean-Philippe	Parasitologie et mycologie	Médecine
BOUVARD Béatrice	Rhumatologie	Médecine
BOURSIER Jérôme	Gastroentérologie ; hépatologie	Médecine
BRIET Marie	Pharmacologie	Médecine
CAILLIEZ Éric	Médecine générale	Médecine
CALES Paul	Gastroentérologie ; hépatologie	Médecine
CAMPONE Mario	Cancérologie ; radiothérapie	Médecine
CAROLI-BOSC François-Xavier	Gastroentérologie ; hépatologie	Médecine
CHAPPARD Daniel	Cytologie, embryologie et cytogénétique	Médecine
CONNAN Laurent	Médecine générale	Médecine
COUTANT Régis	Pédiatrie	Médecine
COUTURIER Olivier	Biophysique et médecine nucléaire	Médecine
CUSTAUD Marc-Antoine	Physiologie	Médecine
DE BRUX Jean-Louis	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire	Médecine
DESCAMPS Philippe	Gynécologie-obstétrique	Médecine
DINOMAS Mickaël	Médecine physique et de réadaptation	Médecine
DIQUET Bertrand	Pharmacologie	Médecine
DUCANCELLE Alexandra	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière	Médecine
DUVAL Olivier	Chimie thérapeutique	Pharmacie
DUVERGER Philippe	Pédopsychiatrie	Médecine
EVEILLARD Matthieu	Bactériologie-virologie	Pharmacie
FANELLO Serge	Épidémiologie ; économie de la santé et prévention	Médecine
FAURE Sébastien	Pharmacologie physiologie	Pharmacie
FOURNIER Henri-Dominique	Anatomie	Médecine
FURBER Alain	Cardiologie	Médecine
GAGNADOUX Frédéric	Pneumologie	Médecine
GARNIER François	Médecine générale	Médecine
GASCOIN Géraldine	Pédiatrie	Médecine
GOHIER Bénédicte	Psychiatrie d'adultes	Médecine
GRANRY Jean-Claude	Anesthésiologie-réanimation	Médecine
GUARDIOLA Philippe	Hématologie ; transfusion	Médecine
GUILET David	Chimie analytique	Pharmacie
HAMY Antoine	Chirurgie générale	Médecine
HUNAUULT-BERGER Mathilde	Hématologie ; transfusion	Médecine
IFRAH Norbert	Hématologie ; transfusion	Médecine
JEANNIN Pascale	Immunologie	Médecine

KEMPF Marie	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière	Médecine
LACCOURREYE Laurent	Oto-rhino-laryngologie	Médecine
LAGARCE Frédéric	Biopharmacie	Pharmacie
LARCHER Gérald	Biochimie et biologie moléculaires	Pharmacie
LASOCKI Sigismond	Anesthésiologie-réanimation	Médecine
LEGRAND Erick	Rhumatologie	Médecine
LERMITE Emilie	Chirurgie générale	Médecine
LEROLLE Nicolas	Réanimation	Médecine
LUNEL-FABIANI Françoise	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière	Médecine
MARCHAIS Véronique	Bactériologie-virologie	Pharmacie
MARTIN Ludovic	Dermato-vénéréologie	Médecine
MENEI Philippe	Neurochirurgie	Médecine
MERCAT Alain	Réanimation	Médecine
MERCIER Philippe	Anatomie	Médecine
PAPON Nicolas	Parasitologie et mycologie	Pharmacie
PASSIRANI Catherine	Chimie générale	Pharmacie
PELLIER Isabelle	Pédiatrie	Médecine
PICQUET Jean	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire	Médecine
PODEVIN Guillaume	Chirurgie infantile	Médecine
PROCACCIO Vincent	Génétique	Médecine
PRUNIER Fabrice	Cardiologie	Médecine
REYNIER Pascal	Biochimie et biologie moléculaire	Médecine
RICHARD Isabelle	Médecine physique et de réadaptation	Médecine
RICHOME Pascal	Pharmacognosie	Pharmacie
RODIEN Patrice	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques	Médecine
ROHMER Vincent	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques	Médecine
ROQUELAURE Yves	Médecine et santé au travail	Médecine
ROUGE-MAILLART Clotilde	Médecine légale et droit de la santé	Médecine
ROUSSEAU Audrey	Anatomie et cytologie pathologiques	Médecine
ROUSSEAU Pascal	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique	Médecine
ROUSSELET Marie-Christine	Anatomie et cytologie pathologiques	Médecine
ROY Pierre-Marie	Thérapeutique	Médecine
SAINT-ANDRE Jean-Paul	Anatomie et cytologie pathologiques	Médecine
SAULNIER Patrick	Biophysique pharmaceutique et biostatistique	Pharmacie
SERAPHIN Denis	Chimie organique	Pharmacie
SUBRA Jean-François	Néphrologie	Médecine
UGO Valérie	Hématologie ; transfusion	Médecine
URBAN Thierry	Pneumologie	Médecine
VAN BOGAERT Patrick	Pédiatrie	Médecine
VENIER Marie-Claire	Pharmacotechnie	Pharmacie
VERNY Christophe	Neurologie	Médecine
WILLOTEAUX Serge	Radiologie et imagerie médicale	Médecine

## MAÎTRES DE CONFÉRENCES

ANGOULVANT Cécile	Médecine Générale	Médecine
ANNAIX Véronique	Biochimie et biologie moléculaires	Pharmacie
BAGLIN Isabelle	Pharmaco-chimie	Pharmacie
BASTIAT Guillaume	Biophysique et biostatistique	Pharmacie
BEAUVILLAIN Céline	Immunologie	Médecine
BELIZNA Cristina	Médecine interne	Médecine
BELLANGER William	Médecine générale	Médecine
BELONCLE François	Réanimation	Médecine
BENOIT Jacqueline	Pharmacologie et pharmacocinétique	Pharmacie
BIERE Loïc	Cardiologie	Médecine
BLANCHET Odile	Hématologie ; transfusion	Médecine
BOISARD Séverine	Chimie analytique	Pharmacie
CAPITAIN Olivier	Cancérologie ; radiothérapie	Médecine
CASSEREAU Julien	Neurologie	Médecine
CHEVAILLER Alain	Immunologie	Médecine
CHEVALIER Sylvie	Biologie cellulaire	Médecine
CLERE Nicolas	Pharmacologie	Pharmacie
COLIN Estelle	Génétique	Médecine
DE CASABIANCA Catherine	Médecine générale	Médecine
DERBRE Séverine	Pharmacognosie	Pharmacie
DESHAYES Caroline	Bactériologie virologie	Pharmacie
FERRE Marc	Biologie moléculaire	Médecine
FLEURY Maxime	Immunologie	Pharmacie
FORTRAT Jacques-Olivier	Physiologie	Médecine
HAMEL Jean-François	Biostatistiques, informatique médicale	Médecine
HELESBEUX Jean-Jacques	Chimie organique	Pharmacie
HINDRE François	Biophysique	Médecine
JOUSSET-THULLIER Nathalie	Médecine légale et droit de la santé	Médecine
LACOEUILLE Franck	Biophysique et médecine nucléaire	Médecine
LANDREAU Anne	Botanique et Mycologie	Pharmacie
LEGEAY Samuel	Pharmacologie	Pharmacie
LE RAY-RICHOMME Anne-Marie	Valorisation des substances naturelles	Pharmacie
LEPELTIER Elise	Chimie générale ; Nanovectorisation	Pharmacie
LETOURNEL Franck	Biologie cellulaire	Médecine
LIBOUBAN Hélène	Histologie	Médecine
MABILLEAU Guillaume	Histologie, embryologie et cytogénétique	Médecine
MALLET Sabine	Chimie Analytique et bromatologie	Pharmacie
MAROT Agnès	Parasitologie et mycologie médicale	Pharmacie
MAY-PANLOUP Pascale	Biologie et médecine du développement et de la reproduction	Médecine
MESLIER Nicole	Physiologie	Médecine
MOUILLIE Jean-Marc	Philosophie	Médecine
NAIL BILLAUD Sandrine	Immunologie	Pharmacie
PAPON Xavier	Anatomie	Médecine
PASCO-PAPON Anne	Radiologie et imagerie médicale	Médecine
PECH Brigitte	Pharmacotechnie	Pharmacie
PENCHAUD Anne-Laurence	Sociologie	Médecine
PETIT Audrey	Médecine et santé au travail	Médecine
PIHET Marc	Parasitologie et mycologie	Médecine
PRUNIER Delphine	Biochimie et biologie moléculaire	Médecine
RIOU Jérémie	Biostatistique	Pharmacie
ROGER Emilie	Pharmacotechnie	Pharmacie
SCHINKOWITZ Andréas	Pharmacognosie	Pharmacie
SIMARD Gilles	Biochimie et biologie moléculaire	Médecine
TANGUY-SCHMIDT Aline	Hématologie ; transfusion	Médecine
TRZEPIZUR Wojciech	Pneumologie	Médecine

## AUTRES ENSEIGNANTS

AUTRET Erwan  
BARBEROUSSE Michel  
BRUNOIS-DEBU Isabelle  
CHIKH Yamina  
FISBACH Martine  
O'SULLIVAN Kayleigh

Anglais  
Informatique  
Anglais  
Économie-Gestion  
Anglais  
Anglais

Médecine  
Médecine  
Pharmacie  
Médecine  
Médecine  
Médecine

### **PAST**

CAVAILLON Pascal  
LAFFILHE Jean-Louis  
MOAL Frédéric

Pharmacie Industrielle  
Officine  
Physiologie

Pharmacie  
Pharmacie  
Pharmacie

### **ATER**

FOUDI Nabil (M.)  
HARDONNIERE Kévin  
WAKIM Jamal (Mme)

Physiologie et communication cellulaire  
Pharmacologie - Toxicologie  
Biochimie et biomoléculaire

Pharmacie  
Pharmacie  
Médecine

### **AHU**

BRIS Céline  
LEROUX Gaël  
BRIOT Thomas  
CHAPPE Marion

Biochimie et biologie moléculaire  
Toxicologie  
Pharmacie galénique  
Pharmacotechnie

Pharmacie  
Pharmacie  
Pharmacie  
Pharmacie

### **CONTRACTUEL**

VIAULT Guillaume

Chimie

Pharmacie

## **À Monsieur le professeur Patrice RODIEN,**

Je vous remercie d'avoir accepté de présider ce jury.  
Merci à vous de me faire l'honneur de bien vouloir juger ce travail.

## **À Monsieur le professeur Matthieu EVEILLARD,**

Je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury à la dernière minute...  
Merci pour l'enseignement de bactériologie que vous m'avez apporté au cours de mon premier stage d'internat. Merci également à vous de me faire l'honneur de juger ce travail.

## **À Madame le Docteur Florence BOUX DE CASSON,**

Merci beaucoup. Et merci pour tout.  
Merci de m'avoir permis d'effectuer un semestre à la découverte de l'hormonologie. C'était un plaisir de faire partie de l'équipe des « hormoneuses ».  
Merci d'avoir pris le temps d'être dans l'échange en me formant, en me transmettant votre savoir et en répondant à mes nombreuses questions.  
Merci de m'avoir confié ce travail de thèse et de vous être montrée aussi aidante et disponible tout au long. Il y a des gens que je n'oublierai pas au cours de mon internat. Vous en faites partie.

## **À Madame le Docteur Diane DUFOUR,**

Je vous remercie d'avoir accepté de participer à ce jury.  
Soyez assurée de ma profonde reconnaissance.

## **À Madame le Docteur Céline BRIS,**

Je te remercie d'avoir accepté sans hésiter de participer à ce jury de thèse.  
Nous n'avons malheureusement pas eu l'occasion de travailler ensemble au cours de mon internat.  
Je suis néanmoins très honoré que tu acceptes de juger ce travail.

## **À Madame le Docteur Valérie MOAL,**

Merci à vous de bien vouloir faire partie de ce jury.  
Merci également pour tout ce que vous m'avez apporté au cours de mes semestres passés au laboratoire. Merci pour vos qualités humaines, votre grande rigueur, votre professionnalisme ainsi que pour nos nombreux échanges. Notre virée belge nous aura permis de ramener des cuberdons à défaut de ramener une dialyse à l'équilibre.

## **À l'ensemble des techniciens et secrétaires du laboratoire de Biochimie-Métabo-Hormonologie du CHU d'Angers,**

Merci pour votre bonne humeur et ces bons moments passés avec vous. Mention spéciale à Elvina, Maria, Cédric et Céline. Et mention très spéciale à toi Delphine pour ton naturel qui m'a beaucoup fait rire et qui fait de toi quelqu'un d'attachant.

## **À l'ensemble des biologistes, techniciens et secrétaire du laboratoire d'Immuno-Hématologie Erythrocytaire et du service de délivrance des PSL de l'EFS d'Angers,**

Merci de m'avoir aussi bien accueilli et donné il y a 2 ans l'envie de revenir vous voir lors de mon dernier semestre d'interne. Et de me donner l'envie de poursuivre dans cette voie.  
Merci au Docteur Myriam LE BRAS et au Docteur Pierre-Antoine DEGUIGNE de prendre à chaque fois le temps de me transmettre vos connaissances et de répondre à mes nombreuses questions. Merci à vous de m'avoir laissé du temps pour écrire cette thèse.

## **Aux biologistes et techniciens du laboratoire LABOMAINE au Mans,**

Merci de m'avoir accueilli le temps d'un semestre pour me faire découvrir votre fonctionnement et de m'avoir permis de réaliser les manipulations nécessaires à ce travail de thèse. Mention particulière à Marie-Laure, Anne-Marie et Marie-Jo, techniciennes référentes de la chaîne au PSS, dont l'aide a été précieuse.

## **À l'ensemble des biologistes et techniciens des autres laboratoires ayant participé à cette étude à Angers, Brest, Chambéry, Clermont-Ferrand, Grenoble, Lyon, Paris et Tours,**

Je vous remercie sincèrement pour votre participation et pour le temps que vous avez consacré à cette étude. Vous m'avez ainsi donné matière à la rédaction de ce travail de thèse et je vous en suis extrêmement reconnaissant.



# REMERCIEMENTS

## **À Laurane, Nathalie, Rachel et Isabelle,**

Merci pour tous ces bons moments passés tout au long de ces quatre années d'internat. Merci d'avoir toujours été là. J'espère que cela va continuer. Brest, ce n'est pas la porte à côté mais vous verrez, la Bretagne ça vous gagne !

## **À mes amis de longue date, Gaëlle, Philippe, Ronan, Sylvain et Théau, ainsi qu'à Aude,**

Merci d'être toujours là malgré les années et la distance. C'est toujours un plaisir de vous retrouver et de vous compter toujours présents dans ma vie.

## **À mon groupe de patates chéries, Catherine, Jiyun, Céline et Simon,**

Mes études de médecine n'auraient pas été les mêmes sans vous. Merci pour votre indéfectible soutien tout au long de ces longues années et d'avoir été là dans les bons comme dans les mauvais moments. Je suis très heureux de pouvoir encore compter sur vous, même quatre ans après que nous ayons pris des chemins différents.

## **À Élise et Julie,**

Notre choix commun d'un internat à Angers a renforcé notre amitié. Merci d'avoir pu compter sur vous deux.

## **À ma famille et à mes chères cousines,**

Merci à vous pour votre soutien malgré la distance qui nous sépare.

## **À mes parents,**

Merci à vous deux d'avoir fait de moi l'homme que je suis aujourd'hui. Merci à vous de me soutenir, qu'importe les décisions que j'ai pu prendre. J'espère que vous êtes fiers de moi.

## **À Antoine et Morgane, mon frère et ma sœur chéris,**

Votre grand frère termine enfin son cursus. J'espère vous rendre fiers également.

## **À Aurélien,**

J'ai beaucoup de chance de t'avoir dans ma vie.  
Merci pour ton soutien et pour tout ce que tu m'apportes au quotidien.

## Liste des abréviations

CIQ	Contrôle Interne de Qualité
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
COFRAC	Comité FRANçais d'ACcréditation
CRM	<i>Certified Reference Material</i>
CV <sub>FI</sub>	Coefficient de variation de reproductibilité
CV <sub>r</sub>	Coefficient de variation de répétabilité
ECLIA	<i>Electrochimiluminescence ImmunoAssay</i>
EEQ	Evaluation Externe de la Qualité
ET	Erreur totale
FI	Fidélité intermédiaire
InVS	Institut de Veille Sanitaire
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
IC	Intervalle de confiance
ICEMA	<i>ImmunoChemiluminoEnzymoMetric Assay</i>
IRMA	<i>Immuno RadioMetric Assay</i>
LoD	Limite de détection analytique
LoQ	Limite de quantification
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PROBIOQUAL	Centre Lyonnais pour la PROMotion de la BIOlogie et du contrôle de QUALité
pTNM	Classification TNM basée sur le résultat anatomo-pathologique
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
SeF	Sensibilité fonctionnelle
Tg	Thyroglobuline
TgIS	Thyroglobuline <i>in situ</i>
TRACE®	<i>Time Resolved Amplified Cryptate Emission</i>

# PLAN

## PLAN

## RÉSUMÉ

## INTRODUCTION

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

- 1. Méthodes de dosage et laboratoires**
- 2. Performances évaluées**
  - 2.1. Fidélité : répétabilité et fidélité intermédiaire
  - 2.2. Linéarité
  - 2.3. Limite de détection
  - 2.4. Justesse
  - 2.5. Erreur totale, limite de quantification et sensibilité fonctionnelle
  - 2.6. Exactitude
- 3. Préparation et conservation des échantillons**
  - 3.1. Préparation de la solution « mère »
  - 3.2. Préparation des échantillons destinés à l'évaluation
- 4. Analyse statistique des données**

## RÉSULTATS

- 1. Fidélité**
- 2. SeF, LoD et ET**
- 3. Linéarité**
- 4. Justesse**
- 5. Exactitude**

## DISCUSSION

- 1. Contexte**
- 2. Justification des choix du protocole**
- 3. Comparaison aux performances fournisseurs**
- 4. Proposition de seuil décisionnel**

## CONCLUSION

## BIBLIOGRAPHIE

## LISTE DES FIGURES

## LISTE DES TABLEAUX

## TABLE DES MATIÈRES

## ANNEXES

- 1. Caractéristiques et performances sériques des trousses de dosage évaluées**

# RÉSUMÉ

**Introduction :** Dans le cadre du suivi d'un cancer thyroïdien différencié, l'association d'un dosage de thyroglobuline *in situ* (TgIS) est aujourd'hui recommandée lors de toute cytoponction échoguidée d'adénopathie suspecte de métastase. Ce dosage de thyroglobuline, réalisé sur le liquide de rinçage de l'aiguille fine de cytoponction, est effectué actuellement à l'aide de trousses de dosage qui n'ont pas été validées par les fournisseurs dans cette indication sur cette matrice non sérique. Il est donc de la responsabilité du laboratoire effectuant ce dosage d'étudier et de valider les performances analytiques de la trousse utilisée dans les conditions retenues.

**Matériel et Méthodes :** Cinq trousses de dosage de la thyroglobuline parmi les plus utilisées en France ont été choisies pour une validation de méthode réalisée dans un ou deux laboratoires (Access®Tg, Beckman Coulter ; THYRO, Cisbio Bioassays ; Elecsys®Tg II, Roche ; IMMULITE®2000 Thyroglobulin, Siemens ; B·R·A·H·M·S hTg sensitive KRYPTOR, ThermoFischer SCIENTIFIC). Cette étude multicentrique a ainsi réuni huit laboratoires qui ont évalué, selon un protocole commun et sur un même tampon de dosage contenant un matériau de référence (CRM 457, Sigma-Aldrich), les performances analytiques suivantes : fidélité, sensibilité fonctionnelle (SeF), limite de détection (LoD), limite de quantification (LoQ), limites de linéarité, justesse et exactitude.

**Résultats :** Les coefficients de variation de fidélité intermédiaire s'échelonnaient de 2,1 à 29,4 % pour des concentrations de CRM comprises entre 0,125 et 10 µg/L. Les SeF, LoD et LoQ ont respectivement été estimées entre une valeur  $\leq 0,14$  et 1,2 µg/L, une valeur  $\leq 0,04$  et 0,35 µg/L et entre 0,3 et 3,4 µg/L. Les pourcentages de récupération pour des dilutions jusqu'au 1/800 étaient tous compris entre 80 et 120 % sur l'intervalle de mesure entre la SeF et 100 µg/L. Pour une concentration de CRM de 1 et 10 µg/L, les différentes méthodes ont fourni respectivement des résultats entre 0,81 et 1,3 µg/L (biais de -19 % à 26,2 %) et entre 9,7 et 12,3 µg/L (biais de -2,7 % à 23,4 %). Le biais d'exactitude à 100 µg/L allait jusqu'à 30 %.

**Conclusion :** Les performances en termes de fidélité intermédiaire et de SeF sont globalement comparables à celles des fournisseurs et celles rapportées dans la littérature sur matrice sérique. Elles sont par ailleurs similaires lorsqu'elles ont été évaluées par deux laboratoires. L'évaluation de l'erreur totale nous permet de proposer des seuils décisionnels entre 0,3 et 1,2 µg/L, adaptés à chaque méthode, et qui nécessiteront d'être validés en pratique clinique afin d'en évaluer la pertinence.

## INTRODUCTION

Le cancer de la thyroïde est considéré comme rare puisqu'il représente seulement 1 % de l'ensemble des cancers, avec quelques 140 000 cas diagnostiqués chaque année dans le monde [1], dont environ 10 000 nouveaux cas diagnostiqués en France selon les dernières données estimées en 2015 par l'InVS [2]. Le carcinome de souche vésiculaire, ou de souche folliculaire selon les auteurs anglophones, est le plus fréquent. Il regroupe majoritairement deux formes histologiquement bien différenciées, d'évolution lente et de très bon pronostic, que sont le carcinome papillaire et le carcinome vésiculaire. Ces derniers représentent respectivement 85 à 90 % et 5 à 8 % de l'ensemble des cancers thyroïdiens [3]. Les formes moins bien différenciées, de l'ordre de 3 à 5 %, ont en revanche un pronostic plus réservé.

La stratégie thérapeutique proposée depuis quelques années par les différentes recommandations françaises, européennes et américaines [4-12], repose sur une stratification du risque de récurrence en trois à quatre catégories dont la classe peut être révisée au cours du suivi. Elle prend en compte la classification pTNM ainsi que des facteurs pronostiques relatifs au patient, à la tumeur et au traitement initial. Généralement, après une chirurgie associée ou non à une totalisation isotopique, l'enjeu de la surveillance repose sur la probabilité de récurrence qui est en moyenne de 10 % avec un délai médian de 3,5 ans. Les métastases ganglionnaires prédominent alors dans 60 à 75 % des cas [8].

Le suivi des patients comprend notamment un dosage régulier de la thyroglobuline (Tg) sérique, pouvant être réalisé après stimulation de la TSH. La stimulation peut alors se faire soit de manière endogène par sevrage de l'hormonothérapie de substitution, soit de manière exogène par l'administration de TSH recombinante. Les patients bénéficient par ailleurs d'un

examen clinique et échographique afin de rechercher des reliquats thyroïdiens ou des adénopathies en faveur d'une récurrence.

Les dosages de Tg sérique doivent systématiquement s'accompagner du dosage des anticorps anti-Tg. En effet, leur présence peut être à l'origine d'interférences conduisant, avec les méthodes de dosage actuellement utilisées, à une sous-estimation des concentrations de la Tg. Après thyroïdectomie totale, la concentration de Tg diminue ainsi que le titre des anticorps anti-Tg. La Tg doit ensuite devenir indétectable. Le titre des anticorps se normalise généralement dans l'année voire au-delà chez certains patients. La persistance d'un titre d'anticorps significatif ou l'apparition d'anticorps doit faire suspecter la présence de tissu tumoral. En cas de dosage associant un taux indétectable de Tg et la présence d'anticorps, la rémission du patient ne peut être affirmée. Dans le cas où la Tg est mesurable, sa concentration est alors considérée comme une valeur minimale. Le taux d'anticorps anti-Tg constitue alors un marqueur de suivi.

L'échographie cervicale est par ailleurs devenue un examen clé du bilan initial et de la surveillance des cancers thyroïdiens opérés. Elle doit être réalisée six à douze mois après la chirurgie puis renouvelée selon une fréquence qui tient compte des résultats des dosages de Tg sérique [8]. Devant des adénopathies suspectes, l'échographie cervicale est complétée par une cytoponction à l'aiguille fine échoguidée à visée cytologique. La sensibilité de la cytologie varie de 77,3 à 94 % selon les études les plus récentes [13,14]. Le défaut de sensibilité est expliqué par des ponctions non contributives (5 à 10 %) [15] et des faux négatifs (6 à 8 %) [16]. Ces derniers sont en lien notamment avec l'expérience de l'opérateur, des prélèvements pauci cellulaires de ganglions kystiques ou la présence de microfoyers métastatiques. La qualité des résultats de la cytoponction est donc très

opérateur-dépendante et l'examen cytologique peut donc être mis en défaut.

Il y a un peu plus de 25 ans, Pacini *et al.* ont été les premiers à proposer de mesurer la Tg dans des liquides de rinçage d'aiguille de cytoponction ganglionnaire. Ils ont ainsi montré que des quantités importantes de Tg sont retrouvées dans les ganglions lymphatiques métastatiques de cancer thyroïdien différencié [17]. De nombreuses études sur le dosage de thyroglobuline *in situ* (TgIS) ont été publiées depuis. Si l'intérêt du dosage ne peut être contesté, la revue de la littérature sur le sujet est difficile tant les recrutements de patients, les conditions pré analytiques et analytiques de l'examen, les seuils de décision et les modalités d'expression des résultats diffèrent d'une étude à l'autre.

Aujourd'hui, devant la découverte d'adénopathie suspecte de métastase au cours du suivi échographique, les guides de bonnes pratiques [8, 9] préconisent donc d'associer à toute ponction échoguidée un dosage de TgIS afin de pallier le défaut de sensibilité de l'examen cytologique seul. La sensibilité du dosage de TgIS seul est généralement bonne mais très variable selon les études en raison de l'absence de standardisation de l'examen. En 2015, dans une revue des performances du dosage de TgIS seul et en association avec la cytologie, les auteurs rapportent chez des patients thyroïdectomisés, des sensibilités pour le dosage de TgIS seul de 69,2 à 100 %, des spécificités de 90 à 100 % et des seuils de décision de 1 à 38,3 µg/L. En y associant la cytologie, les sensibilités sont alors comprises entre 97 et 100 % [18]. Indépendamment des aspects méthodologiques, certains faux-négatifs de TgIS pourraient être expliqués par un déficit de synthèse de Tg par certains cancers peu différenciés [8, 19].

Les conditions de recueil de la TgIS sont simples. Après avoir aspiré et étalé le contenu du ganglion, l'aiguille ayant servi à la cytoponction est rincée dans un liquide qui est adressé au laboratoire afin que soit réalisé le dosage.

Dans la littérature, les liquides de rinçage sont de natures diverses. Le sérum physiologique est le plus fréquemment utilisé mais d'autres types de solution (Solution de Hank/HBSS) le sont également [19]. L'utilisation de tampon de dosage ou de sérum sans Tg dits « Tg free », fourni par le laboratoire, pourtant recommandée en France [8], n'est que rarement citée.

L'utilisation, pour des raisons pratiques, d'un liquide de rinçage non protéique tel que le sérum physiologique, présente deux risques. Le premier est d'ordre analytique et concerne l'effet de matrice. Cet effet de matrice est lié à une différence importante de composition chimique entre les étalons de la trousse de dosage et les liquides de rinçage, impactant la réaction antigène-anticorps [20]. Le deuxième risque est moins connu et concerne les phénomènes d'adsorption non spécifiques de la Tg sur la surface des tubes de recueil de l'échantillon. Ceux-ci sont considérés comme critiques dès lors que de très faibles quantités d'un analyte sont dosées dans un milieu pauvre en protéines. Une étude récente a ainsi montré qu'en présence de sérum physiologique, les valeurs de Tg évoluaient au cours du temps de façon très différente selon leur concentration initiale dans les échantillons. Aux plus faibles concentrations, les concentrations mesurées chutaient rapidement quelle que soit la température de conservation alors que les résultats restaient inchangés au cours du temps pour des concentrations plus élevées [21]. Pour les concentrations de Tg inférieures à 200 µg/L, environ 44 % de la Tg était adsorbée et n'était donc plus dosée après 3 heures à température ambiante, 72 % après 24 heures entre 2 et 8°C et 74 % après 72 heures à une température inférieure à -18°C. L'étude a également montré que ces mêmes concentrations



de Tg étaient en revanche stables dans un tampon contenant de l'albumine, y compris après une conservation de l'échantillon pendant une année à une température inférieure à -18°C. Ces phénomènes d'adsorption non spécifiques sur les surfaces solides dépendent de la nature du tube de recueil, de la protéine à doser et de la concentration protéique dans l'échantillon. Ils sont indépendants de la méthode de dosage utilisée. [21]

Par ailleurs, le choix du volume de rinçage est également important. Il varie de 0,5 à 3 mL selon les équipes [19]. Des volumes importants de liquide de rinçage diminuent la sensibilité du dosage de Tg et des volumes faibles pourraient ne pas permettre de « rincer » suffisamment l'aiguille. Le consensus français recommande d'utiliser 1 mL [8]. Il a par ailleurs été montré que trois rinçages successifs dans ce même volume permettaient de recueillir 97 % de la Tg présente dans l'aiguille de cytoponction [22].

Les résultats du dosage de TgIS peuvent s'exprimer de deux manières. Certaines équipes les rapportent par volume de liquide de rinçage (ng/mL ou µg/L), d'autres par ponction (ng/ponction). C'est ce dernier mode d'expression qui a été retenu en France car le résultat obtenu correspond à une quantité de Tg présente dans l'aiguille de cytoponction et non à une véritable concentration dans un liquide biologique [8].

Aujourd'hui, la Tg dans les liquides de rinçage des aiguilles de cytoponction est dosée au moyen des mêmes trousse que celles qui sont validées initialement par les fournisseurs sur matrice sérique. Ces trousse utilisent des méthodes manuelles ou automatisées de type immunométrique et sont raccordées pour la majorité d'entre elles au standard CRM 457. Les méthodes utilisées ont des performances très variables dans le sérum, notamment en termes de sensibilité fonctionnelle (SeF). C'est cette dernière qui selon les recommandations

françaises [8], doit être utilisée comme seuil décisionnel dans le dosage de TgIS. Les méthodes dites de 1<sup>ère</sup> génération ont des SeF comprises entre 0,5 et 1 µg/L. Les SeF des méthodes de seconde génération sont de l'ordre de 0,1 µg/L.

La littérature rapporte des seuils de décision très hétérogènes y compris pour une même méthode de dosage [19]. Certaines équipes choisissent leur seuil à l'aide de courbe ROC (Receiver Operating Characteristic), permettant de choisir le meilleur compromis entre la sensibilité et la spécificité de l'examen. D'autres, utilisent soit la moyenne plus deux écart-types des valeurs obtenues pour des cytologies négatives, soit comparent la valeur de TgIS à la valeur sérique de Tg. Dans certaines études, la valeur de 1 µg/L, correspondant à une SeF des méthodes de première génération, est utilisée alors que la méthode a une SeF théoriquement plus basse [19]. Depuis 2011, le groupe de consensus français recommande néanmoins qu'un résultat de TgIS < 1 ng/cytoponction soit considéré comme normal, douteux et à confronter à la cytologie si retrouvé entre 1 et 10 ng/cytoponction, et enfin en faveur de la présence de tissu tumoral si > 10 ng/cytoponction [8].

L'utilisation de trousse commerciales initialement conçues pour des dosages sur matrice sérique doit être validée si ces trousse sont utilisées en dehors de leur destination initiale. Cette validation est devenue obligatoire dans le contexte de l'accréditation des laboratoires de biologie médicale par le COFRAC, selon la norme ISO EN NF 15189. Elle permet d'évaluer les performances de la méthode « adaptée », notamment en termes de limite de détection, de sensibilité fonctionnelle et de vérifier également l'absence d'effet de matrice.

Dans l'étude que nous rapportons ici, nous avons évalué de façon multicentrique les performances analytiques de cinq méthodes de dosage de la Tg dans un tampon approprié, utilisable comme liquide de rinçage. L'objectif de l'étude était double. Elle avait pour but d'une part de valider les méthodes de dosage les plus utilisées en France selon une méthodologie commune et, d'autre part, de proposer des seuils de décision propres à chacune d'entre elles pour leur utilisation en clinique.

J'ai ainsi pu contribuer techniquement aux manipulations réalisées dans l'un des centres. J'ai par ailleurs pu analyser et synthétiser l'ensemble des données recueillies auprès des différents laboratoires participant à cette étude.

# MATÉRIEL ET MÉTHODES

## 1. Méthodes de dosage et laboratoires

L'étude a été coordonnée par le laboratoire d'hormonologie du CHU d'Angers et a porté sur cinq méthodes parmi les plus utilisées en France [23]. Trois méthodes ont été évaluées indépendamment par deux laboratoires différents. Deux méthodes n'ont été évaluées que dans un seul laboratoire. Chacun des huit laboratoires a été identifié par une lettre de A à H. L'évaluation a porté sur les méthodes suivantes :

- La méthode automatisée « Access® Tg » de Beckman Coulter sur l'automate « Access 2 Immunoassay System » : laboratoire A.
- La méthode manuelle « THYRO » de Cisbio Bioassays : laboratoires B et C.
- La méthode automatisée « Elecsys® Tg II » de Roche sur l'automate « Elecsys® Modular E170 » : laboratoire D.
- La méthode automatisée « IMMULITE® 2000 Thyroglobulin » de Siemens sur l'automate « IMMULITE® 2000 » : laboratoires E et F.
- La méthode automatisée « B·R·A·H·M·S hTg sensitive KRYPTOR » de ThermoFischer SCIENTIFIC sur l'automate « KRYPTOR Compact PLUS » : laboratoires G et H.

Pour chaque méthode évaluée, le protocole de dosage défini par le fournisseur a été respecté. Les dosages ont été réalisés dans le cadre de la routine du laboratoire, avec des automates et matériels entretenus, maintenus et contrôlés par des contrôles internes de qualité (CIQ).

## 2. Performances évaluées

Les performances suivantes ont été évaluées :

- La fidélité (ou précision) : répétabilité et fidélité intermédiaire (ou reproductibilité intra-laboratoire)
- L'étendue de mesure regroupant :
  - Limite de linéarité
  - Limite de détection analytique (LoD)
  - Limite de quantification (LoQ) et Sensibilité fonctionnelle (SeF)
- La justesse et l'exactitude

### 2.1. Fidélité : répétabilité et fidélité intermédiaire

La fidélité est définie comme l'étroitesse de l'accord entre les indications d'une valeur mesurée obtenues par des mesures répétées du même échantillon dans des conditions spécifiées [24].

La répétabilité et la fidélité intermédiaire ont été évaluées à six niveaux de concentration de CRM 457 (0,125 à 10 µg/L), en mesurant la Tg six fois dans cinq séries différentes et en faisant varier les facteurs d'influence « sensibles » (lots de réactifs, calibrations, maintenances de l'automate). Tous les laboratoires ont utilisé au moins deux lots différents de réactifs et entre deux et cinq calibrations différentes.

Une analyse de variance à un facteur (ANOVA) a été effectuée pour chaque niveau de concentration, après vérification préalable de l'homogénéité des variances par un test de LEVENE modifié par Brown et Forsythe utilisant les écarts aux médianes des groupes.

L'hypothèse d'homogénéité a été rejetée si  $p < 0,05$ , ne permettant alors pas le calcul des CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire.

La variance de reproductibilité (Fidélité intermédiaire) est par définition la somme de deux variances :

- La variance de répétabilité ou variance résiduelle ( $S_r^2$ ) liée à la variabilité intra-série
- La variance inter-jour ( $S_j^2$ ) liée à la variabilité inter-séries

La variance de reproductibilité ( $S_R^2$ ) a donc été calculée selon la formule suivante :

$$S_R^2 = S_r^2 + S_j^2$$

La variance de répétabilité a pu être estimée à la fois :

- Par la moyenne des variances calculées dans chacune des séries
- Par le carré moyen résiduel (ou moyenne des carrés intra-groupe) issu de l'ANOVA

Les deux options permettent d'obtenir les mêmes résultats [25].

Le coefficient de variation de la répétabilité ( $CV_r$ ) a été calculé selon la formule :

$$CV_r = \frac{\sqrt{\text{variance de répétabilité}}}{\text{moyenne des 30 répliques}} \%$$

La variance inter-jour a pu être estimée grâce au carré moyen inter-groupes fourni par l'ANOVA par le calcul suivant :

$$S_j^2 = \frac{\text{carré moyen intergroupes} - \text{carré moyen résiduel}}{\text{nombre de répliques par série}}$$

Le coefficient de variation de reproductibilité ( $CV_{FI}$ ) a été calculé selon la formule :

$$CV_{FI} = \frac{\sqrt{\text{variance de reproductibilité}}}{\text{moyenne des 30 répliques}} \%$$

## 2.2. Linéarité

Son évaluation a consisté à déterminer les limites de validité de la relation linéaire existant entre les concentrations observées et les concentrations théoriques des dilutions d'un échantillon à 100 µg/L [26].

La linéarité a été évaluée en analysant dans une même série 10 échantillons de concentrations différentes, avec trois ou six mesures selon la concentration (6 répliques pour les concentrations de 0,125 à 10 µg/L, 3 répliques pour celles de 20 à 100 µg/L). Le blanc (PBS-albumine 1%) a été analysé 30 fois dans cette même série, permettant également de calculer la limite de détection (LoD).

Les résultats ont été exploités au moyen de deux graphiques :

- Un graphique représentant les droites de régression des valeurs observées (en ordonnée) en fonction des dilutions effectuées (en abscisse) par la méthode des moindres carrés.
- Un graphique portant en abscisse les dilutions effectuées et en ordonnée le pourcentage de récupération correspondant au rapport entre la concentration mesurée et la concentration attendue. Les limites d'acceptabilité de ce rapport ont été fixées à  $100 \pm 20$  % [25].

L'examen visuel de ces graphiques a été complété par une analyse statistique. L'intervalle de confiance à 95 % de l'ordonnée à l'origine de la droite de régression « Valeur observée en fonction de la dilution » a été calculé. L'ordonnée à l'origine a été comparée à la valeur « 0 » théoriquement attendue en l'absence d'erreur systématique constante.

## 2.3. Limite de détection

La limite de détection (LoD) d'une méthode correspond à la plus petite quantité à examiner dans un échantillon pouvant être détectée mais non quantifiée comme une valeur exacte [26,27]. La LoD est donc la plus petite concentration qui diffère statistiquement du blanc.

Elle a été estimée selon les recommandations de la SFBC [28] d'après la formule :

$$LoD = \frac{(m+t*s)-b}{a}$$

Où **a** est égal à la pente de la droite de régression du signal en fonction de la concentration entre 0 et 1 µg/L, **b** correspond à son ordonnée à l'origine, **m** à la moyenne du signal obtenu sur la mesure du blanc, et **s** l'écart type de ce même signal. La valeur de **t** a été déduite de la table de Student compte tenu du nombre de répétitions des mesures du blanc et du risque choisi. Pour t=3, le risque d'affirmer à tort que l'échantillon est différent du blanc est de 1 %.

## 2.4. Justesse

La justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de résultats et une valeur qui est acceptée soit comme une valeur conventionnellement vraie, soit comme une valeur de référence acceptée. Elle permet de fournir une indication sur l'erreur systématique [28].

La concentration moyenne des échantillons, obtenue lors de l'évaluation de la fidélité pour chacune des concentrations de 0,125 à 10 µg/L, a été comparée à la concentration de CRM 457 dans l'échantillon. La justesse a été exprimée en biais relatif :

$$\text{Biais relatif} = \frac{\text{concentration moyenne} - \text{concentration théorique}}{\text{concentration théorique}} \times 100$$



## 2.5. Erreur totale, limite de quantification et sensibilité fonctionnelle

L'erreur totale (ET) est la somme de l'erreur systématique (biais de justesse en valeur absolue) et de l'erreur aléatoire (CV de fidélité intermédiaire) selon la formule [29] :

$$ET = 1,65 \times CV_{FI} (\%) + \text{Biais} (\%)$$

Une erreur totale de 40 % a été considérée comme une limite de quantification.

La sensibilité fonctionnelle a été définie comme la plus petite concentration, dans les limites de linéarité de la méthode, pour laquelle le CV de fidélité intermédiaire est inférieur ou égal à 20 %. Elle a soit été estimée graphiquement à partir du profil de précision établi pour chaque laboratoire lorsque les valeurs du  $CV_{FI}$  dépassait les 20 %, soit en retenant la valeur de la plus petite concentration mesurée dont le  $CV_{FI}$  était  $\leq 20$  %.

## 2.6. Exactitude

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'un essai et la valeur de référence acceptée, aussi appelée « valeur conventionnellement vraie ». L'exactitude résulte des erreurs de justesse et de fidélité [30].

L'exactitude a été évaluée sur un même échantillon adressé à chaque laboratoire et ayant une concentration théorique de 100 µg/L. Elle a été exprimée en biais relatif :

$$\text{Biais relatif} = \frac{\text{concentration moyenne} - \text{concentration théorique}}{\text{concentration théorique}} \times 100$$

## 3. Préparation et conservation des échantillons

Les échantillons de Tg ont été préparés à partir d'un matériau de référence certifié (CRM 457, Sigma-Aldrich).

### 3.1. Préparation de la solution « mère »

Le laboratoire coordonnateur a d'abord préparé une solution « mère » à 100 µg/L en diluant le matériau de référence dans une solution saline tamponnée contenant 1 % d'albumine bovine (PBS-albumine 1 %, Sigma-Aldrich).

La solution mère a ensuite été répartie en différentes fractions aliquotes qui ont ensuite été congelées à une température contrôlée <-18°C. Une fraction aliquote a ensuite été envoyée dans des conditions de température contrôlées aux différents laboratoires participant à l'évaluation.

### 3.2. Préparation des échantillons destinés à l'évaluation

Onze différents échantillons de Tg de concentration allant de 0 à 100 µg/L (0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 5, 10, 20, 40, 80, 100 µg/L) ont été préparés, au sein de chaque laboratoire participant, par dilution en cascade de la solution mère dans le tampon PBS-albumine 1 %. Ces échantillons ont été séparés en différentes fractions aliquotes puis congelés (<18°C) jusqu'à utilisation.

## 4. Analyse statistique des données

Les tests d'homogénéité des variances (Test de LEVENE modifié par Brown et Forsythe) ont été réalisés grâce à un traitement des données en ligne (<http://www.anastats.fr/outils.php>).

Les autres calculs et analyses statistiques des données ont été réalisés à l'aide du logiciel Microsoft® EXCEL.

Les critères de performance évalués ont été comparés aux spécifications fournies par les fournisseurs pour les dosages sériques reportés dans l'**Annexe 1**.

# RÉSULTATS

L'étude menée dans les différents laboratoires s'est déroulée de Décembre 2016 à Août 2018. L'évaluation des performances des méthodes a été réalisée pour des concentrations en CRM 457 de 0,125 à 100 µg/L pour les laboratoires A, D, G et H, de 1 à 100 µg/L pour les laboratoires B et C et de 0,5 à 100 µg/L pour les laboratoires E et F. Pour ces deux derniers laboratoires utilisant la méthode « IMMULITE® 2000 Thyroglobulin », la concentration à 0,25 µg/L n'a pu être évaluée bien que théoriquement dans le domaine de mesure. En effet, certaines valeurs mesurées étaient inférieures à 0,2 µg/L, limite de détection évaluée par le fournisseur.

## 1. Fidélité

La fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire) des méthodes sur les niveaux de concentrations évalués a été calculée à l'aide de l'ANOVA après vérification de l'homogénéité des variances. Les CV sont reportés dans les **Tableaux I** et **II**. Les résultats du test d'homogénéité des variances sont reportés dans le **Tableau III**. L'hypothèse d'homogénéité a été rejetée pour la concentration à 5 µg/L du laboratoire B, ne permettant pas de calculer les CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire pour ce niveau de concentration.

Le CV de fidélité intermédiaire était inférieur à 20 % quel que soit le niveau de concentration évalué pour les laboratoires A, B, D, G et H. Il était au maximum de 20,9 % pour le laboratoire C. Les CV observés avec la méthode « IMMULITE® 2000 Thyroglobulin » (Labos E et F) étaient compris entre 5,3 % à 10,3 µg/L et 29,4 % à 0,6 µg/L.

**Tableau I** : Résultats de fidélité : laboratoires A à D

Méthode		Access® Tg			THYRO						Elecsys® Tg II		
Laboratoire		A			B			C			D		
M (µg/L)/CV (%)		M	CV <sub>r</sub>	CV <sub>FI</sub>	M	CV <sub>r</sub>	CV <sub>FI</sub>	M	CV <sub>r</sub>	CV <sub>FI</sub>	M	CV <sub>r</sub>	CV <sub>FI</sub>
Concentration cible (µg/L)	0,125	0,182	6,9	7,8	HDM	HDM	HDM	HDM	HDM	HDM	0,138	3,7	5,6
	0,25	0,35	3,7	6,8	HDM	HDM	HDM	HDM	HDM	HDM	0,30	2,2	4,0
	0,5	0,7	1,8	2,1	HDM	HDM	HDM	HDM	HDM	HDM	0,6	2,0	4,6
	1	1,3	2,2	3,7	0,86	7,9	8,9	0,81	13,3	20,9	1,1	1,4	3,3
	5	6,3	1,3	2,4	NC	NC	NC	4,7	5,4	7,0	5,6	1,5	4,8
	10	12,3	1,7	3,5	10,1	2,9	3,1	9,7	4,3	6,7	11,1	1,5	3,8

M = Moyenne des valeurs obtenues ; CV = Coefficient de Variation ; CV<sub>r</sub> = CV de répétabilité ; CV<sub>FI</sub> = CV de fidélité intermédiaire ; NC=Non calculé ; HDM = Hors du domaine de mesure

**Tableau II** : Résultats de fidélité : laboratoires E à H

Méthode		IMMULITE® 2000 Thyroglobulin						B·R·A·H·M·S hTg sensitive KRYPTOR					
Laboratoire		E			F			G			H		
M (µg/L)/CV (%)		M	CV <sub>r</sub>	CV <sub>FI</sub>	M	CV <sub>r</sub>	CV <sub>FI</sub>	M	CV <sub>r</sub>	CV <sub>FI</sub>	M	CV <sub>r</sub>	CV <sub>FI</sub>
Concentration cible (µg/L)	0,125	HDM	HDM	HDM	HDM	HDM	HDM	0,195	11,5	13,7	0,240	8,1	9,3
	0,25	NC	NC	NC	NC	NC	NC	0,31	6,8	7,2	0,37	5,8	5,8
	0,5	0,6	15,1	29,4	0,6	15,5	27,7	0,6	3,6	4,5	0,6	3,3	4,2
	1	1,2	10,3	19,6	1,1	9,1	17,6	1,1	2,4	2,5	1,2	2,2	2,6
	5	5,3	5,0	15,9	5,2	6,1	7,8	5,2	1,6	2,1	5,5	1,2	2,9
	10	11,0	4,1	7,2	10,3	3,0	5,3	10,5	1,9	2,1	10,7	1,9	2,4

**Tableau III** : Résultats d'homogénéité des variances

Méthode		Access® Tg	THYRO		Elecsys® Tg II	IMMULITE® 2000 Thyroglobulin		B·R·A·H·M·S hTG sensitive KRYPTOR	
Laboratoire		A	B	C	D	E	F	G	H
Concentration cible (µg/L)	0,125	OUI p=0,0703	NA	NA	OUI p=0,3008	NA	NA	OUI p=0,1306	OUI p=0,7536
	0,25	OUI p=0,1892	NA	NA	OUI p=0,4850	NA	NA	OUI p=0,4283	OUI p=0,3586
	0,5	OUI p=0,7830	NA	NA	OUI p=0,3668	OUI p=0,9707	OUI p=0,6425	OUI p=0,8241	OUI p=0,1497
	1	OUI p=0,6194	OUI p=0,7084	OUI p=0,2929	OUI p=0,5760	OUI p=0,2293	OUI p=0,7693	OUI p=0,5747	OUI p=0,3000
	5	OUI p=0,9878	NON p=0,0000	OUI p=0,6336	OUI p=0,4193	OUI p=0,8229	OUI p=0,1141	OUI p=0,3172	OUI p=0,2594
	10	OUI p=0,3408	OUI p=0,0699	OUI p=0,4941	OUI p=0,5159	OUI p=0,2405	OUI p=0,3329	OUI p=0,4959	OUI p=0,4542

OUI = hypothèse de l'homogénéité des variances vérifiée ; NON = les variances sont trop hétérogènes ; NA = Non applicable

## 2. SeF, LoD et ET

Les SeF, LoD, ET à 40 % selon la concentration sont reportés dans les **Tableaux IV et V**.

Les profils de précision de chaque méthode sont illustrés par les **Figures 1 à 3**. Les LoD s'échelonnaient entre une valeur  $\leq 0,04$  µg/L pour la méthode « Tg II Thyroglobuline » de Roche (Laboratoire D) et 0,5 pour la méthode « IMMULITE® 2000 Thyroglobuline » de Siemens (Laboratoire F). Les SeF variaient d'une valeur  $\leq 0,14$  µg/L à 1,2 µg/L selon les méthodes. L'ET à 40 % était quant à elle comprise entre 0,3 et 3,4 µg/L. Pour la méthode « Elecsys® Tg II » de Roche (Laboratoire D), l'ET était au maximum de 27,5 % pour une concentration cible de 0,25 µg/L.

**Tableau IV** : Résultats de la SeF et de la LoD

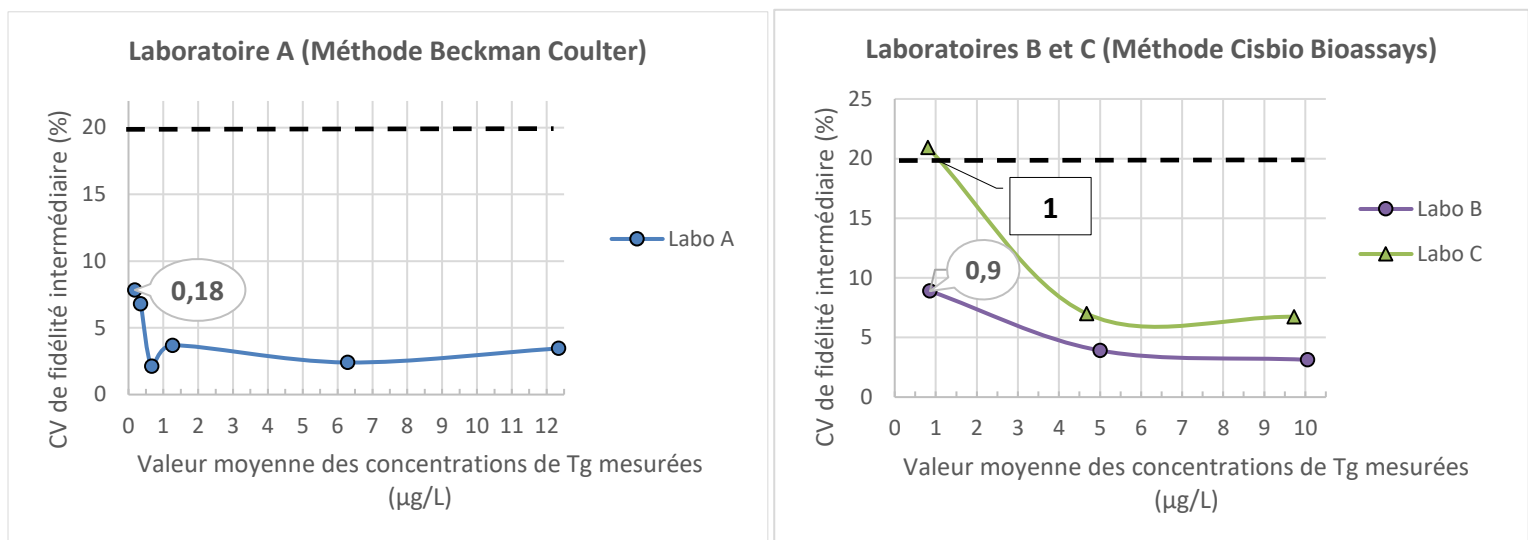
Méthode	Access® Tg	THYRO		Elecsys® Tg II	IMMULITE® 2000 Thyroglobuline		B·R·A·H·M·S hTG sensitive KRYPTOR	
Laboratoire	A	B	C	D	E	F	G	H
LoD (µg/L)	0,06	$\leq 0,2$	0,3	$\leq 0,04$	0,35	0,5	0,15	0,25
SeF (µg/L)	$\leq 0,18^*$	$\leq 0,9^*$	1	$\leq 0,14^*$	1,2	0,8	$\leq 0,20^*$	$\leq 0,24^*$

\*Plus petite valeur mesurée avec un CV  $\leq 20$  %

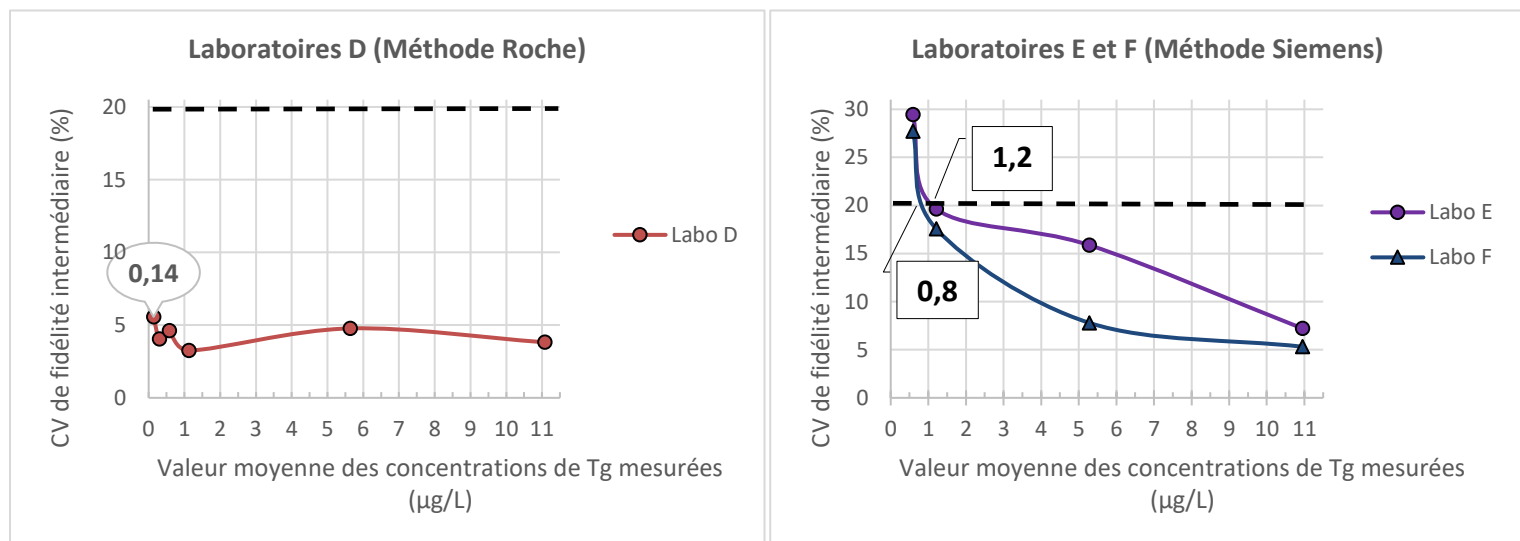
**Tableau V** : Résultats de l'ET à 40 %

Méthode		Access® Tg		THYRO				Elecsys®Tg II		IMMULITE® 2000 Thyroglobulin				B·R·A·H·M·S hTG sensitive KRYPTOR			
Laboratoire		A		B		C		D		E		F		G		H	
ET ≤ 40 % (µg/L)		0,6		0,9*		1,6		0,3*		3,4		1,2		0,3		0,6	
M (µg/L)/ET (%)		M	ET	M	ET	M	ET	M	ET	M	ET	M	ET	M	ET	M	ET
Concentration cible (µg/L)	0,125	0,182	58,5	HDM	NC	HDM	NC	0,138	19,1	HDM	NC	HDM	NC	0,195	78,9	0,240	107,4
	0,25	0,35	50,4	HDM	NC	HDM	NC	0,30	27,5	NC	NC	NC	NC	0,31	37,6	0,37	57,6
	0,5	0,7	37	HDM	NC	HDM	NC	0,6	23	0,6	65,8	0,6	57,9	0,6	19,3	0,6	36
	1	1,3	32,3	0,86	28,9	0,81	53,5	1,1	18	1,2	53,6	1,1	41,4	1,1	11	1,2	22,4
	5	6,3	29,7	NC	NC	4,7	18	5,6	20,6	5,3	31,9	5,2	17,8	5,2	7,2	5,5	15,7
	10	12,3	29,10	10,1	5,7	9,7	13,8	11,1	17	11,0	21,4	10,3	12,2	10,5	8,8	10,7	10,8

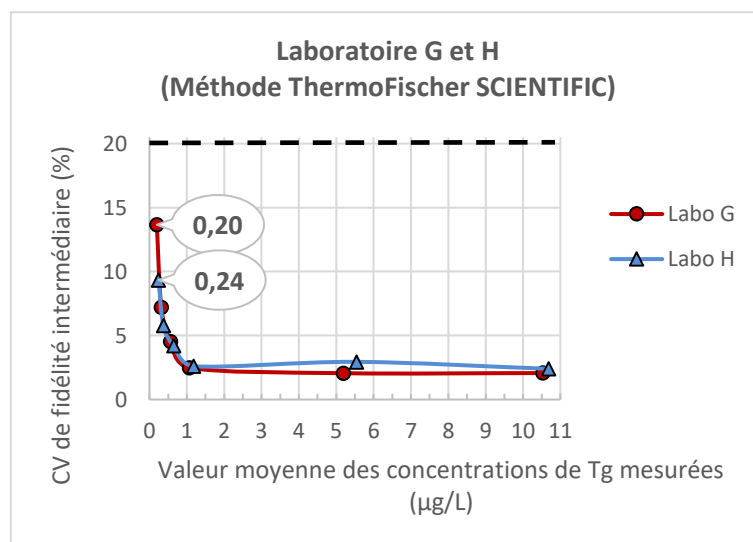
M = Moyenne des valeurs obtenues ; ET = Erreur totale ; NC=Non calculé ; HDM = Hors du domaine de mesure ; \*Plus petite valeur mesurée avec une ET  $\leq 40$  %



**Figure 1** : Profil de précision des méthodes Beckman Coulter et Cisbio Bioassays



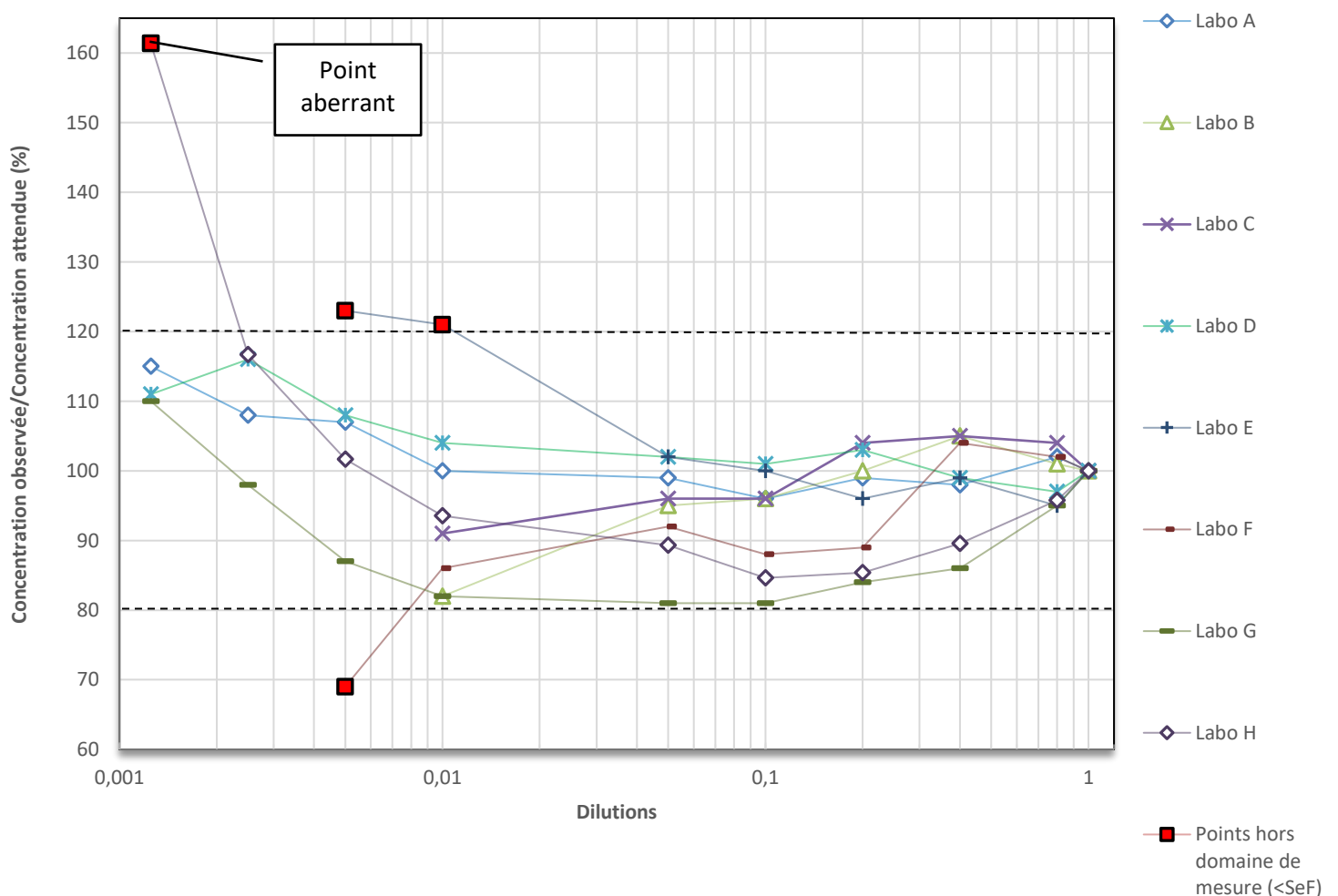
**Figure 2** : Profil de précision des méthodes Roche et Siemens



**Figure 3** : Profil de précision de la méthode ThermoFischer SCIENTIFIC

### 3. Linéarité

Après exclusion d'un point aberrant (premier point du Labo H), les pourcentages de récupération étaient compris entre 80 et 120 % dans l'intervalle de mesure compris entre la SeF, observée pour la méthode dans le laboratoire, et 100 µg/L. (**Figure 4, Tableau VI**).



**Figure 4** : Représentation des pourcentages de récupération en fonction des dilutions

**Tableau VI** : Résultats des rapports des concentrations observées/attendues

Méthode				Access® Tg		THYRO				Elecys®Tg II		IMMULITE® 2000 Thyroglobulin				B·R·A·H·M·S hTG sensitive KRYPTOR			
Laboratoire				A		B		C		D		E		F		G		H	
SeF (µg/L)				≤ 0,18		≤ 0,9		1		≤ 0,14		1,2		0,8		≤ 0,20		≤ 0,24	
MA (µg/L)/R (%)				MA	R	MA	R	MA	R	MA	R	MA	R	MA	R	MA	R	MA	R
Dilutions	0,00125	Concentrations cibles (µg/L)	0,125	0,177	115	HDM	NC	HDM	NC	0,130	111	HDM	NC	HDM	NC	0,162	110	0,156	161
	0,0025		0,25	0,33	108	HDM	NC	HDM	NC	0,26	116	NC	NC	NC	NC	0,32	98	0,31	117
	0,005		0,5	0,7	107	HDM	NC	HDM	NC	0,5	108	0,6	123	0,6	69	0,6	87	0,6	102
	0,01		1	1,2	100	1,0	82	1,0	91	1,0	104	1,17	121	1,16	86	1,3	82	1,2	94
	0,05		5	6,1	99	5,1	95	4,9	96	5,2	102	5,9	102	5,8	92	6,5	81	6,2	89
	0,1		10	11,8	96	10,2	96	9,9	96	10,4	101	11,7	100	11,6	88	13,0	81	12,5	85
	0,2		20	24,2	99	20,4	100	19,8	104	20,8	103	23,4	96	23,2	89	25,9	84	24,9	85
	0,4		40	48,1	98	40,9	105	39,6	105	41,6	99	46,8	99	46,4	104	51,8	86	49,9	90
	0,8		80	99,5	102	81,8	101	79,1	104	83,1	97	93,6	95	92,8	102	103,7	95	99,8	96
	1		100	122,4	100	102,2	100	98,9	100	103,9	100	117,0	100	116,0	100	129,6	100	124,7	100

MA = Moyenne des valeurs attendues ; R = Rapport concentrations observées/attendues ; NC=Non calculé ; HDM = Hors du domaine de mesure ; Valeur comprise/non comprise entre 80 et 120 %

Les droites de régression représentant les moyennes des valeurs mesurées en fonction de chaque dilution ont été déterminées pour chaque laboratoire mais non représentées ici. Les équations de chaque droite, les coefficients de détermination  $R^2$  ainsi que les intervalles de confiance (IC) à 95 % de l'ordonnée à l'origine, sont reportés dans le **Tableau VII**.

**Tableau VII** : Équations des droites de régression et intervalles de confiance de l'ordonnée à l'origine

Méthode	Laboratoire	Intervalle de concentration	Equation de la droite de régression	$R^2$	IC à 95 % de l'ordonnée à l'origine
Access® Tg	A	0,177-122	$y = 123,1x - 0,1793$	0,9998	[-0,74 ; 0,39]
THYRO	B	1-100	$y = 102,94x - 0,0056$	0,9996	[-1,27 ; 1,26]
	C	1-100	$y = 100,73x + 0,1635$	0,9989	[-1,79 ; 2,11]
Elecys® Tg II	D	0,130-104	$y = 102,5x + 0,1242$	0,9996	[-0,61 ; 0,86]
IMMULITE® 2000 Thyroglobulin	E	0,6-117	$y = 114,87x + 0,0035$	0,9991	[-1,65 ; 1,66]
	F	0,6-116	$y = 117,61x - 0,7254$	0,9993	[-2,25 ; 0,80]
B·R·A·H·M·S hTG sensitive KRYPTOR	G	0,16-100	$y = 127,15x - 1,4243$	0,9972	[-3,78 ; 0,93]
	H	0,16-100	$y = 122,68x - 1,0382$	0,9982	[-2,89 ; 0,81]

IC = Intervalle de confiance ;  $R^2$  = Coefficient de détermination



## 4. Justesse

Les résultats de la justesse, qui a été évaluée sur la même gamme de concentration que la fidélité, sont reportés dans le **Tableau VIII**.

Les biais relatifs variaient de -19 % à 26,2 % selon les méthodes pour une concentration cible à 1 µg/L. Ils s'échelonnaient entre -2,7 % et 23,4 % pour une concentration cible à 10 µg/L. Les biais étaient positifs sauf pour la méthode « THYRO » dont les biais étaient négatifs ou proches de zéro.

**Tableau VIII** : Résultats du biais de justesse

Méthode		Access® Tg		THYRO				Elecsys®Tg II		IMMULITE® 2000 Thyroglobulin				B-R-A-H-M-S hTG sensitive KRYPTOR			
Laboratoire		A		B		C		D		E		F		G		H	
SeF (µg/L)		≤ 0,18		≤ 0,9		1		≤ 0,14		1,2		0,8		≤ 0,20		≤ 0,24	
M (µg/L)/BJ (%)		M	BJ	M	BJ	M	BJ	M	BJ	M	BJ	M	BJ	M	BJ	M	BJ
Concentration cible (µg/L)	0,125	0,182	45,6	HDM	NC	HDM	NC	0,138	10,1	HDM	NC	HDM	NC	0,195	56,3	0,240	92,0
	0,25	0,35	39,2	HDM	NC	HDM	NC	0,30	20,9	NC	NC	NC	NC	0,31	25,7	0,37	48,1
	0,5	0,7	33,5	HDM	NC	HDM	NC	0,6	15,5	0,6	17,2	0,6	12,1	0,6	11,8	0,6	29,1
	1	1,3	26,2	0,86	-14,2	0,81	-19,0	1,1	12,7	1,2	21,2	1,1	12,5	1,1	6,9	1,2	18,1
	5	6,3	25,8	NC	NC	4,7	-6,4	5,6	12,8	5,3	5,7	5,2	4,9	5,2	3,8	5,5	10,8
	10	12,3	23,4	10,1	0,5	9,7	-2,7	11,1	10,8	11,0	9,5	10,3	3,4	10,5	5,3	10,7	6,8

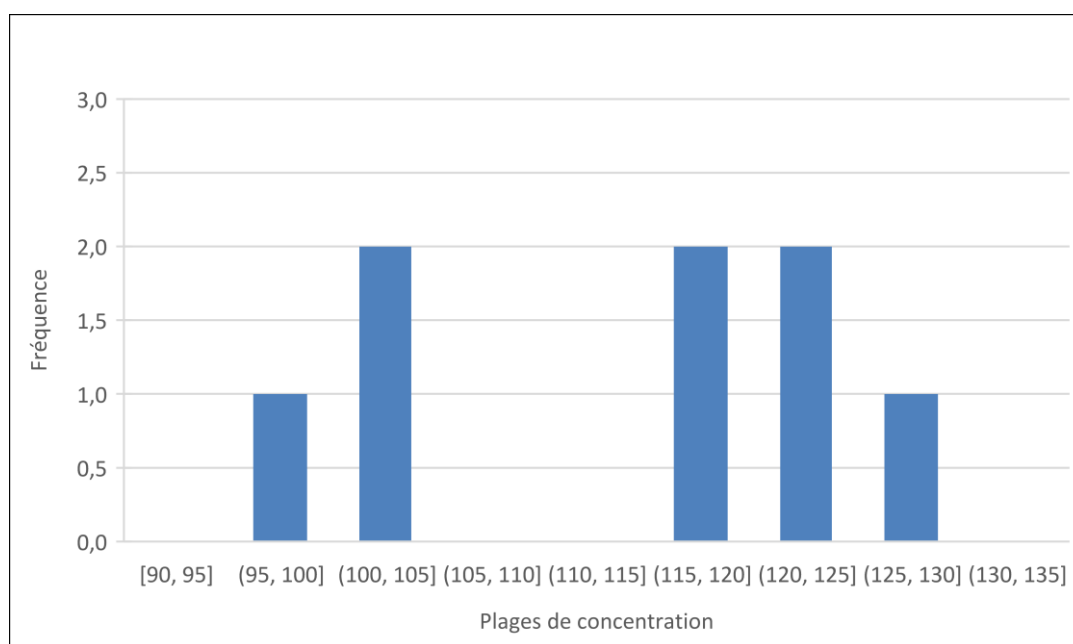
M = Moyenne des valeurs obtenues ; BJ = Biais de justesse ; NC = Non calculé ; HDM = Hors du domaine de mesure

## 5. Exactitude

Les valeurs de Tg des huit laboratoires se répartissaient entre 98,9 et 129,6 µg/L pour une concentration cible à 100 µg/L, soit des biais d'exactitude compris entre -1,1 et 29,6 % (**Tableau IX et Figure 5**).

**Tableau IX** : Biais d'exactitude à 100 µg/L

Méthode	Access® Tg	THYRO		Elecsys® Tg II	IMMULITE® 2000 Thyroglobulin		B·R·A·H·M·S hTG sensitive KRYPTOR	
Laboratoire	A	B	C	D	E	F	G	H
Valeur moyenne pour 100 µg/L	122,4	102,2	98,9	103,9	117,0	116,0	129,6	124,7
Biais relatif (%)	22,4	2,2	-1,1	3,9	17	16	29,6	24,7



**Figure 5** : Répartition des concentrations mesurées sur l'échantillon à 100 µg/L

# DISCUSSION

## 1. Contexte

Depuis la première étude menée par Pacini *et al.* en 1992 [17], l'intérêt du dosage de la Tg dans le liquide de rinçage des aiguilles de cytoponction n'a jamais été remis en question. En revanche, plusieurs autres études ont depuis montré que de nombreux facteurs méthodologiques, notamment techniques, pouvaient influencer les valeurs de Tg retrouvées dans les ponctions ganglionnaires [19].

Jusqu'à présent, les dosages ont toujours été effectués à l'aide de trousse commerciales détournées de leur usage initial (dosages d'échantillons sériques). Cette utilisation en dehors des préconisations fournisseurs nécessite donc une vérification des différentes performances de ces méthodes de dosage. Cette vérification constituait l'un des deux objectifs de ce travail.

## 2. Justification des choix du protocole

Cinq méthodes ont été sélectionnées parmi les plus utilisées en France au regard des groupes de pairs participant à l'EEQ ProBioQual [23]. Les critères qui ont été évalués sont exigés par le COFRAC dans le cadre des validations de méthode en portée B : répétabilité, fidélité intermédiaire, justesse, exactitude, étendue de mesure (LoD, LoQ, linéarité) [31]. Les méthodes ont ainsi été validées sur une gamme de concentrations de CRM 457 allant de 0 à 100 µg/L, compte tenu des seuils décisionnels habituellement utilisés [8]. La précision et la justesse ont été évaluées dans les concentrations basses (entre la LoD et 10 µg/L) qui correspondent aux concentrations d'intérêt dans le contexte de ce dosage. Néanmoins, une dilution supplémentaire se rapprochant davantage de la LoD des trousse de deuxième

génération aurait pu permettre d'évaluer de manière encore plus précise la valeur de la SeF. La répétabilité et la fidélité intermédiaire ont été évaluées selon un mode opératoire alternatif proposé par Vassault *et al.* (5 séries de 6 répétitions) [28]. Il diffère du mode opératoire classique (30 répétitions du dosage par niveau de concentration) et permet de raccourcir la durée de l'évaluation. Les résultats ont cependant été obtenus en faisant varier au maximum les conditions opératoires (étalonnage, lots de réactifs, maintenances des automates) dans l'intervalle d'étude. Avec ce mode opératoire, les résultats doivent par ailleurs être exploités à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) par niveau de concentration. Cette méthode statistique suppose en effet des variances homogènes entre les cinq séries. Afin de s'en assurer, un test de LEVENE modifié a été réalisé. Les résultats de ce test nous ont ainsi conduits à ne pas calculer le CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire du laboratoire B pour la concentration à 5 µg/L. La détermination de la SeF au moyen de ce protocole ne constitue cependant qu'une approche, puisqu'une période d'évaluation plus longue de six à douze mois est recommandée [32], bien qu'en général non respectée par les fournisseurs.

L'influence des substances potentiellement présentes dans le liquide de rinçage n'a volontairement pas été étudiée. L'impact des interférences « classiques » (hémolyse, ictère, turbidimétrie) ayant été évaluée par les fournisseurs, nous n'avons pas réalisé d'essais sur site d'autant que certaines d'entre elles ne sont pas pertinentes dans ce contexte. L'hémolyse pourrait cependant être une source d'incertitude des résultats, indépendamment de l'interférence analytique possible. En effet, cette hémolyse témoigne de la contamination de l'échantillon lors d'un prélèvement traumatique, par des protéines plasmatiques. Cette contamination serait, selon Borel *et al.* [22], au maximum de 5 %, ce qui indiquerait que la concentration de Tg circulante ne pourrait interférer avec les résultats de TgIS. Cependant,

Giovanella *et al.* [33] rappellent que lors de la phase pré-analytique, la présence d'une hémolyse doit systématiquement être recherchée et doit être signalée comme pouvant perturber la fiabilité du résultat.

De même, il a été démontré par plusieurs auteurs que les anticorps anti-Tg n'avaient pas d'impact sur la mesure de la TgIS [22, 34, 35].

En revanche, la nature même du liquide de rinçage est une source d'incertitude de mesure de la TgIS. Dans une étude récente, il a en effet été démontré que des phénomènes importants d'adsorption non spécifiques pouvaient survenir lorsqu'un liquide de rinçage sans protéines comme le sérum physiologique était utilisé. Indépendamment de l'effet de matrice qui pourrait intervenir au niveau analytique, l'utilisation de sérum physiologique pourrait conduire à des valeurs de TgIS sous-estimées [21]. C'est pour cette raison que nous avons décidé d'utiliser lors de cette évaluation un tampon enrichi en albumine. La stabilité de la Tg dans ce milieu ayant été démontrée [21], les sources d'incertitude préanalytiques ont ainsi été maîtrisées.

Par ailleurs en milieu protéique, la commutabilité des échantillons testés, c'est-à-dire leur capacité à se comporter comme les échantillons sériques sans engendrer d'effet de matrice, a probablement permis de limiter les biais de justesse.

Dans cette étude, les biais de justesse étaient positifs avec toutes les méthodes à l'exception de la méthode « THYRO » de Cisbio Bioassays où ils étaient négatifs ou proches de zéro (de -19 % à 0,81 µg/L jusqu'à 0,5 % à 10,1 µg/L). Les méthodes avec un biais positif surestiment la TgIS. Pour une concentration en CRM 457 à 1 µg/L, les biais étaient compris entre 6,9 % (Laboratoire G, méthode ThermoFischer SCIENTIFIC) et 26,2 % (Laboratoire A, méthode Beckman Coulter). A la valeur de la SeF (CV fidélité intermédiaire  $\leq 20$  %), les biais de justesse variaient de 10,1 % (Laboratoire D, méthode Roche) à 92 % (Laboratoire H,

méthode ThermoFischer SCIENTIFIC). Nous ne pouvons affirmer que ces biais de justesse sont dus à un effet de matrice. Ils existent également avec les échantillons sériques comme ont pu le démontrer Demers et ses collaborateurs [32].

### 3. Comparaison aux performances fournisseurs

Sur les cinq méthodes évaluées, trois méthodes sont de seconde génération (« Access® Tg » de Beckman Coulter, « Elecsys® Tg II » de Roche et « B·R·A·H·M·S hTg sensitive KRYPTOR » de ThermoFischer SCIENTIFIC) et deux méthodes sont de première génération (« THYRO » de Cisbio Bioassays et « IMMULITE® 2000 Thyroglobulin » de Siemens).

Les méthodes de première génération ont présenté, dans cette étude, des LoD comprises entre 0,2 et 0,3 µg/L pour la méthode Cisbio Bioassays et entre 0,35 et 0,5 µg/L pour la méthode Siemens pour une LoD fournisseur de 0,2 µg/L dans les deux cas. Les SeF sont pour ces méthodes comparables à celles évaluées par le fournisseur en milieu sérique, soit environ 1 µg/L (valeurs entre 0,8 et 1,2 µg/L) dans notre étude pour les deux méthodes versus 0,7 et 0,9 µg/L respectivement pour Cisbio Bioassays et Siemens. Si l'on exclut les résultats du laboratoire C ( $CV_{FI}$  à 20,9 %) pour la concentration à 0,8 µg/L qui ne sont pas en accord avec ceux du laboratoire B ( $CV_{FI}$  à 8,9 %), les CV de fidélité intermédiaire sont dans les deux laboratoires en accord avec les données du fournisseur. Il en est de même pour les laboratoires E et F pour la méthode Siemens.

Les méthodes de seconde génération, plus sensibles [36,37], présentent également une précision en accord avec les données des fournisseurs. Cette étude a montré que les LoD étaient comprises entre 0,04 µg/L (Méthode Roche) et 0,2 µg/L (valeurs entre 0,15 et 0,25

µg/L pour la méthode ThermoFischer SCIENTIFIC). Les CV de fidélité intermédiaire étaient inférieurs à 20 % sur toute la gamme de concentrations testées. Nous avons donc considéré que la plus petite concentration mesurée par le laboratoire (valeurs entre 0,14 et 0,24 µg/L) pouvait être considérée comme la SeF. Ces SeF sont comparables à celles observées dans le sérum et aux résultats de plusieurs équipes [38-42,46].

La linéarité des méthodes entre la SeF et 100 µg/L s'est révélée également satisfaisante et conforme aux exigences attendues avec des rapports valeurs observées/attendues compris entre 80 et 120 %. Cette exigence correspond généralement aux performances affichées dans les notices techniques des trousse de dosage. Nous avons par ailleurs vérifié qu'il n'existait pas d'erreur systématique en étudiant l'ordonnée à l'origine de la droite de régression des valeurs observées en fonction de la dilution. Nos résultats montrent que l'intervalle de confiance à 95 % de l'ordonnée à l'origine comprend à chaque fois la valeur « zéro », prouvant ainsi l'absence d'erreur systématique constante pour toutes les méthodes évaluées.

L'évaluation de l'exactitude à partir de l'échantillon à 100 µg/L (qui a été adressé à tous les participants de cette étude et qui n'a subi aucune manipulation), a révélé deux groupes de méthodes. Dans le premier groupe (Cisbio Bioassays et Roche), les concentrations de l'échantillon étaient très proches de la valeur cible. Dans le deuxième groupe (Beckman Coulter, Siemens, ThermoFischer SCIENTIFIC), nous avons observé des concentrations comprises entre 120 et 130 µg/L qui s'éloignent un peu de la cible. L'exactitude demeure cependant satisfaisante et les biais observés (jusqu'à +30 %) à ce niveau de concentration sont sans incidence sur les résultats des dosages dans ce contexte.

## 4. Proposition de seuil décisionnel

Les recommandations actuelles [8] proposent un seuil décisionnel relié à la SeF en fixant un seuil consensuel à 1 ng/cytoponction correspondant à la SeF dans le sérum des trousse de première génération. Conformément à ce qui est attendu, nos résultats montrent que les SeF diffèrent en fonction des générations de trousse mais ne sont pas différentes de celles affichées sur sérum.

En outre, la SeF représente un critère de précision de la méthode. Cette exigence de précision est surtout importante dans le cadre d'un suivi, lorsqu'un dosage est amené à être répété, ce qui n'est pas le cas de la TgIS. Un seuil décisionnel fondé sur la précision ne prend pas en compte l'erreur de justesse qui paraît pourtant importante dans le contexte. En effet, l'intérêt du dosage de TgIS est diagnostique et consiste à déterminer la présence ou non de Tg dans le liquide de rinçage et donc *in fine* dans l'adénopathie suspecte. Il faut donc être certain que le biais de justesse ne contribue pas, lorsqu'il est présent, à rendre un résultat surestimé avec le risque de rendre à tort un résultat positif alors qu'il n'y a pas de Tg. Inversement, le danger est de sous-estimer un résultat avec le risque de rendre un résultat négatif alors que de la Tg était pourtant présente. Nos résultats montrent ainsi qu'un biais de justesse positif est présent pour quatre des cinq méthodes sur l'ensemble des concentrations étudiées et est négatif ou presque nul pour la seule méthode Cisbio Bioassays.

Pour cette raison, il pourrait être donc plus judicieux d'utiliser comme seuil décisionnel une limite de quantification qui tiendrait compte à la fois de la justesse et de la précision. C'est pourquoi nous avons calculé l'erreur totale. Un seuil de 40 % pourrait être une limite de quantification conformément aux directives du CLSI EP-17A [48]. Pour les méthodes dont



l'erreur totale n'atteint jamais ce seuil, la valeur de la LoQ correspondrait alors à la plus faible concentration dont l'ET est inférieure à 40 %. En prenant les meilleures performances observées, les LoQ seraient alors de l'ordre de 0,3 µg/L pour la méthode ThermoFischer SCIENTIFIC et Roche, de 0,6 µg/L pour la méthode Beckman Coulter, de 0,9 µg/L pour la méthode Cisbio Bioassays et de 1,2 µg/L pour la méthode Siemens.

## CONCLUSION

L'objectif de cette étude multicentrique était d'une part de valider cinq méthodes de dosage parmi les plus utilisées en France pour le dosage de TgIS dans huit laboratoires différents et, d'autre part, de proposer des seuils de décision clinique au regard des performances propres à chacune d'elles. Ces deux objectifs ont été atteints. En évaluant les performances de chaque méthode dans un ou deux laboratoires, nous avons montré que les performances annoncées par les différents fournisseurs en termes de précision et de linéarité pouvaient être atteintes même dans une matrice non sérique telle que celle utilisée. Nous avons ainsi validé les cinq méthodes et démontré leur aptitude à doser la TgIS dans le liquide de rinçage retenu. Les laboratoires désirant utiliser un autre liquide de rinçage devraient alors procéder à une validation de méthode dans cet autre milieu. Par ailleurs, ce travail nous a permis de proposer des seuils décisionnels propres à chaque trousse en considérant l'erreur totale. Ce choix de seuil nous permettrait de prendre en compte non plus seulement la précision dont la SeF est le reflet, mais aussi le biais de justesse. Dans une perspective d'utilisation en pratique courante, ces choix de seuil pourraient faire l'objet d'une étude clinique afin d'en valider la pertinence.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] Leenhardt L, Grosclaude P. Epidémiologie et facteurs de risque des cancers thyroïdiens. *Med Nucleaire*. 2012;36:3-12.
- [2] Institut de veille sanitaire (InVS). Projections de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine en 2015 - Tumeurs solides. [Internet] Disponible sur : [http://www.invs.sante.fr/Dossierthematiques/Maladies-chroniques-et-traumatismes/Cancers/ Surveillance-epidemiologique-des-cancers/Estimationsde-l-incidence-de-la-mortalite-et-de-la-survie/Projectionsde-l-incidence-et-de-la-mortalite-par-cancer-en-Francemetropolitaine-en-2015-Tumeurs-solides](http://www.invs.sante.fr/Dossierthematiques/Maladies-chroniques-et-traumatismes/Cancers/Surveillance-epidemiologique-des-cancers/Estimationsde-l-incidence-de-la-mortalite-et-de-la-survie/Projectionsde-l-incidence-et-de-la-mortalite-par-cancer-en-Francemetropolitaine-en-2015-Tumeurs-solides).
- [3] Buffet C, Tissier F, Ménégaux F, Tresallet C, Ghander C, Lepoutre C, et al. Cancers de la thyroïde. *EMC – Endocrinologie-Nutrition*. 2016;13(4):1-27.
- [4] Pacini F, Schlumberger M, Dralle H, Elisei R, Smit JW, Wiersinga W, et al. European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *Eur J Endocrinol*. 2006;154:787-803.
- [5] Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, et al. Management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid*. 2006;69:109-42.
- [6] Borson-Chazot F, Bardet S, Bournaud C, Conte-Devolx CB, Corone C, D'Herbomez M, et al. Guidelines for the management of differentiated thyroid carcinomas of vesicular origin. *Ann Endocrinol*. 2008;69:472-86.
- [7] Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, et al. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid*. 2009;19:1167-214.

- [8] Leenhardt L, Borson-Chazot F, Calzada M, Carnaille B, Charrié A, Cochand-Priollet B, et al. Guide de bonnes pratiques pour l'usage de l'échographie cervicale et des techniques échoguidées dans la prise en charge des cancers thyroïdiens différenciés de souche vésiculaire. *Ann Endocrinol*. 2011;72:1-26.
- [9] Leenhardt L, Erdogan MF, Egedus L, Mandel SJ, Paschke R, Rago T, et al. 2013 European Thyroid Association guidelines for cervical ultrasound scan and ultrasound-guided techniques in the postoperative management of patients with thyroid cancer. *Eur Thyroid J*. 2013;2:147-59.
- [10] 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. *Thyroid*. 2016;26:1-134.
- [11] Zerdoud S, et al. Traitement par iode 131 des cancers thyroïdiens différenciés : recommandations 2017 des sociétés françaises SFMN/SFE/SFP/SFBC/AFCE/SFORL. *Med Nucleaire*. 2017.
- [12] Giraudet AL, et al. Imagerie moléculaire et biomarqueurs des cancers thyroïdiens de souche vésiculaire : recommandations 2017 de SFMN/SFE/SFP/SFBC/AFCE/SFORL. *Med Nucleaire*. 2017.
- [13] Bernier MO, et al. Usefulness of fine needle aspiration cytology in the diagnosis of loco regional recurrences of differentiated thyroid carcinoma. *Eur J Surg Oncol*. 2005;31:288-93.
- [14] Kim MJ, et al. Thyroglobulin measurement in fine-needle aspirate washouts : the criteria for neck node dissection for patients with thyroid cancer. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009;70:145-51.
- [15] Frasoldati A, Valcavi R. Challenges in neck ultrasonography : lymphadenopathy and parathyroid glands. *Endocr Pract*. 2004;10:261-8.

- [16] Frasoldati A, Toschi E, Zini M, Flora M, Caroggio A, Dotti C, et al. Role of thyroglobulin measurement in fine-needle aspiration biopsies of cervical lymph nodes in patients with differentiated thyroid cancer. *Thyroid*. 1999;9:105-11.
- [17] Pacini F, et al. Detection of thyroglobulin in fine needle aspirates of nonthyroidal neck masses : a clue to diagnosis of metastasis differentiated thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992;74:1401-4.
- [18] Shin HJ, et al. A study on serum antithyroglobulin antibodies interference in thyroglobulin measurement in fine-needle aspiration for diagnosing lymph node metastasis in postoperative patients. *PLoS ONE*. 2015;10(6):e0131096.
- [19] Grani G, Fumarola A. Thyroglobulin in lymph node fine-needle aspiration washout : a systematic review and meta-analysis of diagnostic accuracy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(6):1970-1982.
- [20] Valat C, Sapin R. Problèmes et pièges en immunoanalyse. In : Massart C, et al. *Immunoanalyse de la théorie aux critères de choix en biologie clinique*. Paris : EDP sciences. 2009;115-58.
- [21] Boux de Casson F, Moal V, Gauchez AS, Moineau MP, Sault C, Schlageter MH, Massart C. Dosage de la thyroglobuline dans les liquides de rinçage d'aiguille de cytoponction ganglionnaire : influence des conditions pré-analytiques. *Ann Biol Clin*. 2017;75(2):173-80.
- [22] Borel AL, Boizel R, Faure P, Barbe G, Boutonnat J, Sturm N, Seigneurin D et al. Significance of low levels of thyroglobulin in fine needle aspirates from cervical lymph nodes of patients with a history of differentiated thyroid cancer. *Eur J Endocrinol*. 2008;158:691-98.
- [23] PROBIOQUAL - EEQ - Immunodosages avec Marqueur - Spécialisé (CIMF) 2016 – 16MF11-16MF12. [Internet] Disponible sur : [http://static.probioqual.com/pdf/fb1dbdd977bf627db68e395b1bdfb86f/551\\_16MF1116MF12.pdf](http://static.probioqual.com/pdf/fb1dbdd977bf627db68e395b1bdfb86f/551_16MF1116MF12.pdf)

- [24] JCGM 200:2012. International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM). 3rd edition.
- [25] Gonzalez A, Herrador M. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. Trends Anal Chem. 2007;26(3).
- [26] Vassault A, Grafmeyer D, Naudin C, et al. ; et les membres de la commission « validation de techniques » de la SFBC. Protocole de validation de techniques (Documents A et B). Ann Biol Clin. 1986;46:679-745.
- [27] Baud M, Cohen R, Dumont G, Mercier M, Naudin C, Vassault A. Évaluation de la limite de détection. Inf Sci Biol. 1989;15:157-63.
- [28] Vassault A, et al. Vérification/validation des performances d'une méthode d'analyse. Ann Biol Clin. 2010; 68(1):247-294.
- [29] Oosterhuis WP. Gross overestimation of total allowable error based on biological variation. Clin Chem. 2011;57(9):1334–1336.
- [30] Directive 98/79 of the European Parliament and of the council of 27 October on in vitro diagnostic medical devices. Official Journal of the European Communities. 1998;L331:1-37.7.
- [31] Comité Français d'Accréditation (COFRAC), Guide technique d'accréditation de vérification (Portée A) / validation (Portée B) des méthodes en biologie médicale. SH GTA 04. Révision 1, 2015.
- [32] Demers LM, Spencer CA. Laboratory medicine practice guidelines : laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease. Thyroid. 2003;13-57-67.
- [33] Giovanella L, Feldt-Rasmussen U, Verburg FA, Grebe SK, Plebani M, Clark PM. Thyroglobulin measurement by highly sensitive assays : focus on laboratory challenges. Clin Chem Lab Med. 2015;53(9):1301-1314.

- [34] Boi F, Baghino G, Atzeni F, Lai ML, Faa G, Mariotti S. The diagnostic value for differentiated thyroid carcinoma metastases of thyroglobulin (Tg) measurement in washout fluid from fine-needle aspiration biopsy of neck lymph nodes is maintained in the presence of circulating anti-Tg antibodies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:1364-9.
- [35] Baskin HJ. Detection of recurrent papillary thyroid carcinoma by thyroglobulin assessment in the needle washout after fine-needle aspiration of suspicious lymph nodes. *Thyroid.* 2004;14:959-63.
- [36] Georges A, et al. Particularités méthodologiques et interprétation du dosage de thyroglobuline sérique. *Med Nucleaire.* 2012;36:24-28.
- [37] D'Herbomez M, et al. Avancées dans les dosages de thyroglobuline et leur impact dans la prise en charge des cancers différenciés de la thyroïde. *Ann Biol Clin.* 2016,7(1):21-27.
- [38] Batista MC, et al. Analytical and clinical validation of the new ultrasensitive Roche Thyroglobulin II assay. *Clinical Biochemistry.* 2017;50(7):352-353.
- [39] Iervasi A, et al. Diagnostic performance of a new highly sensitive thyroglobulin immunoassay. *Journal of endocrinology.* 2004;182:287-294.
- [40] Kwon A, et al. Assessment of the precision and functional sensitivity of two thyroglobulin assays : comparison of the second-generation Roche electrochemiluminescent immunoassay and BRAHMS radioimmunoassay. *J Lab Med Qual Assur.* 2016;38:243-248.
- [41] Roger C, et al. New-generation thyroglobulin assay : performance and implications for follow-up of differentiated thyroid carcinoma. *Ann Endocrinol.* 2014;75:227-331.
- [42] Smallridge RC, Meek SE, Morgan MA, Gates GS, Fox TP, Grebe S, et al. Monitoring thyroglobulin in a sensitive immunoassay has comparable sensitivity to recombinant human TSH-stimulated thyroglobulin in follow-up of thyroid cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(1):82-7.

- [43] Vogeser M, et al. Evaluation of the first automated thyroglobulin assay. Clin Chem Lab Med. 1999;37(2):159-164.
- [44] Giovanella L, et al. Redefining functional sensitivity of thyroglobulin assay on Immulite platform : implications in thyroid cancer management. Clin Chem Lab Med. 2007; 45(11):1523-1524.
- [45] Cho YY, et al. Performance evaluation of the serum thyroglobulin assays with immunochemiluminometric assay and immunoradiometric assay for differentiated thyroid cancer. Ann Lab Med. 2016;36:413-419.
- [46] Moussalieh FM, et al. Analytical validation of two second generation thyroglobulin assays. Clin Chem Lab Med. 2018;aop.
- [47] Rotteveel-de Groot D, et al. Evaluation of the highly sensitive Roche thyroglobulin II assay and establishment of a reference limit for thyroglobulin-negative patient samples. Practical Laboratory Medicine. 2016;5:6-13.
- [48] Wayne PA. CLSI EP17-A : Protocols for determination of limits of detection and limits of quantification: approved guidelines. CLSI. 2012;2nd ed.



## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Profil de précision des méthodes Beckman Coulter et Cisbio Bioassays .....	20
<b>Figure 2</b> : Profil de précision des méthodes Roche et Siemens .....	20
<b>Figure 3</b> : Profil de précision de la méthode ThermoFischer SCIENTIFIC .....	20
<b>Figure 4</b> : Représentation des pourcentages de récupération en fonction des dilutions .....	21
<b>Figure 5</b> : Répartition des concentrations mesurées sur l'échantillon à 100 µg/L.....	24

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I</b> : Résultats de fidélité : laboratoires A à D .....	18
<b>Tableau II</b> : Résultats de fidélité : laboratoires E à H .....	18
<b>Tableau III</b> : Résultats d'homogénéité des variances .....	18
<b>Tableau IV</b> : Résultats de la SeF et de la LoD .....	19
<b>Tableau V</b> : Résultats de l'ET à 40 % .....	19
<b>Tableau VI</b> : Résultats des rapports des concentrations observées/attendues .....	22
<b>Tableau VII</b> : Équations des droites de régression et intervalles de confiance de l'ordonnée à l'origine .....	22
<b>Tableau VIII</b> : Résultats du biais de justesse .....	23
<b>Tableau IX</b> : Biais d'exactitude à 100 µg/L .....	24

# TABLE DES MATIÈRES

<b>PLAN .....</b>	<b>1</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>3</b>
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>10</b>
<b>1. Méthodes de dosage et laboratoires .....</b>	<b>10</b>
<b>2. Performances évaluées .....</b>	<b>11</b>
2.1. Fidélité : répétabilité et fidélité intermédiaire .....	11
2.2. Linéarité .....	13
2.3. Limite de détection .....	14
2.4. Justesse .....	14
2.5. Erreur totale, limite de quantification et sensibilité fonctionnelle .....	15
2.6. Exactitude .....	15
<b>3. Préparation et conservation des échantillons .....</b>	<b>15</b>
3.1. Préparation de la solution « mère » .....	16
3.2. Préparation des échantillons destinés à l'évaluation .....	16
<b>4. Analyse statistique des données .....</b>	<b>16</b>
<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>17</b>
<b>1. Fidélité .....</b>	<b>17</b>
<b>2. SeF, LoD et ET .....</b>	<b>19</b>
<b>3. Linéarité .....</b>	<b>21</b>
<b>4. Justesse.....</b>	<b>23</b>
<b>5. Exactitude.....</b>	<b>24</b>
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>25</b>
<b>1. Contexte .....</b>	<b>25</b>
<b>2. Justification des choix du protocole .....</b>	<b>25</b>
<b>3. Comparaison aux performances fournisseurs.....</b>	<b>28</b>
<b>4. Proposition de seuil décisionnel .....</b>	<b>30</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>32</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>33</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>39</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>40</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>41</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>I</b>
<b>1. Caractéristiques et performances sériques des trousses de dosage évaluéesI</b>	<b></b>

# ANNEXES

## 1. Caractéristiques et performances sériques des trousse de dosage évaluées

Méthode		Access® Tg		THYRO		Elecsys® Tg II		IMMULITE® 2000 Thyroglobulin		B·R·A·H·M·S hTG sensitive KRYPTOR	
Fournisseur		Beckman Coulter		Cisbio Bioassays		Roche		Siemens		ThermoFischer SCIENTIFIC	
Technique		ICEMA		IRMA		ECLIA		ICMA		TRACE®	
		Automatisée		Manuelle		Automatisée		Automatisée		Automatisée	
Génération		2ème génération		1ère génération		2ème génération		1ère génération		2ème génération	
Anticorps		Mélange Ac monoclonaux		Mélange Ac monoclonaux		Ac monoclonal		Ac monoclonal + Ac polyclonal		Mélange Ac monoclonaux + Ac polyclonal	
Marqueur		Enzymatique avec substrat luminogène		Radioactif		Luminescent		Luminescent		Fluorescent	
Sensibilité fonctionnelle SeF		0,1 [F] <sup>a</sup> 0,05 <sup>a</sup> 0,06 <sup>e</sup> 0,0313-0,0625 <sup>i</sup>		0,7 [F]		0,09 [F] 0.04 (CV 10%) <sup>d</sup> 0,07 <sup>j</sup>		0,9 [F] 0,36 <sup>h</sup>		0,15 [F] 0,072 <sup>j</sup>	
Limite de détection LoD		0,1 [F] 0,01 <sup>c</sup> 0,02 <sup>e</sup> 0,065 <sup>f</sup>		0,2 [F]		0,04 [F] <sup>d</sup>		0,2 [F] 0,14-0,16 <sup>h</sup>		0,09 [F]	
Limite de quantification LoQ		0,02-0,06 <sup>e</sup>		-		0,1 [F] <sup>a</sup>		-		0,17 [F]	
Domaine de mesure		0,1-500 [F]		0,7-500 [F]		0,04-500 [F]		0,2-300 [F]		0,09 – 200 [F]	
CV (%)		CV <sub>r</sub> (M)	CV <sub>FI</sub> (M)	CV <sub>r</sub> (M)	CV <sub>FI</sub> (M)	CV <sub>r</sub> (M)	CV <sub>FI</sub> (M)	CV <sub>r</sub> (M)	CV <sub>FI</sub> (M)	CV <sub>r</sub> (M)	CV <sub>FI</sub> (M)
Concentration cible (µg/L)	0,125	2,7 <sup>c</sup> (0,18) 6,6 <sup>e</sup> (0,12) 6,9 <sup>i</sup> (0,114)	14,4 <sup>c</sup> (0,14) 9,1 <sup>e</sup> (0,11)	-	-	-	8,15 <sup>d</sup> (0,08) 6 <sup>j</sup> (0,137)	-	32 <sup>h</sup> (0,16)	-	13-16 <sup>j</sup> (0,106- 0,143)
	0,25	3,9 <sup>e</sup> (0,2) 5,6 <sup>i</sup> (0,209)	13,8 <sup>c</sup> (0,31) 7,4 <sup>e</sup> (0,21)	-	-	4,8 (F) (0,289)	5,9 [F] (0,289) < 5,5 <sup>b</sup> (0,28-77) 3,89 <sup>d</sup> (0,22) 3,5 <sup>j</sup> (0,265)	-	24 <sup>h</sup> (0,25)	< 20 [F] (0,15- 0,3)	< 20 [F] (0,15-0,3) 14 <sup>i</sup> (0,198)
	0,5	1,5 <sup>c</sup> (0,56) 6,7 <sup>i</sup> (0,504)	11,3 <sup>c</sup> (0,65)	6,6-7 [F] (0,69- 0,73)	-	-	< 5,5 <sup>b</sup> (0,28-77) 3,67 <sup>d</sup> (0,47) 2,5 <sup>k</sup> (0,73)	-	13,8 <sup>h</sup> (0,58)	< 10 [F] (0,3-0,5)	6 <sup>j</sup> (0,66) < 10 [F] (0,3-0,5)
	1	2 <sup>c</sup> (0,75) 4,6 <sup>i</sup> (0,878)	9,6 <sup>c</sup> (0,93) 6,2 <sup>e</sup> (0,78)	-	12,1-14,6 [F] (0,92-0,95)	2,5 (F) (1,10)	4,5 [F] (1,10) < 5,5 <sup>b</sup> (0,28-77) 2,8 <sup>d</sup> (0,96) 3,6 <sup>j</sup> (0,746) 2,5 <sup>k</sup> (0,73-2,4)	-	9 <sup>g</sup> (0,84) 9,8 <sup>h</sup> (0,92)	< 7 [F] (0,5-1)	< 6 [F] (0,5-1)
	5	1,4 [F] (4,2-21,6)	2,2-2,3 [F] (4,2-21,6)	2,6-3,7 [F] (3,9-5,2)	4,9-8,6 [F] (3,4-3,9)	-	< 5,5 <sup>b</sup> (0,28-77)	-	-	< 3 [F] (1-200)	< 6 [F] (1-200)
	10	1,4 [F] (4,2-21,6)	2,2-2,3 [F] (4,2-21,6) 6,7 <sup>c</sup> (9,6)	-	-	-	< 5,5 <sup>b</sup> (0,28-77)	4,8 [F] (10)	5,6 [F] (10) 8,1 <sup>g</sup> (9,8)	< 3 [F] (1-200)	< 6 [F] (1-200)

<sup>a</sup>[32] ; <sup>b</sup>[38] ; <sup>c</sup>[39] ; <sup>d</sup>[40] ; <sup>e</sup>[41] ; <sup>f</sup>[42] ; <sup>g</sup>[43] ; <sup>h</sup>[44] ; <sup>i</sup>[45] ; <sup>j</sup>[46] ; <sup>k</sup>[47] ; [F] = Donnée fournisseur ; ICEMA = ImmunoChemiluminoEnzymoMetric Assay ; IRMA = ImmunoRadioMetric Assay ; ECLIA = Electrochimiluminescence ImmunoAssay ; ICMA = Immuno ChemiluminoMetric Assay ; TRACE® = Time Resolved Amplified Cryptate Emission ; CV = Coefficient de Variation ; CV<sub>r</sub> = CV de répétabilité ; CV<sub>FI</sub> = CV de fidélité intermédiaire ; M = Concentration moyenne en µg/L



## Validation de méthodes de dosage de la thyroglobuline dans les liquides de rinçage des aiguilles de cytoponction dans le cadre des carcinomes différenciés de la thyroïde – Etude multicentrique

### RÉSUMÉ

**Introduction :** Dans le cadre du suivi d'un cancer thyroïdien différencié, l'association d'un dosage de thyroglobuline *in situ* (TgIS) est aujourd'hui recommandée lors de toute cytoponction échoguidée d'adénopathie suspecte de métastase. Ce dosage de thyroglobuline, réalisé sur le liquide de rinçage de l'aiguille fine de cytoponction, est effectué actuellement à l'aide de trousses de dosage qui n'ont pas été validées par les fournisseurs dans cette indication sur cette matrice non sérique. Il est donc de la responsabilité du laboratoire effectuant ce dosage d'étudier et de valider les performances analytiques de la trousse utilisée dans les conditions retenues.

**Matériel et Méthodes :** Cinq trousses de dosage de la thyroglobuline parmi les plus utilisées en France ont été choisies pour une validation de méthode réalisée dans un ou deux laboratoires (Access®Tg, Beckman Coulter ; THYRO, Cisbio Bioassays ; Elecsys®Tg II, Roche ; IMMULITE®2000 Thyroglobulin, Siemens ; B-R-A-H-M-S hTg sensitive KRYPTOR, ThermoFischer SCIENTIFIC). Cette étude multicentrique a ainsi réuni huit laboratoires qui ont évalué, selon un protocole commun et sur un même tampon de dosage contenant un matériau de référence (CRM 457, Sigma-Aldrich), les performances analytiques suivantes : fidélité, sensibilité fonctionnelle (SeF), limite de détection (LoD), limite de quantification (LoQ), limites de linéarité, justesse et exactitude.

**Résultats :** Les coefficients de variation de fidélité intermédiaire s'échelonnaient de 2,1 à 29,4 % pour des concentrations de CRM comprises entre 0,125 et 10 µg/L. Les SeF, LoD et LoQ ont respectivement été estimées entre une valeur ≤0,14 et 1,2 µg/L, une valeur ≤0,04 et 0,35 µg/L et entre 0,3 et 3,4 µg/L. Les pourcentages de récupération pour des dilutions jusqu'à 1/800 étaient tous compris entre 80 et 120 % sur l'intervalle de mesure entre la SeF et 100 µg/L. Pour une concentration de CRM de 1 et 10 µg/L, les différentes méthodes ont fourni respectivement des résultats entre 0,81 et 1,3 µg/L (biais de -19 % à 26,2 %) et entre 9,7 et 12,3 µg/L (biais de -2,7 % à 23,4 %). Le biais d'exactitude à 100 µg/L allait jusqu'à 30 %.

**Conclusion :** Les performances en termes de fidélité intermédiaire et de SeF sont globalement comparables à celles des fournisseurs et celles rapportées dans la littérature sur matrice sérique. Elles sont par ailleurs similaires lorsqu'elles ont été évaluées par deux laboratoires. L'évaluation de l'erreur totale nous permet de proposer des seuils décisionnels entre 0,3 et 1,2 µg/L, adaptés à chaque méthode, et qui nécessiteront d'être validés en pratique clinique afin d'en évaluer la pertinence.

**Mots-clés :** thyroglobuline / liquide de rinçage / cytoponction / validation de méthode / cancer thyroïdien différencié

## Analytical validation of five thyroglobulin assays used for FNA-Tg in differentiated thyroid carcinomas – A multicentric study

### ABSTRACT

**Introduction :** During the follow-up of differentiated thyroid carcinoma, measurement of thyroglobulin in fine-needle aspiration (FNA-Tg) is recommended in association with cytology for every suspicious cervical lymph node. It is currently performed on washout fluid with thyroglobulin assays that are not validated by manufacturers on non-seric samples. It is therefore the responsibility of the laboratory performing this assay to study and validate analytical performances of the assay kit in selected analytical conditions.

**Material and Methods :** Five of the most used thyroglobulin assay kits in France were chosen for analytical validation performed in one or two laboratories (Access®Tg, Beckman Coulter ; THYRO, Cisbio Bioassays ; Elecsys®Tg II, Roche ; IMMULITE®2000 Thyroglobulin, Siemens ; B-R-A-H-M-S hTg sensitive KRYPTOR, ThermoFischer SCIENTIFIC). This multicentric study brought together eight laboratories that evaluated, according to a common protocol and on the same assay buffer containing a reference material (CRM 457, Sigma-Aldrich), the following analytical performances : precision, functional sensitivity (FS), limit of detection (LoD), limit of quantitation (LoQ), linearity, trueness and accuracy.

**Results :** The between-run coefficient of variation varied from 2,1 to 29,4 % for CRM concentrations between 0,125 and 10 µg/L. The FS, LoD and LoQ were respectively from ≤0,14 to 1,2 µg/L, ≤0,04 to 0,35 µg/L and 0,3 to 3,4 µg/L. The recovery percentages for dilutions up to 1:800 were all between 80 and 120 % considering the interval between FS and 100 µg/L. For CRM concentrations at 1 and 10 µg/L, results were respectively between 0,81 and 1,3 µg/L (trueness : -19 % to 26,2 %) and between 9,7 and 12,3 µg/L (trueness : -2,7 to 23,4 %). Bias at 100 µg/L of CRM was up to 30 %.

**Conclusion :** The performances are globally comparable to those reported on serum by manufacturer's claims and in the literature. They are otherwise similar when they have been evaluated by two laboratories. The study of the total error makes it possible to propose decision thresholds between 0,3 and 1,2 µg/L, appropriate for each assay, that will need to be validated in a clinical study in order to evaluate their relevance.

**Keywords :** thyroglobulin / washout fluid / FNA-Tg / analytical validation / differentiated thyroid cancer