

# Etablissement de valeurs de référence pour les paramètres évalués dans le dossier de validation de méthode des analyses d'immunophénotypages par CMF

**Chantal Brouzes** Necker,  
**Françoise Durrieu** Bordeaux,  
**Claude Lambert**, Saint Etienne,  
**Michel Ticchioni** Nice.

La thématique de la section Santé humaine définie en Domaines/Familles/Sous-domaines/Sous-familles s'organise de la manière suivante :



DOMAINE	FAMILLE	SOUS-DOMAINE	SOUS-FAMILLE
BIOLOGIE MEDICALE	BIOCHIMIE-GENETIQUE	BIOCHIMIE	Biochimie générale et spécialisée (BIOCHBM) Pharmacologie-Toxicologie (PHARMACOSTPBM – TOXICOBM) Radiotoxicologie (RADIOTOX)
		GENETIQUE	Génétique constitutionnelle (GENMOLBM) Génétique somatique (GENMOLBM) Dosimétrie biologique (DOSBIO) ←
	HEMATOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION	HEMATOLOGIE	Hématocytologie (HEMATOIBM) Hémostase (COAGIBM) Immuno-hématologie (IMMUNOHEMATOIBM)
		IMMUNOLOGIE	Auto-immunité (AUTOIMMUNOIBM) Allergie (ALLERIBM) ← Immunologie cellulaire spécialisée et histocompatibilité (groupage HLA; ICELHISTOIBM)
		BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION	Spermiologie diagnostique (SPERMIOIBM) Activités biologiques d'AMP (AMPBIOIBM)
MICROBIOLOGIE	MICROBIOLOGIE	Sérologie infectieuse (ISEROIBM) Bactériologie (BACTH) Parasitologie – Mycologie (PARASITOMYCO) Virologie (VIROH) Agents transmissibles non conventionnels (ATNCIBM)	
LIEUX DE TRAVAIL - BIOLOGIE MEDICALE	<i>/ [pas de famille]</i>	VALEURS LIMITES BIOLOGIQUES	Pharmacologie-Toxicologie (PHARMACOSTPBM – TOXICOBM)
	<i>/ [pas de famille]</i>	DOSIMETRIE DES TRAVAILLEURS	Radiotoxicologie (RADIOTOX)

# Ex de portées d'accréditation en CMF

Code	Nature de l'échantillon biologique	Nature de l'examen/analyse	Principe de la méthode	Référence de la méthode	Remarques (Limitations, paramètres critiques, ...)
HB6	Échantillons biologiques d'origine humaine	Phénotypage hématocytologique Etude des sous-populations lymphocytaires, plaquettes, (test à la mépacrine), détection et quantification de marqueurs/glycoprotéines cellulaires et plaquettaires (CD3, CD4, CD5, CD8, CD16, CD19, CD34, CD45, CD56, ...), phénotypage de l'HPN	Méthode de type qualitatif et quantitatif Principe général des techniques : - Cytométrie en flux, après marquage, - Immunofluorescence - Test de sensibilité des globules au complément	Méthodes reconnues, adaptées ou développées (B)	Hémopathies chroniques et aiguës Phénotypage des sous-populations lymphocytaires
HB6	Échantillons biologiques d'origine humaine	Phénotypage hématocytologique Etude des sous-populations lymphocytaires, plaquettes, (test à la mépacrine), détection et quantification de marqueurs/glycoprotéines cellulaires et plaquettaires (CD3, CD4, CD5, CD8, CD16, CD19, CD34, CD45, CD56, ...), phénotypage de l'HPN	Méthode de type qualitatif et quantitatif Principe général des techniques : - Cytométrie en flux, après marquage, - Immunofluorescence - Test de sensibilité des globules au complément	Méthodes reconnues (A)	Numération CD34 Numération 3,4, 8

# Le dossier de validation de méthode : SH FORM 43



## Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

Note : le laboratoire se référera au tableau du § 9 du document Cofrac SH GTA 04 rev. 01 pour connaître les paramètres à déterminer dans le cadre d'une vérification sur site (portée A) ou d'une validation (portée B) et complètera une fiche par examen de biologie médicale



EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE	
Identification du paramètre (comme identifié dans la liste détaillée des examens) : .....	
Processus simple <input type="checkbox"/> ; Processus complexe <input type="checkbox"/> (nombre de sous-processus : ...)	

DESCRIPTION DU PROCESSUS		
Sous-processus 1	Éléments à vérifier (argumentation)	Modalités de vérification/validation <sup>1</sup> : <input type="checkbox"/> 1. Répétabilité <input type="checkbox"/> 2. Fidélité intermédiaire <input type="checkbox"/> 3. Variabilité inter-opérateurs <input type="checkbox"/> 4. Justesse <input type="checkbox"/> 5. Exactitude <input type="checkbox"/> 6. Sensibilité et spécificité analytique <input type="checkbox"/> 7. Incertitudes <input type="checkbox"/> 8. Etendue de mesure <input type="checkbox"/> 9. Comparaison de méthodes <input type="checkbox"/> 10. Interférences <input type="checkbox"/> 11. Contamination <input type="checkbox"/> 12. Robustesse et fiabilité des réactifs <input type="checkbox"/> 13. Intervalle de référence
Sous-processus 2	Éléments à vérifier (argumentation)	Modalités de vérification/validation : <input type="checkbox"/> 1. Répétabilité <input type="checkbox"/> 2. Fidélité intermédiaire <input type="checkbox"/> 3. Variabilité inter-opérateurs <input type="checkbox"/> 4. Justesse <input type="checkbox"/> 5. Exactitude <input type="checkbox"/> 6. Sensibilité et spécificité analytique <input type="checkbox"/> 7. Incertitudes <input type="checkbox"/> 8. Etendue de mesure <input type="checkbox"/> 9. Comparaison de méthodes <input type="checkbox"/> 10. Interférences <input type="checkbox"/> 11. Contamination <input type="checkbox"/> 12. Robustesse et fiabilité des réactifs <input type="checkbox"/> 13. Intervalle de référence
Sous-processus ...		

# Quelques consensus sur le dossier de validation de méthode

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE		
<p><b>Exploration par cytométrie en flux des cellules hématopoïétiques pour l'étude des hémopathies et des désordres de l'immunité /</b>  <b>Numération des sous-populations lymphocytaires T CD3, T CD4, T CD8, B et NK /</b>  <b>numération des progéniteurs hématopoïétiques CD34+</b></p>		
<p>Processus simple <input checked="" type="checkbox"/> Processus complexe <input type="checkbox"/> (nombre de sous-processus :...)</p>		
DESCRIPTION DU PROCESSUS		
	Éléments à vérifier (argumentation)	<p>Modalités de vérification/validation :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li><input checked="" type="checkbox"/> 1. Répétabilité (E)</li> <li><input checked="" type="checkbox"/> 2. Fidélité intermédiaire (E)</li> <li><input checked="" type="checkbox"/> 3. Variabilité inter-opérateurs (E)</li> <li><input checked="" type="checkbox"/> 4. Justesse (E)</li> <li><input checked="" type="checkbox"/> 5. Exactitude (E)</li> <li><input type="checkbox"/> 6. Sensibilité et spécificité analytique (N/A)</li> <li><input type="checkbox"/> 7. Incertitudes (N/A)</li> <li><input type="checkbox"/> 8. Etendue de mesure (N/A)</li> <li><input checked="" type="checkbox"/> 9. Comparaison de méthodes (E)</li> <li><input checked="" type="checkbox"/> 10. Interférences (B)</li> <li><input checked="" type="checkbox"/> 11. Contamination (E)</li> <li><input checked="" type="checkbox"/> 12. Robustesse et fiabilité des réactifs (E/B)</li> <li><input type="checkbox"/> 13. Intervalle de référence (N/A)</li> </ul>

Les différents items à vérifier s'appliqueront :

- soit au versant quantitatif de l'analyse : quantification des % des sous-populations (répétabilité, reproductibilité, justesse, exactitude, comparaison de méthode).
- soit au versant qualitatif de l'analyse : analyse des graphes et interprétation médicale de l'analyse (variabilité de l'interprétation inter opérateur). Ce versant qualitatif est décrit dans le chapitre analyse des risques.

# Quelques consensus sur le dossier de validation de méthode

---

- 1 dossier par examen/type d'examen
  - Immunophénotypages spécialisés (leucémies, lymphomes, déficits immunitaires) : 1 seul dossier de méthode **qualitative**.
  - Numération des lymphocytes CD3/CD4CD8, numération CD34 : 1 dossier pour chaque examen de méthode **quantitative**
  - Évènements rares : 1 seul dossier de méthode **quantitative**

## Quelques consensus sur le dossier de validation de méthode

---

- L'ensemble des immunophénotypages spécialisés, y compris MRD, (leucémies, lymphomes, déficits immunitaires...) est en **portée B**.
- La numération des lymphocytes ou des cellules souches hématopoïétiques (CSH) peut être en **portée A**, mais sous réserve de respecter strictement et sans aucune modification les conditions souvent restrictives de réalisation du fournisseur, y compris les stratégies d'analyse.

# Quelques consensus sur le dossier de validation de méthode

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte / Mesurande :	Epitopes cellulaires/ mesure de la fluorescence.
Principe de la Méthode :	Détection d'un signal lumineux par cytométrie de flux après marquage cellulaire
Type d'échantillon primaire :	<u>Cellules en suspension provenant de sang ou de moelle, de tissu, de liquide biologique (LCR, liquide pleural, liquide d'ascite, liquide de lavage broncho-alvéolaire).</u>
Type de récipient, additifs :	EDTA (Sang, moelle), RPMI (ganglion, biopsie de tissu), liquides biologiques (LCR, liquide pleural, ascite ou autres...) sur tube sec.
Prétraitement de l'échantillon :	Lyse des érythrocytes, mise en suspension.
Unités :	Pourcentage (%) et unités arbitraires (MFI)
Critères d'interprétation :	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pour les sous-populations lymphocytaires normales : Comans-Bitter WM, Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations in peripheral blood. J.Pediatr 1997 :130 :388.</li> <li>- Sans objet pour les hémopathies malignes</li> </ul>
Marquage CE (Oui/Non) :	Oui pour le cytomètre Oui pour certains réactifs
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	NA pour les hémopathies / TYL pour la numération lymphocytaire
Equipement (instrument, analyseur, etc.) :	Cytomètre de flux BD Biosciences FACS Canto II
Référence du réactif :	Cf. Notices techniques des réactifs utilisés
Matériau d'étalonnage (références) :	BD™ Cytometer Setup & Tracking Beads Kit (CST, reference 642412), Rainbow Fluorescence Particles (reference 559123). Protocole France Flow de standardisation
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	Passage quotidien : <ul style="list-style-type: none"> <li>- des billes CST (vérification du bon fonctionnement de l'automate, de la standardisation et de la qualité de l'alignement des lasers)</li> <li>- des billes Rainbow (vérification de la matrice)</li> </ul>

# Evaluation des performances de la méthode répétabilité, reproductibilité, biais : stratégie, valeurs retenues ?



## Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

### EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

Préciser le type et référence d'échantillon (échantillon contrôle, pool de sérum, ...): .....



REPETABILITE							
Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source <sup>4</sup> )	Conclusion <sup>5</sup>
Type de matrice (plasma, sérum, CIQ, niveaux...)							

Argumentaire de la conclusion :

FIDELITE INTERMEDIAIRE							
Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source <sup>4</sup> )	Conclusion <sup>5</sup>
Type de matrice (plasma, sérum, CIQ, niveaux...)							

Argumentaire de la conclusion :

# Evaluation des performances de la méthode répétabilité, reproductibilité, biais : stratégie, valeurs retenues ?

## Déterminer une stratégie commune :

- Combien de passages à effectuer ?
- Quel type d'échantillons tester ?
- Quels paramètres évaluer ?
- Quelle valeur de référence retenir ?

## 1-Nombre de passages à effectuer :

### ☐ Que dit le Cofrac ?

- ♦ Le nombre de détermination à prévoir dépend de la cadence de l'analyseur à valider, du coût des réactifs.
- ♦ En général, l'effectif est de 30 pour une interprétation statistique optimale. Un nombre d'essais inférieur devra être argumenté en fonction de critères pertinents (rareté de la matrice, coûts des analyses, durée d'analyse, ...).
- ♦ La valeur statistique des résultats obtenus sera d'autant plus réduite que ces effectifs seront faibles (les calculs et tests employés devront tenir compte de ces effectifs).

### ☐ Littérature, groupes de travail

#### ✓ Répétabilité

- ♦ Littérature : Davis BH, Mc Laren CE, Cytometry B Clin Cytom. 2013 ;84, (5) : 329-337 : 5 passages
- ♦ Groupe FranceFlow (pour les hémopathies) : accord sur 5 passages
- ♦ Groupe AFC (pour la numération lymphocytaire) : 5 passages

#### ✓ Fidélité intermédiaire ?

- ♦ Groupe FranceFlow : entre 5 et 15
- ♦ Groupe AFC : passage quotidien pendant 1 mois

# Evaluation des performances de la méthode- Répétabilité, Reproductibilité, Biais : stratégie, valeurs retenues ?

## 2-Quel type d'échantillon choisir ?

- ♦ Du sang et rien que du sang (ne pas utiliser de la moelle, LCR... et ne pas faire un dossier par type d'échantillon primaire)
- ♦ Sang stabilisé (stable dans le temps et le plus facile à utiliser si on travaille en groupe)
- ♦ Sang frais (images plus belles et plus proche de la réalité mais logistique lourde si groupe et impossible pour la fidélité intermédiaire)
- ♦ Echantillon pathologique (fait un très bon effet auprès de l'évaluateur mais logistique importante si groupe)

# Evaluation des performances de la méthode répétabilité, reproductibilité, biais : stratégie, valeurs retenues ?

## Question 3 : que va-t-on retenir comme paramètre critique ?

- ◆ Des paramètres précisément dits critiques mais aisément « fenêtrables » et sur des populations cellulaires facilement accessibles.
- ◆ Par exemple en hématologie : s'intéresser aux lymphocytes, monocytes... mais pas aux blastes (car plus difficiles à utiliser pour le dossier)
  - pourcentage des lymphocytes (définis par la combinaison taille/structure/CD45/singulets) ;
  - au sein des lymphocytes : pourcentage des lymphocytes B (CD19+, CD3- et CD20+, CD3-) ; lymphocytes T (CD3+, CD19-) ;
  - au sein des lymphocytes T pourcentage d'expression de CD4, CD8, CD27 ;
  - Au sein des monocytes (définis par la combinaison taille/structure/CD45/singulets), la population CD14+
- ◆ Pour la numération lymphocytaire : pourcentage et/ou valeurs absolues des différentes populations

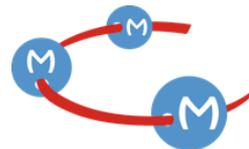
# Evaluation des performances de la méthode répétabilité, reproductibilité, biais : stratégie, valeurs retenues ?

## 4-Quelle valeur de « référence » choisir (le CV retenu par le laboratoire) ?

- ◆ Pas de sang étalon ni de valeur de référence proposées par une société savante
- ◆ Constitution d'un groupe de pairs : calcul du CV et DS du groupe pour un paramètre donné
- ◆ Le but : être dans la moyenne du groupe étendue à 1, 2, 3 DS...

## Méthodologie

- ◆ Groupe FranceFlow :
  - Un (ou deux) coordonne(nt) les envois et centralise(nt) les données
  - Le même échantillon : sang stabilisé de préférence mais sang frais possible
  - Le même marquage avec les mêmes anticorps aux mêmes concentrations technique en même temps (mais pas indispensable si on utilise un sang stabilisé)



# Etablissement des valeurs de référence pour les panels de diagnostic d'hémopathie maligne : exemple de répétabilité sur sang stabilisé (FF, QC5)

- ❖ Sang stabilisé de même lot, distribué à tous les participants, Ac distribués également
- ❖ 5 passages
- ❖ Calcul des paramètres du groupe (moyenne, écart type, CV) et considérant qu'il s'agit d'un groupe expert, ces valeurs reflètent l'état de l'art
- ❖ Le CV retenu : moyenne des CV de chaque automate de chaque laboratoire participant (QC5 du groupe FF (11 automates/11 Centres)) + 2 x déviation standard.
- ❖ Limite : taille et une certaine homogénéité dans le groupe

Fluorochrome	V500	V450	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PECy7	APC	APC-H7
Ac	CD45	CD20	CD8	CD27	CD4	CD19	CD14	CD3
Clone utilisé	HI30	L27	SK1	M-T271	SK3	SJ25C1	MOP9	SK7
Lot	2209544	2339574	2303836	30102	2278537	2338978	2289865	2339695
Quantité (µl)	3	3	10	10	10	5	3	3

Paramètres	Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire <sup>4</sup>	Conclusion
CD45/Lympho	Multicheck	5	97,30	0,08	0,08	Non fourni	0,48	conforme
CD3/Lympho	Multicheck	5	74,15	0,30	0,41	Non fourni	1,89	conforme
CD8/CD3	Multicheck	5	20,48	0,34	1,65	Non fourni	4,61	conforme
CD4/CD3	Multicheck	5	49,57	0,27	0,55	Non fourni	2,83	conforme
CD27/CD3	Multicheck	5	61,02	0,41	0,67	Non fourni	1,99	conforme
CD19/Lympho	Multicheck	5	14,26	0,63	4,43	Non fourni	6,75	conforme
CD20/Lympho	Multicheck	5	14,86	0,62	4,14	Non fourni	6,85	conforme
CD14/Mono	Multicheck	5	94,62	0,68	0,72	Non fourni	1,62	conforme

# Etablissement des valeurs de référence pour les panels de diagnostic d'hémopathie maligne : ex de répétabilité sur sang pathologique (LLC, FF, QC7)

- ❖ Sang pathologique, distribué à tous les participants, passé sur Lyotube commun
- ❖ Calcul des paramètres du groupe (moyenne, écart type, CV) et considérant qu'il s'agit d'un groupe expert, ces valeurs reflètent l'état de l'art
- ❖ Le CV retenu : moyenne des CV par automate (calculée à partir de 5 passages) de chaque laboratoire participant ( 23 automates/19Centres)) + 2 x déviation standard.
- ❖ Limite : taille et une certaine homogénéité dans le groupe

Paramètres	Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) retenu par le laboratoire <sup>4</sup>	Conclusion
Lymphos	Sang	5	69,52	2,6	3,13	5,20	conforme
PN Neutrophiles	Sang	5	24,68	2,39	9,67	17,15	conforme
Lymphos B	Sang	5	82,38	1,12	1,36	3,34	conforme
Lymphos NK	Sang	5	6,42	0,56	8,70	12,61	conforme
Lymphos T	Sang	5	11,08	0,53	4,79	9,20	conforme
Lymphos B CD5+	Sang	5	98,12	0,11	0,11	0,70	conforme
Lymphos B CD20+	Sang	5	96,94	0,27	0,28	1,49	conforme
Lymphos B Kappa +	Sang	5	99,46	0,13	0,13	1,07	conforme
Lymphos B Lambda +	Sang	5	1,6	0,89	55,9	NA	-
Lymphos T CD4+ CD8-	Sang	5	79,5	0,97	1,22	2,33	conforme
Lymphos T CD4- CD8+	Sang	5	16,16	0,63	3,88	10,89	conforme
Lymphos T C5+	Sang	5	99,36	0,05	0,06	0,80	conforme
Lymphos T CD56+	Sang	5	4,26	0,23	5,40	26,88	conforme

# Etablissement des valeurs de référence pour les panels de diagnostic d'hémopathie maligne : un exemple de fidélité intermédiaire sur sang stabilisé (FF, QC6)

- ♦ sang stabilisé (Multicheck lot BM133N) envoyé à tous les participants
- ♦ 1 marquage tous les jours pendant 15 jours avec différents opérateurs
- ♦ CV retenu : moyenne des CV par automate (calculée à partir des 15 passages) de chaque laboratoire participant au QC6 du groupe FF (22 automates/16 Centres) + 2 x déviation standard.

Paramètre	Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) retenu par le laboratoire <sup>4</sup>	Conclusion
CD45/Lympho	Multicheck	15	98,43	2,39	2,42	4,33	conforme
CD3/Lympho	Multicheck	15	76,39	0,52	0,69	4,29	conforme
CD3+CD4+/Lympho	Multicheck	15	51,11	0,51	0,99	4,38	conforme
CD3+CD8+/Lympho	Multicheck	15	19,97	0,49	2,44	5,26	conforme
CD19/Lympho	Multicheck	15	14,15	0,35	2,46	9,70	conforme
CD20/Lympho	Multicheck	15	12,87	0,47	3,64	8,48	conforme
CD45+CD14-/Lympho	Multicheck	15	92,71	1,58	1,71	3,73	conforme
CD45+CD14+/Mono	Multicheck	15	99,73	0,32	0,32	5,37	conforme
CD3+CD27+/Lympho	Multicheck	15	63,19	1,10	1,75	5,93	conforme

# Evaluation des performances de la méthode répétabilité, reproductibilité, biais : stratégie, valeurs retenues ?

4-Quelle valeur de « référence » choisir (le CV retenu par le laboratoire) ?

- ◆ Pas de sang étalon ni de valeur de référence proposées par une société savante
- ◆ Constitution d'un groupe de pairs : calcul du CV et DS du groupe pour un paramètre donné
- ◆ Le but : être dans la moyenne du groupe étendue à 1, 2, 3 DS...

**Méthodologie** : Recherche d'un CV de « référence » pour la numération lymphocytaire

- Reflet de la vraie vie
- Avec participation du plus grand nombre de laboratoires
- Le plus simple et le moins onéreux possible



**Groupe Accréditation**  
(C. Brouzes ; F. Durrieu ; C. Lambert ; M. Ticchioni)

# Numération lymphocytaire , valeurs de référence?

- ◆ Contact ANSM - Direction des Affaires Juridiques et Réglementaires (Mme Guyard ; M. Da Silva)

Liste des laboratoires inscrits et participant aux EEQ en 2016  
137 laboratoires (siège social)

- ◆ 131 laboratoires qui font de la numération lymphocytaire par cytométrie en flux ont été contactés

- ◆ 64 laboratoires ont répondu (87 machines)

- ◆ Recueil des données de :

➤ répétabilité (5 passages) sur les CIQ (hauts et bas) utilisés habituellement

➤ fidélité intermédiaire (passage quotidien pendant 1 mois) :

Calcul et envoi par chaque laboratoire du CV pour les différents paramètres :  
3/4/8/19/NK en pourcentage et valeurs absolues

**Inconvénients : groupe peu homogène**

- CIQ différents CIQ (Multicheck, StatusFlow, Immunotrol...)
- Automates différents
- Méthodes différentes

**Avantages :**

- Facile à organiser
- Peu onéreux  
(les laboratoires ont déjà leur propre CIQ)

# Numération lymphocytaire , valeurs de référence?

Nb centers	64	
Nb instruments	87	
FACSCanto II™	37	
FACSCanto A™	4	
Facscout™	1	
Calibur™	1	
Navios™	23	
FC500™	14	
Aquios™	7	
Absolut count system		
Flowcount™	20	
Trucont™	23	
Double plateforme	7	
Fastcount™	1	
Volumétrie	2	
NR	15	
Quality controls		
Multicheck™	12	
CD Chex plus™	1	
Immunotro™	28	
Status Flow™	26	
NR	1	

# Numération lymphocytaire , valeurs de référence?

Calcul :

- de la moyenne robuste des CV,
- de l' écart type robuste des CV

Méthode Algo A utilisé par les organismes organisant des CIL

Adeline Morisot du Département de Santé Publique à Nice

Agathe Deblquis du laboratoire d'hématologie à Mulhouse

- du CV90 : CV maximal de 90% des valeurs c'est-à-dire que 90% des laboratoires ont un  $CV \leq CV90$
- du CVmax = CV moyen robuste plus 3 déviations standards robustes

# Numération lymphocytaire , valeurs de référence?

## Résultats répétabilité – Valeurs absolues

CIQ bas (tous les laboratoires)

CIQ Bas	n	Nbre passages	Valeurs absolues	CV (Moyenne robuste)	DS robuste	CV max (z=3)	CV90	z>3
CD3	45	5	607.16	2.81	1.12	6.19	5.48	1/45
CD4	45	5	136.43	4.70	1.97	10.62	7.63	0/45
CD8	45	5	420.71	3.29	1.16	6.78	5.48	1/45
CD19	31	5	232.68	4.18	1.29	8.05	7.09	2/31
NK	28	5	191.57	4.65	1.65	9.61	6.53	1/28

CIQ hauts (tous les laboratoires)

CIQ Haut (total)	n	Nbre passages	Valeurs absolues	CV (Moyenne robuste)	DS robuste	CV max (z=3)	CV90	z>3
CD3	55	5	921.47	2.88	1.46	7.26	4.72	2/55
CD4	56	5	607.89	3.18	1.40	7.39	5.48	2/56
CD8	56	5	284.91	4.06	1.35	8.12	5.92	2/56
CD19	44	5	186.37	4.67	1.67	9.68	6.97	1/44
NK	42	5	135.24	5.87	1.83	11.36	10.02	3/42

REPETABILITE							
Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source <sup>1</sup> )	Conclusion <sup>2</sup>
CD3 # 607.16						6.19	
CD3# 921.47						7.26	
CD4# 136.43						10.62	
CD4# 607.89						7.39	
CD8# 420.71						6.78	
CD8# 284.91						8.12	
CD19# 232.68						8.05	
CD19# 186.37						9.68	
NK# 191.57						9.61	
NK# 135.24						11.36	

# Numération lymphocytaire , valeurs de référence?

## Résultats répétabilité – Pourcentages

CIQ bas (tous les laboratoires) : pourcentages

CIQ Bas (total)	n	Nbre passages	pourcentages	CV (Moyenne robuste)	DS robuste	CV max (z=3)	CV90	z>3
CD3	47	5	57.99	1.35	0.61	3.16	2.14	1/47
CD4	48	5	14.21	3.77	1.39	7.96	6.30	0.48
CD8	48	5	40.13	2.01	0.68	4.05	2.83	3/48
CD19	36	5	22.18	2.82	1.03	5.91	4.30	1/36
NK	34	5	18.26	2.95	1.19	6.53	4.41	2/34

CIQ hauts (tous les laboratoires) : pourcentages

CIQ Haut (total)	n	Nbre passages	pourcentages	CV (Moyenne robuste)	DS robuste	CV max (z=3)	CV90	z>3
CD3	63	5	72.77	1.00	0.33	2.00	1.57	4/63
CD4	61	5	48.31	1.51	0.64	3.44	2.65	1/61
CD8	64	5	22.93	2.74	1.25	6.48	5.10	2/64
CD19	51	5	14.76	3.40	1.37	7.51	5.18	1/51
NK	50	5	10.38	4.78	1.92	10.55	7.91	1/50

# Numération lymphocytaire , valeurs de référence?

## Résultats reproductibilité – Valeurs absolues

CIQ bas (tous les laboratoires)

CIQ bas (total)	n	Nbre passages	Valeurs absolues	CV (Moyenne robuste)	DS robuste	CV max (z=3)	CV90	z>3
CD3	57	24.6	585.1	4.45	1.21	8.07	6.08	1/57
CD4	57	24.4	136.6	6.32	1.58	11.07	8.57	1/57
CD8	57	24.4	407.0	5.08	1.43	9.36	7.93	1/57
CD19	41	25.2	222.3	5.78	1.55	10.42	8.25	1/41
NK	39	24.4	185.9	6.63	1.72	11.78	8.82	2/39

CIQ hauts (tous les laboratoires)

CIQ Haut (total)	n	Nbre passages	Valeurs absolues	CV (Moyenne robuste)	DS robuste	CV max (z=3)	CV90	z>3
CD3	62	20.1	950.4	4.45	1.74	9.66	7.40	0/62
CD4	64	20	624.4	4.84	1.79	10.21	7.18	1/62
CD8	62	20	291.5	5.59	1.77	10.91	7.92	3/62
CD19	50	19.7	190.0	6.11	1.40	10.30	9.01	0/50
NK	48	18.7	139.2	7.57	2.19	14.15	11.60	0/48

# Numération lymphocytaire , valeurs de référence?

## Résultats reproductibilité – Pourcentage

CIQ bas (tous les laboratoires)

CIQ Bas (total)	n	Nbre passages	pourcentages	CV (Moyenne robuste)	DS robuste	CV max (z=3)	CV90	z>3
CD3	63	25.6	58.25	1.63	0.46	3.02	2.15	6/63
CD4	63	25.4	14.61	4.28	1.27	8.1	6.08	0/63
CD8	63	25.4	39.25	2.56	0.72	4.73	3.74	3/63
CD19	48	24.7	21.78	3.37	0.88	6.02	4.47	3/48
NK	46	23.9	18.12	4.19	1.43	8.47	6.48	2/46

CIQ hauts (tous les laboratoires)

CIQ Bas (total)	n	Nbre passages	pourcentages	CV (Moyenne robuste)	DS robuste	CV max (z=3)	CV90	z>3
CD3	63	25.6	58.25	1.63	0.46	3.02	2.15	6/63
CD4	63	25.4	14.61	4.28	1.27	8.1	6.08	0/63
CD8	63	25.4	39.25	2.56	0.72	4.73	3.74	3/63
CD19	48	24.7	21.78	3.37	0.88	6.02	4.47	3/48
NK	46	23.9	18.12	4.19	1.43	8.47	6.48	2/46

**FIDELITE INTERMEDIAIRE**  
 Applicable  ; non applicable (à justifier)

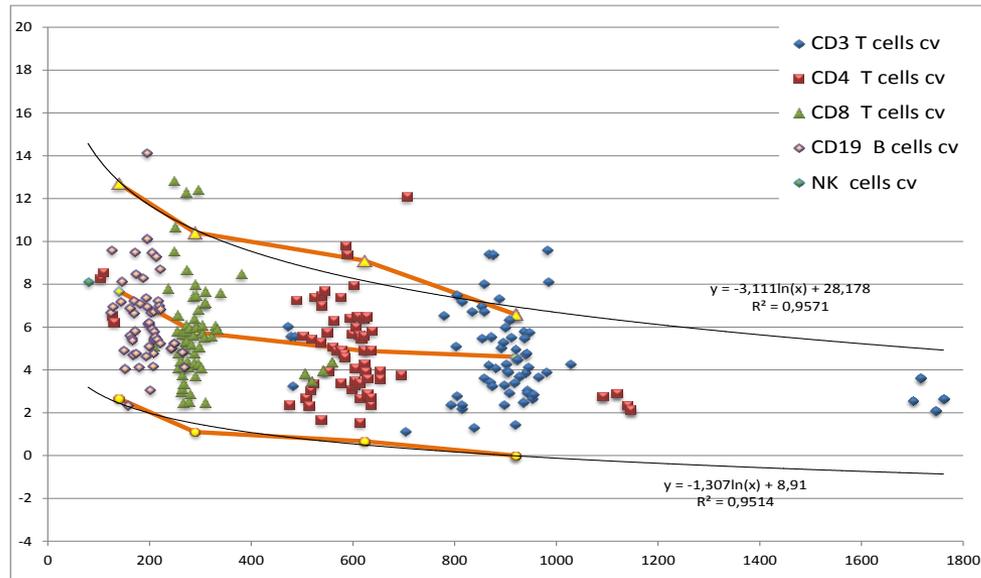
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source <sup>4</sup> )	Conclusion <sup>5</sup>
CD3 % 57.99						3.16	
CD3% 72.77						2.00	
CD4% 14.21						7.96	
CD4% 48.31						3.44	
CD8% 40.13						4.05	
CD8% 22.93						6.48	
CD19% 22.18						5.91	
CD19% 14.76						7.51	
NK% 18.26						6.53	
NK% 10.38						10.55	

# Numération lymphocytaire , valeurs de référence?

## Remarques, discussions

- CV observé directement corrélé à la concentration de la sous-population :
  - CV bas pour sous population les plus représentées : CD3 ou CD4
  - CV plus élevé pour celles les moins représentées : B ou NK

et non pas au type de la sous-population



# Numération lymphocytaire , valeurs de référence?

## Remarques, discussions

- CV observé directement corrélé à la concentration de la sous-population :
  - CV bas pour sous population les plus représentées : CD3 ou CD4
  - CV plus élevé pour celles les moins représentées / B ou NK

et non pas au type de la sous-population

- Donc données extrapolables aux autres sous populations lymphocytaires
- Différences de variabilité en fonction des différents type de QC mais non significatives, et expliquées par la concentration de la sous-population dans les CQ.
- ?? CV de répétabilité devrait être moins élevé que celui de reproductibilité (moins de variabilité) , mais ici, la moitié des valeurs où c'est inversé!!!....Mais bon, c'est la vraie vie

# La suite...

- ✓ Diffusion en avant première (le 13/12/17) par Michel Ticchioni des résultats à tous les laboratoires participants (utile pour ceux en attente de visite d'accréditation)
- ✓ Françoise Durrieu finalise un article qui reprendra l'ensemble des points et sera soumis à un journal français et que vous pourrez citer dans votre dossier de validation/vérification de méthodes et en parallèle,
- ✓ Claude Lambert finit d'écrire un article sur la démarche que nous avons suivie et que nous soumettrons à une revue internationale.

# Questionnaire sur l'état d'avancement de l'accréditation en France

71 réponses dont 70 exploitables

	Numération lympho.	Hémato Spéc	Immuno spéc	MRD	HPN	CD34
<b>Nbre Centres</b>	65	50	29	20	27	17
<b>Nbre centres accrédités</b>	16*	6	3	1	3	4
<b>EEQ</b>	61 <sup>1</sup>	24 <sup>2</sup>	3	3	27 <sup>3</sup>	12 <sup>4</sup>
<b>CIQ</b>	46	9 <sup>5</sup>	4	0	0	13

\* : 4 en cours

1 : 26 UKNEQAS ; 17 CTCB ; 14 Biologie Prospective

2 : 9 UKNEQAS ; 6 FF ; 6 CTCB ; 4 EIL

3 : 25 AFC ; 4 UKNEQAS

4 : 6 UKNEQAS ; 5 EuroCell

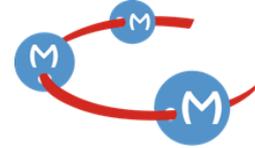
5 : 8 EuroCell ; 1 InterQC

# Questionnaire sur l'état d'avancement de l'accréditation en France

71 réponses dont 70 exploitables

	<b>Numération lympho.</b>	<b>Hémato Spéc</b>	<b>Immuno spéc</b>	<b>MRD</b>	<b>HPN</b>	<b>CD34</b>
<b>Nbre Centres restants</b>	45	44	26	19	24	13
<b>2018</b>	20	7	6	3	3	3
<b>2019</b>	12	11	1	6	7	4
<b>2020</b>	13	26	19	10	14	6

# Merci à tous!!



Ame, Patricia <patricia.ame@univ-rennes1.fr>; Arnaud, B. <b.arnaud@ch-cornouaille.fr>; FERCHIOU Asma <asma.ferchiou@aphp.fr>; AUMONT Cédric <cedric.aumont@aphp.fr>; B. SIMONET <b.simonet@ch-gueret.fr>; Bandin, Olivia <o.bandin@ch-bry.org>; Barriere, Stephanie <stephanie.barriere@ch-pontoise.fr>; Benet, B <b.benet@chr-metz-thionville.fr>; Bennani, Hind <h.bennani@hopital-foch.com>; Benseddik, Zaira <zbenseddik@ch-chartres.fr>; Berreville, E <eberreville@ch-havre.fr>; BERTIN, Daniel <Daniel.BERTIN@ap-hm.fr>; Boex, P <p.boex@ch-ouestguyane.fr>; Botton, Eleonore <ebotton@lab-cerba.com>; Boumedienne, Ahmed <ahmed.boumedienne@chu-limoges.fr>; Bourgerette, Evelyne <evelyne.bourgerette@ch-nevers.fr>; Brette, Caroline <c.brette@chu-montpellier.fr>; BRUMPT Caren <caren.brumpt@aphp.fr>; Buret, Bernadette <bernadette.buret@ch-niort.fr>; Cannard, Véronique <v.cannard@chu-nancy.fr>; CAPRON Claude <claud.capron@aphp.fr>; Carage, Thierry <tpcarage@orange.fr>; CARMAGNAT Maryvonnick <maryvonnick.carmagnat@aphp.fr>; Carroger, Guy <guy.carroger@ch-bourges.fr>; Carron, Gilbert <labcarron@orange.fr>; Chachia, Anissa <anissa.chachia@ch-angouleme.fr>; Charpentier, Agnes <charpentier.agnes@ghicl.net>; Chenal, Philippe <chenal.philippe@yahoo.fr>; Chevalier, Julie <julie.chevalier@ch-bretagne-atlantique.fr>; 'Christine Fourcade' <christine.fourcade@ch-argenteuil.fr>; Ciree, Arnaud <a.ciree@chu-tours.fr>; Clabe, Alain <alain.clabe@chu-reunion.fr>; Coignard, Catherine <catherine.coignard@biomnis.com>; Corcy, JM <jmcorcy@wanadoo.fr>; COSTOPOULOS Myrto <myrto.costopoulos@aphp.fr>; Courtier, Françoise <fcourtier@ch-valence.fr>; Couteaud, C <ccouteaud@hpsj.fr>; CREIDY Rita <rita.creidy@aphp.fr>; Cuquemelle, Caroline <caroline.cuquemelle@ch-toulon.fr>; Debliquis, Agathe <debliquisa@ghrmsa.fr>; Dignat-George, Françoise <francoise.dignat-george@ap-hm.fr>; DUMONT Bénédicte <benedicte.dumont@aphp.fr>; DUREY Marie-Agnès <marie-agnes.durey@aphp.fr>; Durrieu, Françoise <F.Durrieu@bordeaux.unicancer.fr>; Elaerts, Stephane <stephane.elaerts@cerballiance.fr>; Farnarier, Catherine <catherine.farnarier@ap-hm.fr>; Farrugia, C <cfarrugia@ch-sudessonne.fr>; FEGER Frédéric <frederic.feger@aphp.fr>; Filippi, Jean-Francois <jean-francois.filippi@ch-bastia.fr>; Foissaud, Vincent <vincent.foissaud@intradef.gouv.fr>; Franck, Rena <franck.rena@ch-boulogne.fr>; Ghevaert, Christine <christine.ghevaert@ch-roubaix.fr>; Goujart, Marie-Amélie <marie-amelie.goujart@cht.nc>; Gris, Jean-Christophe <jean-christophe.gris@chu-nimes.fr>; Gubler, Brigitte <brigitte.gubler@u-picardie.fr>; Gueudet, Philippe <philippe.gueudet@ch-perpignan.fr>; 'Guignant, Caroline' <guignant.caroline@chu-amiens.fr>; Guy, Julien <julien.guy@chu-dijon.fr>; Hemar, Claire <hemar-c@ch-valenciennes.fr>; Hurstel Remy <remy.hurstel@ch-colmar.fr>; HURTADO NEDELEC Maria-Margarita <maria.hurtado-nedelec@aphp.fr>; Jacob, Marie Christine <MCJacob@chu-grenoble.fr>; Jacquot, Serge <serge.jacquot@chu-rouen.fr>; Jamin, Christophe <christophe.jamin@chu-brest.fr>; KERGOAT NATHALIE <nathalie.kergoat@chu-brest.fr>; Kerneis, Elisabeth <kerneis.elisabeth@ch-avignon.fr>; Khelil, Ahmed <ahmed.khelil@ch-gonesse.fr>; Khoury, E <ekhoury@ch-montfermeil.fr>; Kirchgessner, Veronique <veronique.kirchgessner@ch-chalon71.fr>; Laffont, Françoise <francoise.laffont@ch-perigieux.fr>; Largier, Marie <marielargier@labodrouot.com>; Lavigne, Geraldine <geraldine.lavigne@chu-nimes.fr>; Lecalvez, Genevieve <genevieve.lecalvez@chu-brest.fr>; Lefevre, Guillaume <guillaume.lefevre@chru-lille.fr>; Legac, Eric <eric.legac@chr-orleans.fr>; LE GARFF TAVERNIER Magali <magali.legarff@aphp.fr>; Leloup-Poilane, Beatrice <beatrice.leloup-poilane@ch-stbrieuc.fr>; Lemaire, Isabelle <isabelle.lemaire@chsf.fr>; Lemaire, Pierre <p.lemaire@ch-lemans.fr>; LEMARIE-BASSET, Claude <LEMARIEC@ipc.unicancer.fr>; Lemauff, Brigitte <lemauff-b@chu-caen.fr>; LETESTU Rémi <remi.letestu@aphp.fr>; Leymarie, Vincent <vincent.leymarie@biosante19.fr>; Lhoumeau, Anne Catherine <lhoumeauac@ipc.unicancer.fr>; Malcus, Christophe <christophe.malcus@chu-lyon.fr>; Martaresche, Cecile <cecile.martaresche@labo-barla.eu>; Marzac, Christophe <christophe.marzac@gustaveroussy.fr>; Mazurier, Isabelle <isabelle.mazurier@hnfc.fr>; Mermond, Sylvain <sylvain.mermond@ch-larochelle.fr>; Mimoun, A <amimoun@ch-cotabasque.fr>; Miot, Charline <ChMiot@chu-angers.fr>; Monier, Laurie <laurie.monier@chru-strasbourg.fr>; MONNIER, Delphine <Delphine.MONNIER@chu-rennes.fr>; Montfort, Laura <laura.monfort@institutfourmier.org>; Moreau, Jean-François <jean-francois.moreau@u-bordeaux.fr>; Nguekam, Angele <angele.nguekam@chu-reunion.fr>; NICOLINO-BRUNET Corinne <Corinne.NICOLINO@ap-hm.fr>; Okandze, Antoine <antoine.okandze@ch-cayenne.fr>; 'olivier.roualdes@biomnis.com' <olivier.roualdes@biomnis.com>; ORSINI-PIOCELLE, Frederique <forsiniopiocele@ch-annecygenevois.fr>; PARIZOT Christophe <christophe.parizot@aphp.fr>; 'pascal.fuseau@chu-fortdefrance.fr' <pascal.fuseau@chu-fortdefrance.fr>; Patoz, Pierre <ppatoz@ch-tourcoing.fr>; Pellicier, Alicia <alicia.pellicier@ch-martigues.fr>; Peltier, JY <jypeltier@chi-poissy-st-germain.fr>; Picard, Capucine <capucine.picard@inserm.fr>; Picque, Marie <marie.picque@ch-melun.fr>; Plat, Albertine <aplat@ch-tarbes-vic.fr>; Portales, Pierre <p-portales@chu-montpellier.fr>; Pucalowski, C. <c.pucalowski@ch-lens.fr>; Raffenot, Didier <didier.raffenot@ch-metropole-savoie.fr>; Raggiueau, V <vraggiueau@ch-versailles.fr>; 'Rania Skhiri' <rania.skhiri@ch-argenteuil.fr>; Renaudineau, Yves <yves.renaudineau@chu-brest.fr>; Rigollet, Lauren <lauren.rigollet@biomnis.com>; Rimbart, Marie <marie.rimbart@chu-nantes.fr>; Robillard, Nelly <nelly.robillard@chu-nantes.fr>; Roma, Charlotte <roma-c@ch-valenciennes.fr>; ROSENTHAL MARIA CHU Nice <rosenthal.m@chu-nice.fr>; Roussel, Mikael <mikael.roussel@chu-rennes.fr>; Sahli, Mouloud <mouloud.sahli@ch-stdenis.fr>; Sappa, Edith <esappa@ch-aix.fr>; 'sebastien.vergnolle@ch-troyes.fr' <sebastien.vergnolle@ch-troyes.fr>; Seilles, Estelle <estelle.seilles@univ-fcomte.fr>; Serre, Myriam <myriam.serre@ch-toulon.fr>; Simon, Ludovic <sec.laboratoire@ch-moulins-zyeure.fr>; Sinkevici, Katazina <katazina.sinkevici@biomnis.com>; 'sophie.brun@chu-nimes.fr' <sophie.brun@chu-nimes.fr>; STEIMLE THOMAS <THOMAS.STEIMLE@gustaveroussy.fr>; Subiger, Francois <francois.subiger@chd-veudee.fr>; Tabary, Thierry <ttabary@chu-reims.fr>; Treiner, Emmanuel <treiner.e@chu-toulouse.fr>; Uring-Lambert, Beatrice <beatrice.uring-lambert@hemato-ulp.u-strasbg.fr>; GUERIN Valérie <valerie.guerin@aphp.fr>; Verge, Veronique <veronique.verge@gustaveroussy.fr>; Veyrat-Masson, Richard <rveyrat@chu-clermontferrand.fr>; Vigier, Patricia <drpvigier@yahoo.fr>; Witthuhn, Fabienne <fabienne.witthuhn@chu-poitiers.fr>



Ceredih, 14/12/17

