



<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES
FACULTE DE PHARMACIE DE LYON
8, avenue Rockefeller – 69373 LYON Cedex 08

Année 2016

THESE n°24-2016

MEMOIRE
DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE
BIOLOGIE MEDICALE

Travail effectué dans le Laboratoire d'Immunologie Cellulaire de l'Hôpital Edouard Herriot
Sous la direction de M. Guillaume MONNERET

SOUTENU DEVANT LE JURY INTERREGIONAL LE VENDREDI 14 OCTOBRE 2016

PAR Mme Morgane GOSSEZ

NEE LE 13 NOVEMBRE 1987 A CAEN

CONFORMEMENT AUX DISPOSITIONS DU DECRET N°90-810 DU 10 SEPTEMBRE 1990,
TIENT LIEU DE THESE

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**Evaluation de l'AQUIOS CL pour la numération en valeur absolue
des lymphocytes T CD4**

JURY

PRESIDENT : M. MONNERET Guillaume, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

MEMBRES : M. DUMONTET Charles, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Mme CARCELAIN Guislaine, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

M. FRANCE Georges, Docteur en Pharmacie, Vice-Président - Global Quality Lead for
Local Operating Companies - GSK

Mme POITEVIN-LATER Françoise, Praticien Hospitalier

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES
FACULTE DE PHARMACIE DE LYON
8, avenue Rockefeller – 69373 LYON Cedex 08

Année 2016

THESE n°24-2016

MEMOIRE
DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE
BIOLOGIE MEDICALE

Travail effectué dans le Laboratoire d'Immunologie Cellulaire de l'Hôpital Edouard Herriot
Sous la direction de M. Guillaume MONNERET

SOUTENU DEVANT LE JURY INTERREGIONAL LE VENDREDI 14 OCTOBRE 2016

PAR Mme Morgane GOSSEZ

NEE LE 13 NOVEMBRE 1987 A CAEN

CONFORMEMENT AUX DISPOSITIONS DU DECRET N°90-810 DU 10 SEPTEMBRE 1990,
TIENT LIEU DE THESE

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**Evaluation de l'AQUIOS CL pour la numération en valeur absolue
des lymphocytes T CD4**

JURY

PRESIDENT : M. MONNERET Guillaume, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

MEMBRES : M. DUMONTET Charles, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Mme CARCELAIN Guislaine, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

M. FRANCE Georges, Docteur en Pharmacie, Vice-Président - Global Quality Lead for
Local Operating Companies - GSK

Mme POITEVIN-LATER Françoise, Praticien Hospitalier

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Président de l'Université

Présidence du Conseil Académique

Vice-Président du Conseil d'Administration

Vice-Président de la Commission Recherche

Vice-Président de la Formation et de la Vie Universitaire

M. Frédéric FLEURY

M. Hamda BEN HADID

M. Didier REVEL

M. Fabrice VALLEE

M. Philippe CHEVALIER

Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

SANTE

UFR de Médecine Lyon Est

Directeur : M. Jérôme ETIENNE

UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux

Directeur : Mme Carole BURILLON

Institut des Sciences Pharmaceutiques et
Biologiques

Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

UFR d'Odontologie

Directeur : M. Denis BOURGEOIS

Institut des Techniques de Réadaptation

Directeur : M. Yves MATILLON

Département de formation et centre de
recherche en Biologie Humaine

Directeur : Anne-Marie SCHOTT

SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. Fabien DE MARCHI

UFR de Sciences et Techniques des
Physiques et Sportives (STAPS)

Directeur : M. Yannick VANPOULLE Activités

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon

Directeur : M. Pascal FOURNIER (ex ISTIL)

I.U.T. LYON 1

Directeur : M. Christophe VITON

Institut des Sciences Financières et
(ISFA)

Directeur : M. Nicolas LEBOISNE d'Assurance

ESPE

Directeur : M. Alain MOUGNIOTTE

LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHEMIE ET PHARMACIE GALENIQUE

- **CHIMIE ANALYTIQUE, GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**

Monsieur Raphaël TERREUX (Pr)
Monsieur Pierre TOULHOAT (Pr - PAST)
Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)
Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU-HDR)
Madame Christelle MACHON (AHU)

- **PHARMACIE GALENIQUE-COSMETOLOGIE**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)
Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)
Madame Françoise FALSON (Pr)
Monsieur Hatem FESSI (Pr)
Monsieur Fabrice PIROT (PU - PH)
Monsieur Eyad AL MOUAZEN (MCU)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Ghania HAMDI-DEGOBERT (MCU-HDR)
Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)
Monsieur Damien SALMON (AHU)

- **BIOPHYSIQUE**

Monsieur Richard COHEN (PU – PH)
Madame Laurence HEINRICH (MCU)
Monsieur David KRYZA (MCU – PH - HDR)
Madame Sophie LANCELOT (MCU - PH)
Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (MCU-HDR)
Madame Elise LEVIGOUREUX (AHU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE

- **DROIT DE LA SANTE**

Monsieur François LOCHER (PU – PH)
Madame Valérie SIRANYAN (MCU - HDR)

- **ECONOMIE DE LA SANTE**

Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU - HDR)
Madame Carole SIANI (MCU – HDR)
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)

- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**

Monsieur Pascal BADOR (MCU - HDR)

- **HYGIENE, NUTRITION, HYDROLOGIE ET ENVIRONNEMENT**

Madame Joëlle GOUDABLE (PU – PH)

- **INGENIERIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX**

Monsieur Gilles AULAGNER (PU – PH)
Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)

- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**

Madame Alexandra CLAYER-MONTEBAULT (MCU)

Monsieur Vincent GROS (MCU-PAST)

Madame Audrey JANOLY-DUMENIL (MCU-PH)

Madame Pascale PREYNAT (MCU-PAST)

- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**

Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU-PH)

Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)

Madame Marie-Paule PAULTRE (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT

- **CHIMIE ORGANIQUE**

Monsieur Pascal NEBOIS (Pr)

Madame Nadia WALCHSHOFER (Pr)

Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU - HDR)

Madame Christelle MARMINON (MCU)

Madame Sylvie RADIX (MCU -HDR)

Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU - HDR)

- **CHIMIE THERAPEUTIQUE**

Monsieur Roland BARRET (Pr)

Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)

Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU - HDR)

Monsieur Thierry LOMBERGET (MCU - HDR)

Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)

- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**

Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)

Madame Marie-Emmanuelle HAY DE BETTIGNIES (MCU)

Madame Isabelle KERZAON (MCU)

Monsieur Serge MICHALET (MCU)

- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**

Madame Roselyne BOULIEU (PU – PH)

Madame Magali BOLON-LARGER (MCU - PH)

Madame Christelle CHAUDRAY-MOUCHOUX (MCU-PH)

Madame Céline PRUNET-SPANO (MCU)

Madame Catherine RIOUFOL (MCU- PH-HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

- **TOXICOLOGIE**

Monsieur Jérôme GUITTON (PU – PH)

Madame Léa PAYEN (PU-PH)

Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)

Monsieur Sylvain GOUTELLE (MCU-PH)

- **PHYSIOLOGIE**
Monsieur Christian BARRES (Pr)
Monsieur Daniel BENZONI (Pr)
Madame Kiao Ling LIU (MCU)
Monsieur Ming LO (MCU - HDR)
- **PHARMACOLOGIE**
Monsieur Michel TOD (PU – PH)
Monsieur Luc ZIMMER (PU – PH)
Monsieur Roger BESANCON (MCU)
Monsieur Laurent BOURGUIGNON (MCU-PH)
Madame Evelyne CHANUT (MCU)
Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)
Madame Dominique MARCEL CHATELAIN (MCU-HDR)
- **COMMUNICATION**
Monsieur Ronald GUILLOUX (MCU)
- **ENSEIGNANTS ASSOCIES TEMPORAIRES**
Monsieur Olivier CATALA (Pr-PAST)
Madame Corinne FEUTRIER (MCU-PAST)
Madame Mélanie THUDEROZ (MCU-PAST)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

- **IMMUNOLOGIE**
Monsieur Jacques BIENVENU (PU – PH)
Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)
Madame Cécile BALTER-VEYSSEYRE (MCU - HDR)
Monsieur Sébastien VIEL (AHU)
- **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**
Madame Christine VINCIGUERRA (PU - PH)
Madame Brigitte DURAND (MCU - PH)
Monsieur Yohann JOURDY (AHU)
- **MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIES INDUSTRIELLES**
Monsieur Patrick BOIRON (Pr)
Monsieur Jean FRENEY (PU – PH)
Monsieur Frédéric LAURENT (PU-PH-HDR)
Madame Florence MORFIN (PU – PH)
Monsieur Didier BLAHA (MCU)
Madame Ghislaine DESCOURS (MCU-PH)
Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU-PH)
Madame Emilie FROBERT (MCU - PH)
Madame Véronica RODRIGUEZ-NAVA (MCU-HDR)
- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE**
Monsieur Philippe LAWTON (Pr)
Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)
Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B

- **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE - BIOTECHNOLOGIE**

Madame Pascale COHEN (Pr)
Monsieur Alain PUISIEUX (PU - PH)
Madame Emilie BLOND (MCU-PH)
Monsieur Karim CHIKH (MCU - PH)
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU - PH-HDR)
Monsieur Boyan GRIGOROV (MCU)
Monsieur Hubert LINCET (MCU-HDR)
Monsieur Olivier MEURETTE (MCU)
Madame Caroline MOYRET-LALLE (MCU – HDR)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)
Monsieur Anthony FOURIER (AHU)

- **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)
Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU - HDR)

INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)
Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)
Monsieur Philippe LAWTON (Pr)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
Madame Alexandra MONTEBAULT (MCU)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Valérie VOIRON (MCU - PAST)

Assistants hospitalo-universitaires sur plusieurs départements pédagogiques

Madame Florence RANCHON

Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Madame Charlotte BOUARD	(86ème section)
Madame Laure-Estelle CASSAGNES	(85ème section)
Monsieur Karim MILADI	(85ème section)
Madame Laurence PAGES	(87ème section)

Pr : Professeur

PU-PH : Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

MCU : Maître de Conférences des Universités

MCU-PH : Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier

HDR : Habilitation à Diriger des Recherches

AHU : Assistant Hospitalier Universitaire

PAST : Personnel Associé Temps Partiel

REMERCIEMENTS

L'histoire de cette thèse a commencé le jour de l'oral de DES d'immunologie, il y a trois ans. Ce jour-là, je suis stressée, à cause de l'examen, mais aussi parce qu'un des examinateurs est le Pr Guillaume Monneret, qui m'impressionne beaucoup. Le verdict du tirage au sort tombe : ma question porte sur les lymphocytes T. Et lymphocyte T rime avec... Pr Monneret ! Après la dernière question sur Foxp3 passée, le Pr Monneret me demande ce que j'envisage pour la suite ; je lui dis que j'ai passé le concours de l'internat de Biologie Médicale pour faire de la recherche clinique, et que je viens d'avoir une révélation pour l'immunologie, stage que l'on m'avait obligée à prendre alors que je rêvais de parasito... Comme quoi ! Ça tombe bien, me dit le Pr Monneret, j'ai un sujet de thèse disponible pour le DES de Biologie Médicale si ça t'intéresse, un nouveau cytomètre de flux à tester avant sa commercialisation. Je l'ai regardé, il m'a regardée, j'ai pensé «OMG, je suis terrifiée ! », j'ai répondu « Oui bien sûr, merci beaucoup, c'est une chance exceptionnelle ». Bref, je fais une thèse en immunologie.

J'ai donc découvert le laboratoire d'immunologie cellulaire de l'Hôpital Edouard Herriot. Patrick et Claude, m'ont mise tout de suite dans l'ambiance avec un grand « Bonjour Clara ! ». Pendant six mois, j'ai appris le travail de routine du laboratoire. Puis le fameux AQUIOS CL est arrivé, malgré la douane qui voulait le garder. Ces six autres mois ont été ponctués par l'excitation du projet, puis les pannes, les graphes moches, les rencontres avec les représentants Beckman Coulter de Rhône-Alpes, de France, de Suisse, d'Allemagne, les moments MacGyver avec Stéphane Gaudin au téléphone « je coupe le fil noir ou le fil rouge ?! ». Malgré ces quelques péripéties, nous parvenons à boucler l'étude, Ouf ! Je dis au revoir à l'AQUIOS CL et au laboratoire d'immunologie pour m'envoler vers le Nord, la ville d'Harry Potter, Oxford. Pas tout à fait, puisque je parviens à rédiger l'article sur l'AQUIOS CL entre matchs de cricket, de football australien et découverte des english pubs. Quand je rentre un an plus tard, l'article est publié, et deux AQUIOS CL sont attendus au laboratoire d'immunologie. La mission de ma dernière année d'internat est évidente : installer, évaluer les performances de ces deux nouveaux arrivés, les comprendre, et les faire s'intégrer à l'équipe. Me voici aujourd'hui à la fin de mon internat, je crois que le pari a été tenu. Je vous laisserai en juger à la lecture de ces « quelques » pages.

Je souhaite remercier le **Pr Charles DUMONTET** et le **Pr Guislaine CARCELAIN**, qui m'ont fait l'honneur de s'intéresser à mon travail et de l'évaluer ; merci pour l'enseignement que je tirerai de l'expérience auprès d'un tel jury.

Je souhaite remercier le **Dr Georges FRANCE**, une si belle rencontre, d'avoir accepté de faire partie des membres du jury de ma thèse, de me montrer l'exemple avec ta belle carrière atypique de pharmacien, ainsi qu'avec ta philosophie de vie.

Je souhaite remercier le **Dr Françoise POITEVIN-LATER**, pour m'avoir fait le plaisir de faire partie de mon jury et m'avoir épaulée tout au long de ce projet ; mais également, comme **Christophe, Julien et Fabienne**, je souhaite vous remercier de me faire grandir jour après jour, grâce aux enseignements quotidiens que je tire de vos personnalités, connaissances, expériences, conseils et pédagogies propres ; merci également pour la confiance et les moyens que vous m'accordez pour que je puisse m'épanouir. Je vous remercie pour le plaisir que j'ai à venir travailler tous les jours et pour tous les moments de détente partagés. J'espère être toujours digne de cette équipe.

Je souhaite remercier **Patrick et Claude** les heureux retraités, les dernières recrues **Laurence, Céline et Cathy J** (à prononcer avec un accent américain !), **Brigitte, Françoise, Agnès, Sandrine, Anne, Claudia et Cathy**, pour tout ce que vous m'avez appris, pour m'avoir tout de suite intégrée à l'équipe et mise à l'aise, pour vos petites attentions, pour la confiance que vous me portez, pour partager avec moi vos attentes, doutes et remarques, qui m'ont toujours permis de me remettre en question ou de conforter mes choix, et sont essentielles à la cohésion de l'équipe et l'intérêt de notre travail.

Je souhaite remercier **les membres du Laboratoire Commun de Recherche HCL-Biomérieux**, qui m'ont ouvert leurs portes, que je découvre petit à petit et qui sont toujours disponibles lorsque j'ai besoin d'aide.

Je souhaite remercier la société **Beckman Coulter** pour nous avoir fait confiance sur ce projet et nous avoir accompagnés tout au long de l'étude.

Enfin je tiens à remercier le **Pr Guillaume Monneret**, de m'avoir fait l'honneur d'être Président du jury et Directeur de cette thèse ; mais surtout, je vous remercie pour ces trois années passées dans votre laboratoire et tout ce que j'ai pu y apprendre, pour votre honnêteté et pour me dire quand je me trompe, pour votre porte toujours ouverte et vos conseils précieux lors de mes choix de carrière (« Vas à Oxford, et fais toi plaisir, tu verras bien après », « Suis tes rêves, ta passion et vise haut, tu pourras toujours redescendre si ça ne fonctionne pas »), pour votre soutien et me faire ressentir que je suis capable, et surtout pour la confiance et l'honneur que vous m'accordez en me permettant de faire mes premiers pas post-internat en tant qu'AHU dans votre laboratoire. Pour l'exemple que vous représentez, merci.

Je souhaite également remercier tous mes amis,

Carolette, Auror et Stouf, mes témoins d'amour, pour vos conseils et votre soutien, pour être toujours les mêmes quand on se voit peu, pour les fous rires, les sessions shopping, les séances de bitching, pour me remettre dans le droit chemin quand j'ai tort, pour les exemples que vous me donnez. Merci pour votre amitié si précieuse.

Pauline, pour ne pas avoir hésité à donner l'heure à une inconnue, pour avoir enfilé ta tenue militaire et avoir laissé exprimer la Queen B en toi, « tkt il n'y a que moi qui écoute ».

Mes copines de promo, **Sabine, Anaëlle, Clémence et Marion**, pour avoir rendu ces années d'internat géniales, pour les WE entre filles dans le Sud, au ski, à Mallorca, pour les soirées à refaire le monde, pour les stages en binôme, pour la voix de standardiste de Nan, pour les chansons à tue-tête dans la Clem'mobile, pour les compèt d'ultimate frisbee, pour tout ça quoi !

Le loup et les brebis, **Clément Dr Mitch, Solenn Dr Papillon, July Dr Dr et Camille Dr** de « La Boum » pour m'avoir fait apprécier les parisiens, avoir découvert ensemble les joies des batchs et des ERV (avec ou sans H ??^^), pour la journée de la jupe, pour l'ambiance et l'entraide au boulot, pour les déclarations d'amour et les sessions de dance endiablées !

Mes amis du taekwondo, **Pras** le Maitre... du Gin des pandas et du karaoké, **Marie-Anne** ma seule copine plus pétale que moi, **Yanis** (#mercipourlesfichierscscvetm'avoirapprisaécrirewash), **Ivan** (j'espère qu'aujourd'hui je n'aurai ni les cheveux sales ni de grosses chevilles ;-), **Chris, Régis et Jislène**.

Les Masters of Immuno, **Simon et Thibault**, comme quoi médecin, scientifique et pharmacien peuvent former un trio de choc !

Les potes Normands, **Bibou, Gugu, Auré, Manu, Guish, les Xu** et ma binome forever **Elo**, pour m'avoir vu grandir de la P1 à la dernière année d'internat, pour les moments piscine/Jullou/ski/roller/beach-volley/laissez-moi là...

Les copains Lyonnais, **Tom, Cédric, Dien, JB**, tous **les Romains, Polo** et les baguettes ! **Anne, Isabelle, Audrey, Violaine, Aurore, Mel** et **Sarah** pour nous avoir accueillis, pour votre bonne humeur continue et tous les moments de partage et de fête.

Mes amis qui ne rentrent pas dans les cases, **Livier** le marathonien dresseur de Pikachu, **Dédé** la sugarbaby et **Pierrot** qui me suit depuis la primaire mais n'a pas changé.

Je souhaite bien sur remercier ma famille,

Pour tous les moments partagés ensemble, qui ne sont jamais assez nombreux à mon goût, pour tout cet amour qui m'a forgé au fil des années ; la motivation de tous mes choix de carrière et ma spécialisation en immunologie ont été inconsciemment guidées par certains d'entre vous, et je vous dédie chacune de mes réussites...

Papa et Maman, pour croire constamment en moi, pour votre générosité, pour me ramener les pieds sur terre quand il faut, et surtout pour votre amour et le bonheur de lire la fierté dans vos yeux. Je suis arrivée ici aujourd'hui grâce à vous.

Ptite Doule, pour ce lien rare entre nous, ta sensibilité, ton talent et ta vision de la vie si uniques.

Tonton et Hugo, les tonton et tata que tout le monde m'envie,

Jérôme, Isabelle, Justine, Thomas et Raphael, ma famille modèle,

Cathy et Bernadette, les tatas reines du dance-floor,

Georges, Zita, Bertrand, Magalie mes cousins coups de foudre,

Isabelle, Serge, Alex, Fabian, Marie-Ange, Erwan, Arlette, Jean-Pierre, et **les enfants**, qui m'ont beaucoup appris sur les autres et sur moi-même, et accueillie depuis longtemps dans leur famille,

Mamie, qui veille sur moi.

The last but not least, **Alban**. Notre couple rime avec confiance et liberté, Amour et respect ; merci, car sans tout cela, je n'en serais pas là. Tu es le pilier de ma vie, mon soutien sans faille : dans les moments difficiles, toi seul sait me faire rire et me redonner l'énergie qu'il faut. Tu me laisses m'épanouir même lorsque cela à un prix, comme vivre à Oxford ; toi tu décides même de partager cela et partir avec moi. La seule chose que je puisse faire pour te prouver ma reconnaissance et mon amour au quotidien est te montrer que ces choix difficiles en valent la chandelle ; je comprends que j'ai réussi quand je vois tes yeux qui brillent lorsque je te raconte de façon passionnée mes projets et succès, ma plus grande récompense est ce halo de fierté qui t'entoure, comme lors de mon passage à CROI. Merci pour tous les efforts que tu fais depuis des années, pour me laisser être moi, me laisser t'aimer et partager ta vie, merci pour ce tout petit « oui ».

TABLE DES MATIERES

I.	LISTE DES FIGURES.....	- 15 -
II.	LISTE DES TABLEAUX	- 16 -
III.	LISTE DES ABREVIATIONS	- 17 -
IV.	INTRODUCTION	- 19 -
A.	Intérêt du phénotypage lymphocytaire	- 19 -
1.	Déficits immunitaires congénitaux.....	- 19 -
2.	Suivi des reconstitutions immunitaires.....	- 21 -
3.	Patients séropositifs au VIH et numération des LT CD4.....	- 25 -
B.	La cytométrie en flux, méthode de référence de la numération des LT CD4	- 32 -
1.	Historique	- 32 -
2.	Problématique actuelle d'accréditation de la cytométrie en flux.....	- 36 -
3.	L'AQUIOS CL.....	- 37 -
C.	Conclusion	- 46 -
V.	TRAVAIL PERSONNEL.....	- 48 -
A.	β -test sur site d'un AQUIOS CL.....	- 48 -
B.	Validation de méthode des AQUIOS CL AY47058 et AY39049 lors de leur installation au laboratoire.....	- 59 -
1.	Répétabilité	- 60 -
2.	Reproductibilité intra-laboratoire	- 61 -
3.	Justesse/exactitude	- 62 -
4.	Incertitude de mesure.....	- 66 -
5.	Intervalle de mesure.....	- 68 -
6.	Contaminations	- 70 -
7.	Comparaison de méthode.....	- 72 -
8.	Récapitulatif et conclusion	- 76 -
C.	Retour d'expérience sur les 6 premiers mois d'utilisation en routine.....	- 78 -
1.	Rédaction des procédures d'utilisation.....	- 78 -
2.	Analyse des problèmes rencontrés	- 80 -
D.	Discussion	- 100 -
VI.	SYNTHESE ET PERSPECTIVES.....	- 106 -
VII.	CONCLUSIONS	- 109 -
VIII.	BIBLIOGRAPHIE.....	- 112 -
IX.	ANNEXES.....	- 119 -

LISTE DES FIGURES, TABLEAUX ET ABREVIATIONS

I. LISTE DES FIGURES

Figure 1. Algorithme décisionnel de diagnostic des déficits immunitaires congénitaux

Figure 2. Classification des déficits immunitaires combinés sévères

Figure 3. Chimérisme du compartiment cellulaire T

Figure 4. Différentiation des LT naïfs en cellules mémoires

Figure 5. Survie et numération des LT CD4 en transplantation rénale

Figure 6. Progression clinique chez les patients VIH+ non traités en fonction de la numération des LT CD4

Figure 7. Evolution temporelle du critère LT CD4 pour l'initiation des ARV chez les patients VIH+ asymptomatiques

Figure 8. Composants de l'AQUIOS CL

Figure 9. Banc optique de l'AQUIOS CL

Figure 10. Comparaison des aspects des histogrammes de l'UK NEQAS spécifique des AQUIOS CL et de l'UK NEQAS utilisé pour le NAVIOS

Figure 11. Intérêt de l'incertitude de mesure

Figure 12. Limite de quantification : courbes d'Hortwitz

Figure 13. Limite de linéarité des AQUIOS CL

Figure 14. Schéma du déroulement du test de contamination inter-échantillon

Figure 15. Comparaison de la numération des LT CD4 par l'AQUIOS 1 et le FC500

Figure 16. Comparaison de la numération des LT CD4 par l'AQUIOS 2 et le FC500

Figure 17. Comparaison de la numération des LT CD4 par l'AQUIOS 1 et l'AQUIOS 2

Figure 18. Histogrammes et diagrammes de Levey-Jennings du CQI incorrect

Figure 19. Aspect noir laqué du flacon d'AQUIOS Immunotrol Low Cells incorrect

Figure 20. Problèmes de lyse rencontrés sur l'AQUIOS CL

Figure 21. Aspect problématique de l'histogramme SS/EV

Figure 22. Relevé des températures de la pièce des AQUIOS CL

Figure 23. Stratification des problèmes de lyse rencontrés selon leur intensité

Figure 24. Comparaison des numérations AQUIOS CL / LH780

Figure 25. Comparaison des taux de lymphocytes totaux et LT CD4 AQUIOS CL / Navios

Figure 26. Prise en charge des marquages non spécifiques sur l'AQUIOS CL

Figure 27. Mise en évidence de LT double positifs CD4+CD8+ sur l'AQUIOS CL

Figure 28. Mise en évidence de lymphocytes T CD4-CD8- sur l'AQUIOS CL

Figure 29. Validation des résultats de l'AQUIOS CL après dilution d'un échantillon de LLC

Figure 30. Hyperleucocytose avec myélémie hors limite de linéarité de l'AQUIOS CL

Figure 31. Hyperleucocytose et hyperlymphocytose à lymphocytes CD45^{low} hors limite de linéarité de l'AQUIOS CL

Figure 32. Leucémie aigüe lymphoïde B présentant une importante population blastique CD45^{low}

Figure 33. Fuite au niveau de la pompe de la seringue à prélèvement

Figure 34. Evolution dans le temps des incidents techniques sur les AQUIOS CL et principales interventions du technicien BC

Figure 35. Algorithme de validation biologique des résultats de phénotypage lymphocytaire T CD4 et CD8

II. LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1.** Facteurs prédictifs de progression clinique chez les patients VIH+ non traités
- Tableau 2.** Risque de progression clinique vers le stade SIDA en fonction de la numération des LT CD4
- Tableau 3.** Facteurs associés à la progression clinique chez les patients VIH+ initiant les HAART pendant la phase chronique
- Tableau 4.** Facteurs associés à la progression clinique chez les patients VIH+ initiant les HAART pendant la PI
- Tableau 5.** Facteurs prédictifs de mortalité après 3 échecs thérapeutiques
- Tableau 6.** Recommandations OMS 2015 pour l'initiation des ART chez les patients VIH+
- Tableau 7.** Applications cliniques de la cytométrie en flux
- Tableau 8.** Points de contrôle de qualité en temps réel
- Tableau 9.** Performances à évaluer lors d'une vérification/validation de méthode quantitative ou qualitative
- Tableau 10.** Test de répétabilité des AQUIOS CL
- Tableau 11.** Test de reproductibilité des AQUIOS CL
- Tableau 12.** IQAP de l'AQUIOS Immunotrol Cells lot 6170010
- Tableau 13.** Contrôle national de qualité ANSM 2016
- Tableau 14.** UK NEQAS 025 et 026
- Tableau 15.** Incertitude de mesure pour la numération des LT CD4 en valeur absolue
- Tableau 16.** Test de contamination inter-échantillon des AQUIOS CL
- Tableau 17.** Test de contamination inter-réactif des AQUIOS CL
- Tableau 18.** Récapitulatif des résultats de validation de méthode des AQUIOS 1 et 2
- Tableau 19.** Comparaison des pourcentages de lymphocytes totaux et T CD4 mesurés sur l'AQUIOS CL et le Navios
- Tableau 20.** Services prescripteurs des échantillons analysés dans la comparaison de méthode AQUIOS CL/LH780
- Tableau 21.** Intervention sur les AQUIOS CL par rapport aux problèmes de pompe à déchet de préparation
- Tableau 22.** Crashes de l'aiguille de prélèvement/préparation
- Tableau 23.** Problèmes électroniques rencontrés sur les AQUIOS CL
- Tableau 24.** Problème de lecture de certains réactifs chargés sur les AQUIOS CL

III. LISTE DES ABREVIATIONS

ART : Thérapies antirétrovirales

ARV : Antirétroviraux

ATG: Immunoglobulines de lapin antithymocytes

BC: Société Beckman Coulter

BD: Société Becton Dickinson

CDC : Centers for Disease Control and Prevention

CMF : Cytométrie en Flux

CV : Coefficient de variation

pCV : Charge Virale plasmatique

DI : Déficit Immunitaire

DICS : Déficit Immunitaire Combiné Sévère

EEQ : Evaluation Externe de la Qualité

EV : Volume électronique

FACS : « Fluorescence-activated cell sorting », trieur de cellules marquées par fluorescence

FITC : IsoThioCyanate de Fluorescéine

FS : Forward Scatter

GMO : Greffe de Moelle Osseuse

GVH : Réaction du Greffon contre l'Hôte

HAART : Traitements antirétroviraux hautement actifs

IQAP : Programme d'Assurance Qualité Interlaboratoire

LA : Leucémie aigüe

LB : Lymphocyte B

LIS : Système d'informations du laboratoire

LLC : Leucémie lymphoïde chronique

LPM : Laboratory Production Manager

LT : Lymphocyte T

NFP : Numération Formule Sanguine

NK : Lymphocyte natural killer

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PE : Phycoérythrine

PerCP : peridinin chlorophyll protein

PNB : Polynucléaires basophiles

PNE : Polynucléaires éosinophiles

PNN : Polynucléaires neutrophiles

PR : Polyarthrite rhumatoïde

RI : Réponse immunitaire

SD : Standard deviation = Ecart-type

SIDA : Syndrome de l'ImmunoDéficiency Humaine

SQ : Quotient de Séparation

SS : Side Scatter

TARHA : Thérapie AntiRétrovirale Hautement Active

TMO : Transplantation de Moelle Osseuse allogénique

VIH : Virus de l'Immunodéficiency Humaine

INTRODUCTION

IV. INTRODUCTION

A. Intérêt du phénotypage lymphocytaire

La cytométrie en flux (CMF) est une technique utilisée en laboratoire de biologie médicale pour de multiples applications, aussi bien pour le diagnostic, le pronostic ou encore le suivi de diverses pathologies (1). Une de ces applications est le phénotypage des sous-populations lymphocytaires T. Cet examen est inscrit à la nomenclature des actes de biologie médicale depuis le 1^{er} janvier 1996. Il comprend l'analyse qualitative et quantitative des lymphocytes T (LT) CD3+, CD4+ et CD8+.

Les principales indications de l'immunophénotypage lymphocytaire T sont le diagnostic et le suivi des déficits immunitaires congénitaux, le suivi des patients greffés de moelle osseuse ou recevant des traitements immunosuppresseurs (transplantation d'organe, maladies auto-immunes, syndromes lymphoprolifératifs...), et le suivi des patients séropositifs au Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH).

1. Déficits immunitaires congénitaux

Les déficits immunitaires peuvent être primaires, dus à des mutations dans un des nombreux gènes impliqués dans la RI ou son contrôle, ou secondaires, par exemple à une infection ou un traitement médicamenteux. Les immunodéficiences primaires se traduisent généralement par des infections récurrentes chez les jeunes enfants, mais également par des phénomènes d'allergie, d'auto-immunité, des lymphoproliférations anormales, ou encore des cassures de la courbe de croissance. Le type d'infection suggère souvent le mécanisme du déficit immunitaire sous-jacent : les infections à bactéries pyogènes orientent vers un défaut en anticorps, en complément ou en phagocytes alors que les infections fongiques cutanées et les infections virales traduisent généralement un déficit en LT (2).

Les examens de première ligne permettent de poser le diagnostic et de préciser le type de déficit immunitaire (cellulaire et/ou humorale) : numération formule sanguine (NFS), pour dépister une éventuelle lymphopénie mais également d'autres perturbations quantitatives des polynucléaires neutrophiles (PNN) ou des monocytes ; dosage pondéral des immunoglobulines ; sérologies vaccinales.

Dans un deuxième temps, les examens spécialisés permettent d'explorer spécifiquement l'immunité adaptative cellulaire et humorale, ainsi que l'immunité innée. C'est à cette étape que le phénotypage lymphocytaire par cytométrie en flux entre en jeu. L'analyse de base pour la recherche

d'un déficit immunitaire comprend l'analyse quantitative des sous-populations de LT CD4 et CD8, celle des lymphocytes B (LB) (CD19, CD20, CD21, IgD, CD27), et des lymphocytes NK (CD3, CD16/56). Des marqueurs plus spécifiques peuvent également être recherchés, comme le CD25 ou les molécules HLA de classe I et II. D'autres examens faisant appel à la CMF sont également utiles pour l'étude qualitative des leucocytes : test de prolifération des lymphocytes soumis plus ou moins à diverses stimulations antigéniques spécifiques et caractérisation des PNN (molécules d'adhésion membranaire, métabolisme oxydatif...) principalement (3). Enfin, d'autres analyses ne faisant pas appel à la CMF sont couramment demandées dans ce contexte, comme l'exploration du système du complément, mais surtout la recherche de mutations génétiques caractéristiques de certains déficits immunitaires (3). La **figure 1** présente la démarche diagnostique des principaux déficits immunitaires congénitaux, illustrant l'importance de la cytométrie en flux dans ce processus.

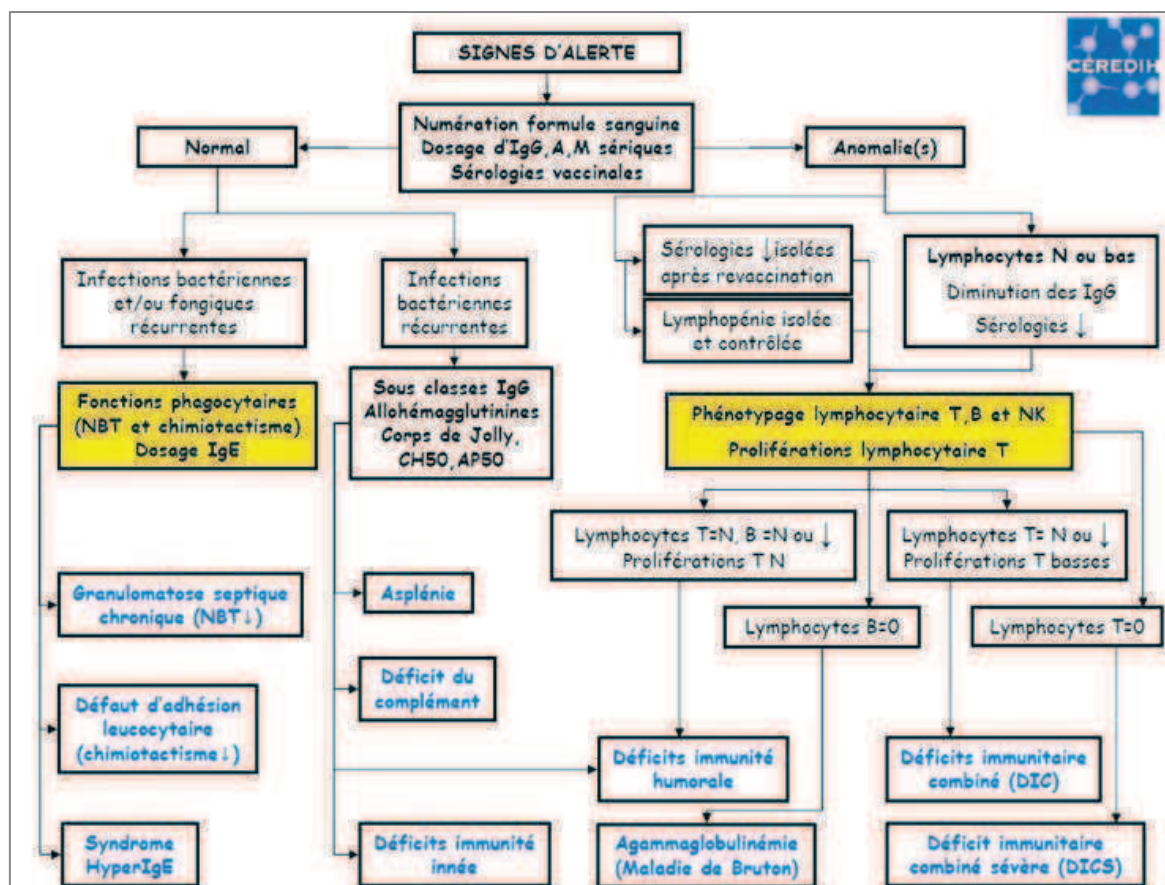


Figure 1. Algorithme décisionnel de diagnostic des déficits immunitaires congénitaux (4)

En jaune, les examens où la cytométrie en flux intervient comme méthode d'analyse.

Il est à noter que les DI combinés sévères (DICS) sont une urgence diagnostic : la lymphopénie profonde et les risques infectieux associés peuvent rapidement engager le pronostic vital avant toute instauration d'une thérapeutique adéquate. Comme l'illustre les **figures 1 et 2**, le diagnostic et la classification d'un DICS reposent sur la numération des sous-populations

lymphocytaires, soulignant l'importance de disposer d'une technique de CMF précise et reproductible.

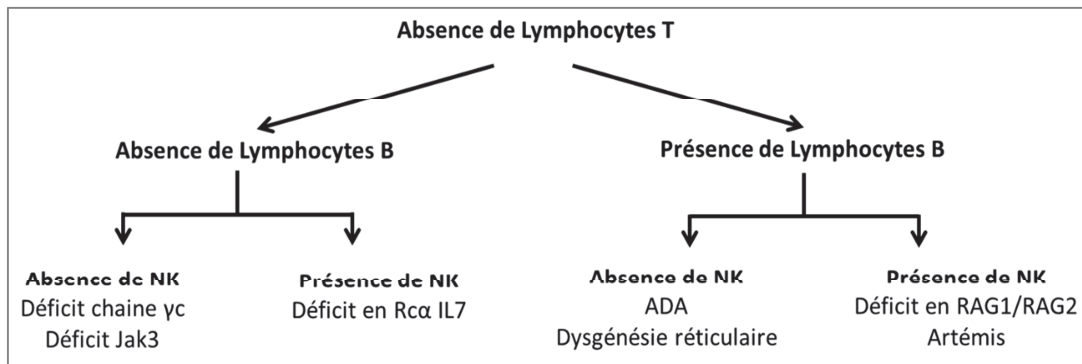


Figure 2. Classification des déficits immunitaires combinés sévères (2)

2. Suivi des reconstitutions immunitaires

a) Reconstitution immunitaire après greffe de moelle osseuse

L'allogreffe de moelle osseuse (GMO) est le traitement principal de diverses pathologies telles que certains déficits immunitaires congénitaux et de nombreuses pathologies hématologiques. Le système immunitaire du donneur joue un rôle ambivalent dans le succès de la GMO. En effet, il est désormais reconnu qu'un des principaux mécanismes anti-tumoraux des allogreffes est la destruction des cellules tumorales par les cellules immunitaires du donneur contenues dans la greffe : c'est l'effet « greffe contre cancer » (5) ; ainsi, si le SI du donneur n'est pas assez efficient, on risque d'assister à la rechute de la pathologie. Au contraire, des cellules immunitaires trop agressives, notamment les lymphocytes T, peuvent être responsables de la destruction des organes sains du receveur, caractérisant la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD). Enfin, une immunodéficience prolongée après GMO augmente le risque d'infections sévères, souvent mortelles lorsqu'elles surviennent ; ces complications infectieuses sont généralement dues à une dysfonction qualitative et quantitative des LT, notamment CD4, qui peut persister plusieurs années après la GMO (6, 7). Cette balance délicate doit donc être monitorée avec soins, soulignant l'importance des analyses étudiant la reconstitution immunitaire après allogreffe.

La reconstitution immunitaire après GMO fait intervenir trois principaux acteurs : les LT matures résiduels du receveur, dont le rôle est ici minoritaire ; les LT matures apportés par le greffon, qui seront sujets à une expansion homéostatique « thymo-indépendante » ; les LT naïfs, issus de la différenciation des cellules souches et progéniteurs du donneur dans le thymus du receveur (voie « thymo-dépendante ») (Fig.3). La voie thymo-indépendante est prépondérante pendant les premières semaines post-greffe, et permet de normaliser la cellularité ; en revanche, elle entraîne des déséquilibres entre les sous-populations T et une restriction de la diversité du répertoire

T, se traduisant par une perte d'efficacité à répondre aux antigènes étrangers et un risque accru d'infections opportunistes.

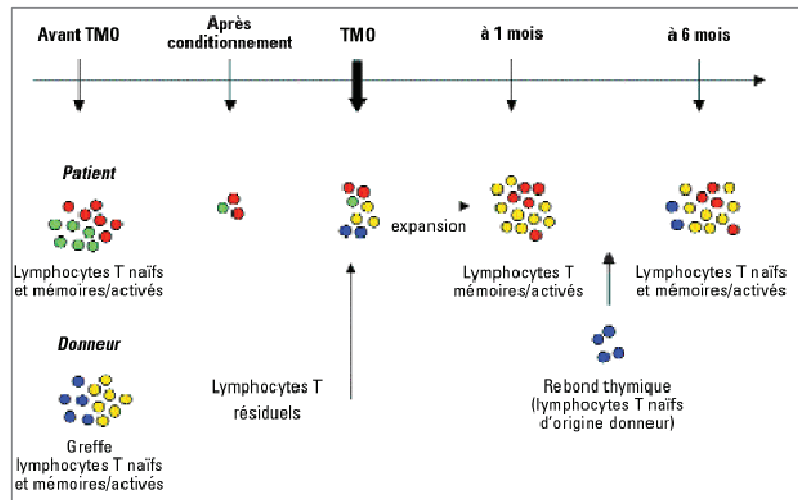


Figure 3. Chimérisme du compartiment cellulaire T (8)

Au moment de la GMO, il persiste des LT mémoires/activés (rouge) et de rares LT naifs (vert) du receveur, mélangés aux LT naifs (bleu) et mémoires/activés (jaune) du donneur. Pendant la reconstitution, les cellules naïves du receveur disparaissent ; on assiste à une expansion homéostatique des cellules mémoires provenant du donneur et du receveur, ainsi qu'à l'apparition des LT naifs du donneur.

Le phénotypage des populations lymphocytaires T par cytométrie en flux est l'examen le plus couramment utilisé pour le suivi de la reconstitution immunitaire T post-GMO. Il permet de discriminer les sous-populations lymphocytaires T CD4 et CD8 naïves et matures, grâce au marquage des antigènes de maturité membranaires, généralement le CD45RA associé au CCR7 (**Fig.4**). La cytométrie en flux permet également d'évaluer la diversité du répertoire du TCR des lymphocytes T périphériques (e.g. IOTest® Beta Mark, Beckman Coulter) et d'énumérer les LT récents émigrants du thymus (9), représentatifs de la reconstitution immunitaire T via la voie thymo-dépendante (7).

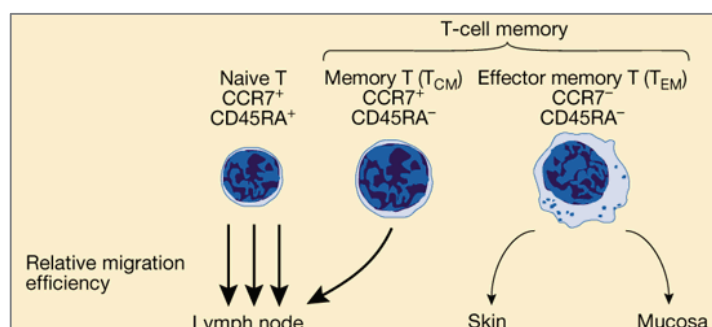


Figure 4. Différenciation des LT naifs en cellules mémoires (10)

Trois sous-types de LT sont caractérisés par l'expression du CD45-RA et du CCR7 : LT naïfs CCR7+ CD45RA+ ; LT mémoire centraux (T_{CM}) CCR7+ CD45RA- ; LT mémoire effecteurs (T_{EM}) CCR7- CD45RA-.

Les LT naïfs migrent d'un ganglion à un autre, les T_{CM} circulent entre les tissus et les ganglions, et les T_{EM} sont localisés au niveau des tissus et muqueuses.

b) Reconstitution immunitaire après traitement immunosuppresseur

(1) Transplantation d'organe

Contrairement aux GMO, les transplantations d'organes ne nécessitent pas de conditionnement pré-greffe ; néanmoins, elles font systématiquement appel à une combinaison de traitements immunosuppresseurs ciblant les LT et LB du receveur. Ils ont pour but de prévenir les épisodes de rejets aigus, qui prédisposent au rejet chronique et à la perte du greffon. Parfois, un traitement d'induction est nécessaire pendant les premiers jours de la transplantation, faisant appel à des anticorps polyclonaux antilymphocytaires (ATG, « globulines antithymocytes »), ou des anticorps monoclonaux ciblant le CD3 du TCR des LT (Muromonab), le récepteur à l'IL2 (Basiliximab). Suite à cette phase d'induction, une reconstitution immunitaire T est observée, caractérisée par une synthèse thymique de LT naïfs concomitante à une prolifération homéostatique des LT mémoires (11). La reconstitution immune peut être longue, engendrant une lymphopénie T CD4 prolongée chez certains patients. Lorsque l'on prend l'exemple de la transplantation rénale, la lymphopénie T CD4 semble associée à une augmentation de la morbidité (complications infectieuses et cardiovasculaires) et de la mortalité post-transplantation (**Fig.5**) (12).

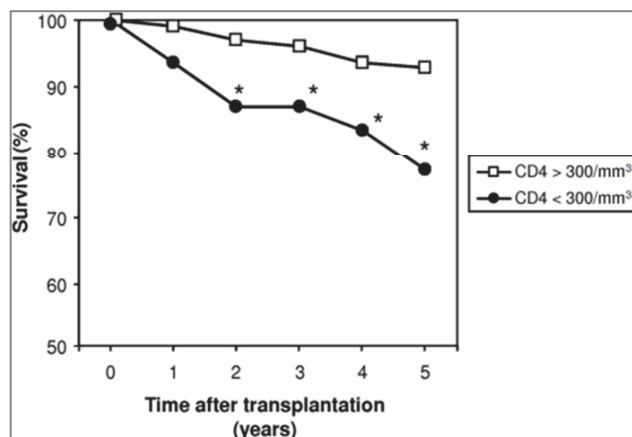


Figure 5. Survie et numération des LT CD4 en transplantation rénale (12)

Les patients étaient stratifiés en deux groupes selon la présence d'une lymphopénie < 300 LT CD4/ μ L persistante plus d'un an post-transplantation (●; n = 81) ou non (□; n = 221). *P < 0.05

Longuet *et al.* ont montré que le nombre de LT CD4 pré-transplantation, ainsi que celui mesuré 1 an après la transplantation, étaient prédictifs de la lymphopénie T CD4 persistante induite par ATG. La numération des LT CD4 pré-transplantation permettrait ainsi d'identifier les sujets à risque de complication à long terme et de sélectionner les immunosuppresseurs utilisés en combinaison avec l'ATG ; en effet, le mycophénolate mofétil et le tacrolimus seraient associés à une diminution persistante des LT CD4 après traitement par ATG, ce qui ne serait pas le cas avec l'azathioprine et la ciclosporine (13).

(2) Rituximab

Le Rituximab est un anticorps monoclonal ciblant l'antigène transmembranaire CD20 des lymphocytes pré-B et B matures et détruisant ainsi ces cellules. Son utilisation est validée dans le traitement des lymphomes non hodgkiniens, des LLC, des polyarthrites rhumatoïdes (PR) et de certaines granulomatoses, et testée dans de nombreux autres contextes (sclérose en plaque et autres pathologies neurologiques (14, 15), prévention des rejets de greffe (16), ...).

En 2008, le Club Rhumatismes et Inflammation (CRI) a publié des recommandations sur la prescription et le suivi des patients sous Rituximab. Le pool de lymphocytes B circulants est déplété pendant environ 6 à 9 mois suivant la prise de Rituximab, puis un nouveau cycle de traitement doit être démarré. Avant l'instauration de ce traitement, un certain nombre d'examen biologiques est recommandé, dont le phénotypage des lymphocytes B et T ; en effet, le dépistage d'une éventuelle lymphopénie permet de prévenir tout risque infectieux, principale complication de cette thérapie. La mise en évidence d'un déficit immunitaire est d'ailleurs une contre-indication à l'instauration du traitement. Par la suite, seule la NFP pour détecter une éventuelle neutropénie est préconisée, tous les 3 mois. Néanmoins, la quantification des sous-populations lymphocytaires circulantes peut être envisagée avant le démarrage d'une nouvelle cure de Rituximab afin d'identifier les patients à risque infectieux élevé, notamment chez ceux traités de façon concomitante par d'autres thérapies immunosuppressives telles que les corticoïdes ou le méthotrexate. Elle permet également de prédire les rechutes de la pathologie auto-immune, puisque celles-ci surviennent généralement lors de la réapparition des LB circulants et de la reprise de la production d'anticorps. Enfin, chez certains patients résistants au traitement par Rituximab, il est parfois envisagé un relai par traitement anti-TNF α , Anakinra ou encore Abatacept ; un délai insuffisant après injection du Rituximab ainsi qu'une déplétion B persistante, évaluée par un phénotypage lymphocytaire, sont des contre-indications pour l'instauration de ces thérapies (17).

En 2009, les centres de référence « Arthrite juvénile » et « Cytopénies auto-immunes de l'enfant » associés au « Club Rhumatisme et Inflammation » ont diffusé des recommandations pour le traitement des enfants par Rituximab dans les contextes de maladies systémiques ou de cytopénies auto-immunes. Un des examens clés avant l'instauration du Rituximab est le phénotypage lymphocytaire B, associé à un phénotypage T en cas de cytopénie auto-immune isolée. En effet, celui-ci permet d'éliminer un éventuel déficit immunitaire commun variable débutant, pour lequel le Rituximab pourrait aggraver l'hypogammaglobulinémie. Après le traitement, seul le phénotypage B est recommandé, 6 mois à 1 an après la première perfusion de Rituximab et/ou avant nouvelle cure (18).

3. Patients séropositifs au VIH et numération des LT CD4

a) Brefs rappels sur l'infection à VIH

L'infection par le VIH est connue depuis maintenant plusieurs années, le premier cas caractérisé datant de 1981 (19). Malgré le développement des traitements antirétroviraux hautement actifs (HAART) depuis 1996 (20) (combinaison d'au moins trois antirétroviraux de classes différentes), l'infection à VIH demeure un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale. En effet, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a reporté 2,1 millions de nouvelles infections dans le monde en 2013, amenant la prévalence à 36,7 millions de personnes infectées, ainsi que 1,1 millions de décès (21). L'Afrique Sub-Saharienne reste la région la plus touchée puisqu'elle représente 70% des personnes infectées dans le monde (21).

Les premiers diagnostics furent réalisés à partir d'infections opportunistes et de sarcomes de Kaposi chez des patients homosexuels, hémophiles ou ayant reçu une transfusion sanguine, mettant ainsi en évidence l'immunodépression sous-jacente à ce syndrome, son origine virale et son mode de contamination (20). Il ne fallut que quelques années pour comprendre que les LT CD4 jouaient un rôle majeur dans l'infection à VIH et le développement du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) : seuls les LT CD4 étaient infectés par le virus *in vitro* (22), l'antigène CD4 était un composant indispensable du récepteur au VIH (22-24), et le nombre de LT CD4 diminuait au fur et à mesure que la maladie progressait (24). Les LT CD4 étant indispensables à la coordination de la réponse immunitaire (RI) cellulaire et humorale contre les antigènes étrangers, il était donc facilement concevable que l'immunodéficience associée à l'infection à VIH était consécutive à la destruction des LT CD4, cibles principales du VIH.

La quantification des LT CD4 demeura jusqu'au début des années 1990 le seul outil diagnostic et pronostic disponible (25), jusqu'à la mise au point de la mesure de la charge virale plasmatique (pCV) (26, 27). Depuis, la numération des LT CD4 s'est révélée indispensable au suivi des patients infectés par le VIH, en association à la pCV, aussi bien en tant que marqueur pronostic que critère d'initiation et de suivi de la réponse aux thérapies antirétrovirales (ART).

b) La numération des LT CD4 comme marqueur pronostic

Hormis la mesure de la charge virale plasmatique, la numération des LT CD4 du sang périphérique est le seul marqueur pronostic validé de l'infection au VIH.

D'une part, lors de la **primo-infection chez des patients non traités**, il a été montré qu'un nombre de LT CD4 inférieur à 500 cellules/ μ L est associé à un risque de progression de 77% à 2 ans

(95% CI, 62%–93%), contre seulement 5% (95% CI, 0%–12%) chez les patients présentant plus de 750 LT CD4/ μ L (Fig.6) (28).

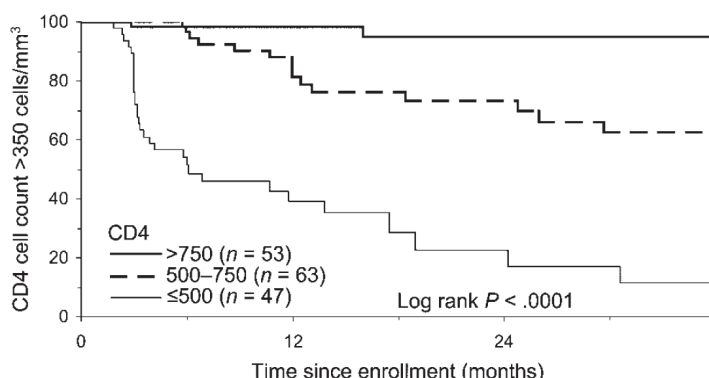


Figure 6. Progression clinique chez les patients VIH+ non traités en fonction de la numération des LT CD4 (28)

De même, Williams *et al.* ont montré que le compte de LT CD4 mesuré lors de la primo-infection à VIH était un facteur prédictif indépendant de progression clinique chez les patients non traités, contrairement à la charge virale plasmatique (Tableau 1) (29).

Tableau 1. Facteurs prédictifs de progression clinique chez les patients VIH+ non traités (29)

Covariate	Univariable unadjusted		Multivariable adjusted	
	HR (95% CI)	p Value	HR (95% CI)	p Value
Total DNA (\log_{10} DNA copies)	4.16 (2.1–8.26)	<0.001	3.57 (1.58–8.08)	0.002
Viral load (\log_{10} RNA copies)	1.74 (1.14–2.67)	0.011	1.25 (0.80–1.95)	0.33
CD4+ T cell count/100 cells	0.66 (0.53–0.82)	<0.001	0.67 (0.53–0.84)	<0.001

Modèle de régression de Cox univarié et multivarié (n=51). Les variables ont été mesurées avant instauration des ARV. La progression clinique était définie par un nombre de CD4 < 350/ μ L ou une initiation des ARV à long terme. CI : Intervalle de confiance ; HR : hazard ratio.

D'autre part, chez des patients en **infection chronique ne recevant pas d'ART ou seulement un ARV en monothérapie**, le risque de progression clinique vers un stade SIDA augmente proportionnellement au déclin du nombre de LT CD4, indépendamment de la charge virale (Tableau 2) (30). De plus, il a été montré que chez les patients en infection chronique depuis plusieurs années, le nombre de LT CD4 est un meilleur marqueur pronostic que la charge virale, dont la valeur prédictive est très importante dans les phases plus précoces de l'infection mais perd de sa puissance avec l'évolution de la maladie (31, 32). Ainsi, la combinaison des deux biomarqueurs prédit de façon encore plus robuste la progression clinique (30, 32).

Tableau 2. Risque de progression clinique vers le stade SIDA en fonction de la numération des LT CD4 (30)

LT CD4/ μ L	Risque relatif	IC 95%
≤ 200	4,0	3,0 – 5,5
200 - 350	2,4	1,9 – 3,1
350 - 500	1,8	1,5 – 2,3
500 - 750	1,5	1,2 – 1,8

Risque relatif ajusté par rapport à un nombre de LT CD4 > 750/ μ L (n=1416). IC : Intervalle de confiance.

Chez les patients initiant les **HAART pendant la phase chronique** de l'infection, le nombre de LT CD4 est un marqueur prédictif indépendant de l'évolution vers le stade SIDA ou le décès, notamment plus sensible que la mesure de la charge virale (**Tableau 3**) (33, 34). La complémentarité de ces deux marqueurs est aussi confirmée chez les patients sous HAART : Yerly *et al.* montrent que le ratio pCV/nombre de LT CD4 est le facteur le plus prédictif de la progression clinique (34), Lundgren *et al.* soulignent l'utilité des scores impliquant les deux variables (33).

Tableau 3. Facteurs associés à la progression clinique chez les patients VIH+ initiant les HAART pendant la phase chronique (33)

Parameter	RH	95% CI	P
Latest CD4 cell count, cells/mm ³			
>200	1.0	—	—
51–200	2.6	1.8–3.6	<.0001
≤ 50	9.3	6.1–14.0	<.0001
Latest virus load, HIV RNA copies/mL			
<500	1.0	—	—
500–9,999	1.3	0.9–2.0	.14
$\geq 10,000$	1.8	1.3–2.5	.001

Model de régression de Cox multivarié (n=2027). Les variables étudiées dans ce modèle étaient le nombre de LT CD4, la pCV, le taux d'hémoglobine et le statut clinique du patient. La progression clinique était définie par le décès ou l'apparition d'un critère de stade SIDA. CI : Intervalle de confiance ; HR : hazard ratio.

Chez des patientes africaines **traitées par HAART dès la PHI**, il a été montré que la numération du nombre de LT CD4 avant instauration des ARV est le seul marqueur pronostic indépendant (**Tableau 4**) (35).

Tableau 4. Facteurs associés à la progression clinique chez les patients VIH+ initiant les HAART pendant la PI

	Univariate Cox model (variables adjusted on ART duration)		Multivariate Cox model (adjusted on ART duration)	
	P-value	HR (CI95%)	P-value	HR (CI95%)
Total HIV-1 DNA (increase of 1 log ₁₀ copies/million CD4 T-cells)	0.001	5.38 (1.95 – 14.79)	0.999	0.99 (0.13 – 7.94)
Integrated HIV-1 DNA (increase of 1 log ₁₀ copies/million CD4 T-cells)	0.028	6.11 (1.22 – 30.64)	0.858	0.78 (0.05 – 12.24)
Plasma viral load (increase of 1 log ₁₀ RNA copies/mL)	< 0.001	1.99 (1.35 – 2.94)	0.768	1.11 (0.54 – 2.28)
CD4+ T-cell count (increase of 100 cells/μL)	< 0.001	0.34 (0.24 – 0.48)	< 0.001	0.47 (0.28 – 0.66)

Modèle de régression de Cox univarié et multivarié (n=82). Les variables ont été mesurées avant instauration des ARV. La progression clinique était définie par un nombre de CD4 < 350/μL ou une initiation des ARV à long terme. CI : Intervalle de confiance ; HR : hazard ratio.

Enfin, The PLATO Collaboration ont montré que dans une cohorte de 2488 **patients en échec thérapeutique**, le nombre de LT CD4 était associé au risque de décès, aussi bien quand mesuré au moment de l'échec thérapeutique que lors du suivi (**Tableau 5**) ; notamment, après échec thérapeutique, la numération de LT CD4 était le seul marqueur prédictif de mortalité, avec un hazard ratio de 2,87 (1,65-5,00) et 15,8 (9,28-27,0) pour des seuils respectifs de 50-200 et <50 cellules/μL, contre 1,02 (0,68-1,55) et 0,97 (0,64-1,48) pour une charge virale de 10 000-100 000 et >100 000 copies/mL respectivement (**Tableau 5**) (36).

Tableau 5. Facteurs prédictifs de mortalité après 3 échecs thérapeutiques (36)

Factor	Relative hazard		
	Univariate	Multivariate (baseline)*	Multivariate (time-updated)*
Viral load at baseline, log₁₀ copies per mL			
<4	1.00†	1.00†	..
4-5	2.58 (1.58-4.19)	1.70 (0.99-2.90)	..
>5	6.78 (4.24-10.8)	2.48 (1.43-4.29)	..
Viral load time-updated, log₁₀ copies per mL			
<4	1.00†	..	1.00
4-5	2.21 (1.51-3.22)	..	1.02 (0.68-1.55)
>5	5.75 (4.09-8.10)	..	0.97 (0.64-1.48)
CD4-cell count at baseline, cells per μL			
>200	1.00†	1.00†	..
50-200	2.86 (1.90-4.32)	2.00 (1.28-3.03)	..
<50	13.7 (9.32-20.2)	6.16 (3.94-9.64)	..
CD4-cell count time-updated, cells per μL			
>200	1.00†	..	1.00†
50-200	3.64 (2.13-6.22)	..	2.87 (1.65-5.00)
<50	27.0 (16.9-43.3)	..	15.8 (9.28-27.0)

Modèle de régression de Cox univarié et multivarié, ajusté sur les caractéristiques démographiques, le stade clinique après 3ème échec thérapeutique et le nombre d'ARV pris après l'échec thérapeutique. « Baseline » correspond au moment de l'échec thérapeutique ; « Time-updated » correspond à n'importe quelle valeur mesurée pendant le suivi du patient. † p < 0.05

c) *La numération des LT CD4, critère d'initiation des ART*

La question perpétuelle soulevée depuis l'avènement des ART en 1996 a été le moment opportun de l'initiation du traitement chez les patients VIH+ (Fig.7) (37). Après quelques années de tâtonnement, le seuil de LT CD4 recommandé a chuté à 200/ μ L au début des années 2000, notamment par prudence à cause de la toxicité des antirétroviraux. Des essais cliniques d'interruption de traitement lorsque les LT CD4 dépassaient 350/ μ L ont alors vu le jour ; en 2006, les résultats de ces essais cliniques ont prouvé que l'interruption des ART sur ce critère était délétère, c'est-à-dire que l'infection par le VIH était plus néfaste que les effets indésirables des antirétroviraux (ARV), d'autant plus dans les pays en voie de développement (38, 39). Entre 2006 et 2010, le seuil de LT CD4 pour l'initiation des ART est augmenté à 350/ μ L, conforté par plusieurs études montrant une diminution de la mortalité et des cas de tuberculose (40, 41). Depuis, le seuil de LT CD4 recommandé par toutes les sociétés savantes a encore augmenté, passant à 500 LT CD4/ μ L, pour notamment prévenir la transmission de l'infection, mais sans bénéfice évident sur la mortalité ou la progression vers le stade SIDA (42). Nous tendons maintenant vers la disparition du compte de LT CD4 comme critère d'initiation des ARV (43).

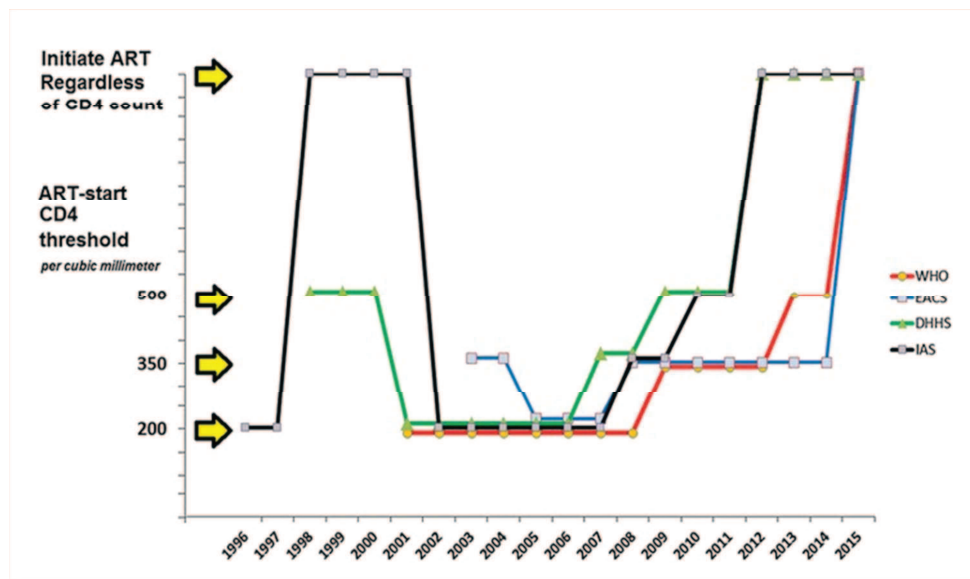


Figure 7. Evolution temporelle du critère LT CD4 pour l'initiation des ARV chez les patients VIH+ asymptomatiques (37)

DHHS: U.S. Department of Health and Human Services; EACS: European AIDS Clinical Society; IAS: International AIDS Society; WHO: World Health Organisation (=OMS)

L'OMS a établi des recommandations internationales en 2013 en faveur d'une ART pour tous les patients présentant un nombre de LT CD4 < 500/ μ L (44) ; ces directives ont amené le nombre de patients séropositifs éligibles à un traitement antirétroviral à 26 millions dans les pays en voie de

développement, contre 17 millions lors des précédentes recommandations de 2010 (44). Ces chiffres devraient encore augmenter avec les nouvelles recommandations de l'OMS de 2015, préconisant que les ART devraient être initiées chez tout patient infecté par le VIH, quel que soit sa numération de LT CD4 (**Tableau 6**) (45). Le risque avec ces nouvelles directives est de passer à côté des individus les plus graves présentant des stades avancés de l'infection, perdus au milieu de ces millions de nouveaux patients éligibles aux traitements ; c'est ici qu'intervient à nouveau la numération des LT CD4, qui figure dorénavant comme critère de gravité dans les recommandations de 2015, aidant à stratifier les patients à prioriser lors de l'initiation des ART (**Tableau 6**) (45).

Tableau 6. Recommandations OMS 2015 pour l'initiation des ART chez les patients VIH+ (45)

Target population	Specific recommendation	Strength of the recommendation	Quality of the evidence
Adults ^a (≥19 years)	ART should be initiated in all adults living with HIV at any CD4 cell count	Strong	Moderate NEW
	As a priority, ART should be initiated in all adults with severe or advanced HIV clinical disease (WHO clinical stage 3 or 4) and individuals with CD4 count ≤350 cells/mm ³	Strong	Moderate
Pregnant and breastfeeding women	ART should be initiated in all pregnant and breastfeeding women living with HIV at any CD4 cell count and continued lifelong	Strong	Moderate UPDATED
Adolescents (10–19 years old)	ART should be initiated in all adolescents living with HIV at any CD4 cell count	Conditional	Low NEW
	As a priority, ART should be initiated in all adolescents with severe or advanced HIV clinical disease (WHO clinical stage 3 or 4) and individuals with CD4 count ≤350 cells/mm ³	Strong	Moderate
Children (1 to <10 years old)	ART should be initiated in all children 1 to <10 years old living with HIV at any CD4 cell count	Conditional	Low NEW
	As a priority, ART should be initiated among all children <2 years old and those with severe or advanced HIV clinical disease (WHO clinical stage 3 or 4) and individuals with CD4% <25% (if <5 years old) or CD4 count ≤350 cells/mm ³ (if ≥5 years old)	Strong	Moderate
Children (<1 year old)	ART should be initiated in all children living with HIV younger than 1 year old at any CD4 cell count	Strong	Moderate

d) La numération des LT CD4, marqueur de la réponse aux ART

Il est reconnu depuis longtemps que la numération des LT CD4 est prédictive de la réponse aux ARV, en termes de progression clinique et d'éventuels échecs thérapeutiques (46-50). Pourtant,

selon les recommandations de l'OMS, le dépistage d'un éventuel échec thérapeutique repose sur la seule mesure de la charge virale plasmatique. Néanmoins, ces récentes directives présentent la numération des LT CD4 comme le principal outil de suivi de la réponse aux ART « si la mesure de la charge virale n'est pas disponible en routine » (44). Cette situation est fréquente dans les pays en voie de développement ; de plus, lorsque le dosage de la pCV est accessible dans ces pays, sa mesure systématique en routine pour le suivi de la réponse aux ART engendrerait des coûts trop importants, non abordables pour la majorité des patients. Ainsi, de nombreuses équipes s'appliquent à élaborer et évaluer des scores cliniques prédictifs des échecs thérapeutiques, n'incluant pas le dosage de la pCV (51-53). Un des objectifs de ces scores serait de cibler les patients à risque de rechute et nécessitant en priorité une mesure de leur pCV, permettant leur prise en charge plus précoce et diminuant ainsi les risques de décès ou évolution de la pathologie ; c'est la notion de « mesure de la pCV ciblée ». Notamment, le score développé par Phan *et al.* (53) est intéressant car il a pu être testé sur site au Cambodge (54) mais également évalué en Ouganda (55) et au Lesotho (56). Ce score clinique prédictif regroupe 8 paramètres, dont 4 reposent sur la numération de LT CD4, mettant en évidence l'importance de cette analyse pour le suivi des patients sous ART lorsque la charge virale n'est pas disponible.

La numération des sous-populations lymphocytaires est donc devenue un examen indispensable pour le suivi et le diagnostic de nombreuses pathologies. La majorité des patients suivis dans notre laboratoire d'immunologie cellulaire étant infectés par le VIH, nous avons décidé de nous focaliser dans cette thèse sur la numération des LT CD4 uniquement. De par l'importance de ce biomarqueur dans la prise en charge de cette pathologie, on comprend bien la nécessité de développer une technique de mesure précise, reproductible et standardisée, utile à la fois pour les analyses de routine des laboratoires de biologie médicale que pour les essais cliniques multicentriques. C'est ainsi que la cytométrie en flux, technologie connaissant ses balbutiements au moment de la découverte de l'infection à VIH, a commencé à se répandre dans les laboratoires hospitaliers, pour devenir aujourd'hui la méthode de référence de numération des LT CD4.

B. La cytométrie en flux, méthode de référence de la numération des LT CD4

1. Historique

a) *Développement de la cytométrie en flux*

La cytométrie en flux est considérée comme la méthode de référence pour la numération des LT CD4. Le premier « trieur de cellules marquées par fluorescence » (FACS) apparut à la fin des années 1960, grâce à Leonard Herzenberg, généticien et immunologiste, lassé de passer de longues heures dans une pièce noire à compter manuellement des cellules fluorescentes au microscope ; en effet, il décida d'ajouter une source lumineuse et des photomultiplicateurs au trieur de cellules inventé par Mack Fulwyler à partir d'un compteur Coulter. Ainsi, les cellules marquées par un anticorps couplé à un fluorochrome pouvaient être identifiées par leur signal fluorescent plutôt que par leur simple volume cellulaire. Dans les années 70, le développement de la technique d'hybridome par César Milstein, permettant la production d'anticorps monoclonaux, signa les débuts du succès du phénotypage lymphocytaire en clinique (57).

Les premiers cytomètres étudiaient les leucocytes issus d'échantillons centrifugés en gradient de densité pour éliminer les érythrocytes ; seuls 3 paramètres cellulaires pouvaient être analysés simultanément : la taille (forward scatter, FS), la granulosité (side scatter, SS) et un unique signal fluorescent (Isothiocyanate de fluorescéine, FITC) ne permettant d'identifier qu'une seule propriété extrinsèque de la cellule. On pensait alors que cette stratégie était suffisante, considérant que chaque marqueur était spécifique d'une seule lignée cellulaire et d'une seule fonction (58). Quelques années seulement suffirent à montrer que le CD4 était exprimé aussi bien par les LT que les monocytes. De même, on découvrit que le CD8 était retrouvé à la surface des LT et des NK ; et ensuite, que les CD4 et les CD8 n'étaient pas des marqueurs spécifiques de lignée mais seulement de fonction (58).

Au milieu des années 80, la seconde génération de cytomètres fit son apparition grâce à la mise au point des lasers à argon refroidi par air et l'arrivée d'un deuxième fluorochrome (Phycoérythrine, PE). Ces cytomètres permirent alors l'analyse simultanée des 4 paramètres FS, SS, signal fluorescent du FITC et du PE. La disponibilité d'un deuxième fluorochrome boosta également le développement d'autres anticorps monoclonaux dirigés contre différents épitopes leucocytaires. A la même époque, des techniques simples et plus reproductibles sur sang total virent le jour grâce à l'ajout d'une étape de lyse des érythrocytes. Des mélanges de couples d'anticorps furent commercialisés, avec des concentrations optimales d'anticorps prêts à l'emploi. Ces étapes signèrent la démocratisation de l'analyse par CMF, accessibles dorénavant aux petits laboratoires (58). Dès le

début des années 1990, un troisième fluorochrome vu le jour, le premier fluorochrome tandem naturel : la protéine chlorophylle-peridine (PerCP) ; s'ensuivirent la commercialisation de nombreux fluorochromes tels que l'ECD et du CyChrome (58). Coulter en 1994 fut le premier à mettre au point une technique de cytométrie à 4 couleurs utilisable en clinique et ne nécessitant qu'un seul laser. La société Becton Dickinson (BD) en 1996 fut la première à commercialiser une technique 4 couleurs, mais basée cette fois sur l'emploi de 2 lasers (58). De nos jours, les cytomètres peuvent être équipés jusqu'à 5 lasers et détecter 18 fluorescences simultanées (BD FACS Aria SORP, FORTESSA LSR II) ; BD a même annoncé en début d'année 2016 le lancement du cytomètre FACSymphony™, qui serait capable d'analyser plus de 50 paramètres de façon concomitante (59). L'évolution de cette technologie ne s'arrête pas là ; en effet, une nouvelle technique de « cytométrie de masse », associant la cytométrie de flux à la spectrométrie de masse, permet d'analyser plus d'une trentaine de marqueurs cellulaires simultanément, grâce à un marquage par des anticorps couplés à des métaux lourds (60). Grâce à ces modifications successives, la cytométrie en flux est en constante évolution et est utilisée dans de multiples applications cliniques (**Tableau 7**) (61).

Tableau 7. Applications cliniques de la cytométrie en flux (61)

<i>Recent Clinical Cytometric Tests</i>	
1.	Immunophenotyping
a.	Leukocyte differential (immuno diff)
b.	Lymphocyte subsets (secondary immunodeficiencies, HIV...)
c.	Primary immunodeficiencies (SCID, CVID...)
d.	Lymphoma
e.	Acute leukemia
f.	Multiple myeloma
g.	Stem cells (CD34)
h.	PNH
i.	HLA-B27
j.	Monocyte immunoparalysis (HLA-DR on monocytes)
2.	Nucleic acid analysis
a.	DNA content (aneuploidy)
b.	Cell cycle analysis
c.	RNA content (retics, reticulated platelets)
3.	Autoantibodies against...
a.	Platelets (screening for platelet associated immunoglobulin or specific SASPA)
b.	Neutrophils (IgG)
c.	Lymphocytes (HIV)
d.	Donor cells (flow crossmatch in transplantation)
4.	Cellular function
a.	Lymphocyte transformation (Scatter, CD69, BrdU...)
b.	Cytokine secretion tests (intracellular cytokines)
c.	NK-Assay (natural killer assay eg. with tumor target cell line K652)
d.	Phagocytosis
e.	Oxidative burst
f.	Chemotaxis
g.	Basophil degranulation (allergy test)
h.	Serotonin release (gray platelet syndrome)
5.	Dye binding
a.	EMA-Test for spherocytosis
6.	Suspension bead arrays

b) Numération des LT CD4

Deux méthodes reposant sur la cytométrie de flux sont couramment utilisées pour la numération des LT CD4.

(1) Les méthodes double-plateforme

Les méthodes double-plateforme nécessitent deux instruments pour obtenir le résultat de la numération des LT CD4 : un automate d'hématologie pour déterminer le nombre de leucocytes et lymphocytes, et un cytomètre de flux pour mesurer la proportion de LT CD4 et en déduire la valeur absolue correspondante (62, 63). La population de référence, généralement les lymphocytes, doit être définie avec la plus grande précision ; en effet, dans cette méthode, la précision du résultat en valeur absolue est déterminée par celle de l'automate d'hématologie et est basée sur un chevauchement exact des critères de définition des lymphocytes sur les deux automates. Le but est d'inclure tous les lymphocytes (recouvrement) tout en excluant les cellules non désirées afin de maintenir une pureté la plus optimale possible ; notamment, la discrimination lymphocytes/monocytes est un point majeur de l'identification correcte des lymphocytes. Ainsi, malgré les progrès réalisés en termes de standardisation et contrôles de qualité, la combinaison de multiples technologies augmente indéniablement la variabilité des résultats. Ceci est particulièrement problématique dans les études multicentriques utilisant différents automates d'hématologie, notamment lors des études sur des patients HIV+ (1).

En 1997, le CDC (Centers for Disease Control and Prevention) a publié des recommandations internationales pour la numération des LT CD4 chez les patients VIH+ par méthodes double-plateforme, majoritairement utilisées à cette époque. Le principal argument portait sur le fenêtrage des lymphocytes, paramètre critique des méthodes double-plateforme; le marquage deux couleurs étant le plus répandu, le CDC recommandait l'utilisation d'au moins trois tubes contenant respectivement des anticorps anti-CD45/CD14, anti-CD3/CD4 et anti-CD3/CD8. Le CDC soulignait l'importance d'obtenir un taux de recouvrement supérieur ou égal à 95%, et un taux de pureté supérieur ou égal à 90% pour valider les résultats (64).

(2) Les méthodes simple-plateforme

La méthode simple plateforme a été développée ultérieurement, et ne requiert qu'un seul automate, le cytomètre de flux. Aucune population de référence n'est nécessaire à la détermination des valeurs absolues de la population d'intérêt, puisque celle-ci est directement identifiée par une combinaison de marqueurs de lignée, et les cellules correspondantes énumérées (1). La valeur absolue de la population d'intérêt provient en majorité de l'utilisation de billes de calibration couplées à des fluorochromes et ayant été ajoutées en volume égal au sang total ; l'utilisation de

pompes volumétriques qui rapportent le nombre d'évènements comptés à un volume précis de sang total analysé est également possible. Dans ce contexte, il apparaît évident que le principal facteur de variabilité de la méthode simple-plateforme est l'étape de prélèvement. L'utilisation de billes calibrées est délicate ; elle implique une homogénéisation parfaite de la solution de billes (sédimentation, agrégats) et des opérateurs qualifiés, habitués à utiliser la technique recommandée de pipetage inverse (bulles, adhérence aux parois du tube, ...) (1, 65). Pour les techniques volumétriques, la calibration de l'instrument est fondamentale et la précision du volume échantillonné doit être contrôlée régulièrement. Malgré cette apparente complexité, il a été montré que les méthodes simple-plateforme présentent une meilleure reproductibilité que les méthodes double-plateforme (65-67).

En 2003, le CDC a élaboré de nouvelles recommandations aux vues de l'expansion des techniques simple-plateforme. Le but de ces recommandations était d'augmenter la reproductibilité et l'exactitude des résultats, améliorer la prise en charge des bilans posant des problèmes de fenêtrage des populations lymphocytaires et diminuer le nombre de ré-analyses nécessaires. Premièrement, la stratégie de fenêtrage préconisée pour l'identification des lymphocytes est l'association du paramètre de diffraction de la lumière SS au marqueur pan-leucocytaire CD45 : cellules CD45^{hi} SS^{lo}. En effet, il a été montré que les laboratoires n'utilisant pas le CD45 avaient deux ou trois fois plus de chance de rendre des résultats inexacts de LT CD4 (1, 68). Ensuite, un marquage trois ou quatre couleurs est conseillé (68) ; ainsi, pour le marquage trois couleurs, deux tubes différents avec les anticorps anti-CD45/CD3/CD4 et anti-CD45/CD3/CD8 doivent être réalisés, avec une discordance entre le résultat de LT CD3+ <2% entre les tubes ; le marquage 4 couleurs doit combiner anti-CD45/CD3/CD4/CD8. Enfin, avec une technique simple-plateforme, le CDC recommande l'utilisation d'une lyse sans lavage. Les techniques de lyse sans lavage entraînent davantage de bruit de fond et éliminent peu les débris cellulaires par rapport aux lyses avec lavage ; de plus, certains réactifs de lyse peuvent altérer les caractéristiques cellulaires (SS, FS et marqueurs de surface) (1). L'avantage principal des techniques sans lavage est que la relation initiale entre le nombre de cellules sanguines et le volume sanguin est entièrement conservée grâce à des facteurs de dilution connus, permettant une détermination précise des valeurs absolues. De plus, ces techniques s'affranchissent des inconvénients liés aux manipulations et centrifugations multiples : perte cellulaire et formation d'agrégats cellulaires exclus du fenêtrage des lymphocytes à cause de leur taille importante (62). Ainsi, l'utilisation de cette technique de lyse améliore l'exactitude et la reproductibilité des résultats (1, 62).

2. Problématique actuelle d'accréditation de la cytométrie en flux

La norme ISO 15189 a été créée en 2003 dans le but d'homogénéiser les pratiques et le rendu des résultats biologiques par les laboratoires médicaux au niveau international. L'accréditation d'un laboratoire atteste que celui-ci a répondu aux exigences de qualité internationales et génère des données robustes et comparables. C'est un processus continu, à renouveler. Elle n'impose pas aux laboratoires de travailler dans des conditions exactement identiques, mais s'assure que des procédures de qualité sont en place pour monitorer les diverses étapes conduisant au résultat biologique, identifiant, résolvant et traçant toute erreur potentielle pouvant impacter le résultat (61).

Le processus d'accréditation implique bien sûr pour le laboratoire de démontrer sa compétence dans une méthode spécifique, utilisée dans les indications appropriées. Il implique également d'améliorer sa politique de management dans sa globalité, en comprenant le fonctionnement de l'ensemble de la structure hospitalière, en clarifiant les procédures et les tâches de chaque membre de l'équipe, en s'assurant du bon déroulement de chaque étape pré-analytique/analytique/post-analytique, ou encore en garantissant la formation continue du personnel. La finalité de cette démarche est d'éviter les erreurs, améliorant ainsi la confiance des patients, médecins et partenaires du laboratoire médical (61).

L'accréditation n'est pas obligatoire en Europe, mais l'est en France, encadrée par le Comité Français d'Accréditation (COFRAC). De façon intéressante, l'ESCCA (European Society of Clinical Cell Analysis) a testé l'opinion des cytométristes en Europe vis-à-vis de l'accréditation en 2010. Sur 157 participants, 98% reconnaissent la nécessité d'accréditation, mais seulement 19% étaient entrés activement dans le processus (61). Pourtant, la cytométrie en flux est une méthode complexe, qui reste peu standardisée malgré son essor et l'importance des résultats biologiques qu'elle engendre pour le suivi des patients et les décisions cliniques et thérapeutiques. De plus, ce manque de standardisation représente une limite aux essais cliniques inter-laboratoires (61). Les techniques de cytométrie en flux, décrites précédemment, sont très variées ; elles utilisent des réactifs et des réglages des automates différents d'un laboratoire à l'autre, et ne se basent généralement sur aucune référence reconnue. Des contrôles quotidiens de la stabilité des cytomètres sont requis pour évaluer les éventuels problèmes au niveau de la fluidique, des lasers et des photomultiplicateurs (e.g. Flow-Set™ et Flow-Check™ Fluorospheres, Beckman Coulter). De plus, le but de la cytométrie en flux est de caractériser une population cellulaire dynamique au sein de cellules hétérogènes et variables, ce qui implique que l'analyse d'un patient à l'autre n'est jamais identique. Ainsi, la cytométrie en flux requiert des opérateurs très expérimentés. On comprend donc bien tout l'enjeu et la difficulté de l'accréditation de cette méthode d'analyse.

Pour pallier à certaines de ces difficultés, la société Beckman Coulter (BC) a récemment proposé un nouveau cytomètre de flux, appelé AQUIOS CL. Il se base sur une méthode simple plateforme, volumétrique, totalement automatisée pour énumérer les sous-populations lymphocytaires T, notamment CD4. Seuls les réactifs dédiés à l'AQUIOS CL peuvent être utilisés, et aucune calibration n'est requise en dehors des maintenances annuelles préventives. Des contrôles de qualité internes et externes internationaux ont été conçus spécifiquement pour cet automate. Ainsi, l'AQUIOS CL pourrait répondre plus aisément aux critères d'accréditation définis dans la norme ISO 15189 (61, 69-71), et son utilisation permettre une meilleure standardisation des résultats de numération de LT CD4 entre différents laboratoires (72).

3. L'AQUIOS CL

Beckman Coulter a récemment commercialisé un nouveau cytomètre de flux: l'AQUIOS CL. Il a été accepté en novembre 2015 à la préselection du Programme de Diagnostic In Vitro de l'OMS (73). L'AQUIOS CL peut donc dorénavant être utilisé spécifiquement pour le diagnostic ou le suivi immunologique des patients immunodéprimés ; ainsi, cet automate a été conçu pour prendre en charge les phénotypes lymphocytaires de routine, notamment la numération des valeurs absolues de LT CD4.

L'AQUIOS CL est un système simple plateforme, automatisé, qui détermine les valeurs absolues des cellules par analyse volumétrique, sans utilisation de billes calibrées. Aucune calibration, aucune standardisation journalière des paramètres d'acquisition (*i.e.* pas de billes Flow-Set™ Fluorospheres – Beckman Coulter) ni aucun contrôle journalier du laser et de la fluidique (*i.e.* billes Flow-Check™ Fluorospheres – Beckman Coulter) n'est nécessaire. Le bon fonctionnement du cytomètre est suivi par le passage quotidien des contrôles internes de qualité (CQI). Un système d'algorithmes complexes fenêtré les différentes sous-populations d'intérêt, limitant théoriquement la relecture manuelle par l'opérateur. L'AQUIOS CL semble donc être une alternative aux techniques actuelles de cytométrie, complexes, coûteuses et requérant des opérateurs très expérimentés.

a) *Présentation et principe de fonctionnement*

L'AQUIOS CL est composé de plusieurs entités : le cytomètre lui-même ; une station de travail à partir de laquelle est piloté le cytomètre et sur laquelle les résultats sont validés techniquement ; un gestionnaire d'alimentation permanente (ondulateur) ; le chariot d'alimentation, contenant notamment le container de liquide de gaine et celui des déchets (**Fig.8**).

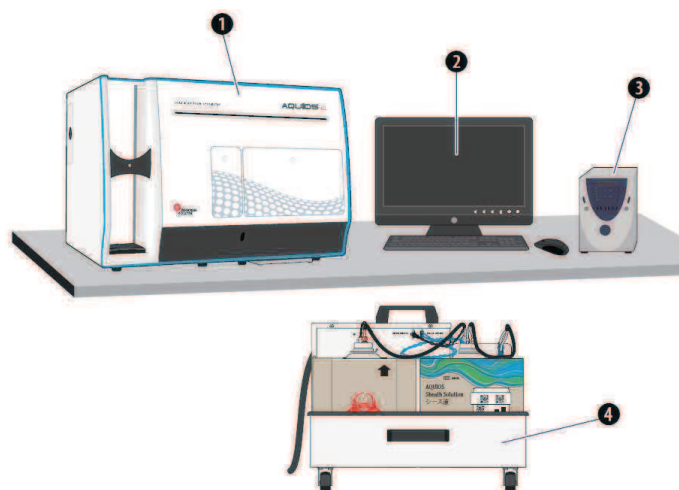


Figure 8. Composants de l'AQUIOS CL

1. Cytomètre ; 2. Station de travail ; 3. Gestionnaire d'alimentation permanente ; 4. Chariot d'alimentation

L'AQUIOS CL effectue des analyses multiparamétriques grâce à un laser solide bleu de 488 nm, quatre canaux de fluorescence (**Fig.9**), une détection de diffusion axiale (FS) et de diffusion orthogonale (SS), ainsi que des mesures d'amplitudes volumétriques (EV : volume électronique).

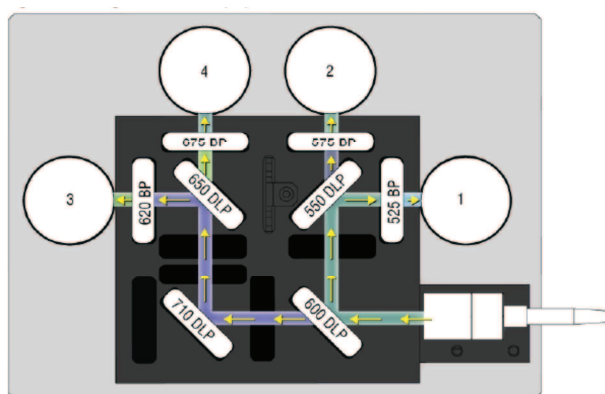


Figure 9. Banc optique de l'AQUIOS CL

Le détecteur de volume électronique mesure l'impédance électrique de la cellule. La cellule de mesure est remplie de liquide de gaine conducteur et contient deux électrodes qui créent un léger courant à travers l'ouverture de la cellule de mesure. Lorsqu'une particule (érythrocyte, leucocyte, débris...) est aspirée dans le canal de la cellule de mesure, son volume déplace une quantité équivalente de solution d'électrolytes. Ceci modifie l'impédance de la cellule d'analyse et engendre un signal électrique qui est proportionnel au volume particulaire ; ce signal est appelé volume électronique. La mesure de volume électronique est basée sur le principe Coulter et n'est disponible sur aucun autre cytomètre de flux utilisé en clinique (74).

L'AQUIOS CL utilise une technologie appelée « Load & Go » : il prend entièrement en charge l'analyse, de l'identification de l'échantillon au rendu du résultat dans un système totalement fermé. A partir d'un échantillon de sang total prélevé sur tube EDTA, les différentes étapes du processus analytique sont les suivantes :

- Chargement du tube sur une cassette : le tube doit présenter un code-barres, transmettant au cytomètre les informations relatives au patient ainsi que l'analyse à effectuer.
- Préparation
 - o Le code-barres est scanné.
 - o L'échantillon est agité puis 140 µL de sang sont aspirés par la seringue de préparation
 - Il est à noter qu'aucun échantillon ne doit théoriquement être débouché puisque les bouchons perçables sont pris en charge sur l'AQUIOS CL ; ceci limite nettement le risque infectieux lié aux manipulations habituellement requises sur les autres cytomètres.
 - o Seuls 43 µL de sang sont déposés dans un puits de la plaque 96 puits, et mélangés à 13 µL d'anticorps monoclonaux du panel Tétra-1.
- Incubation de 15 minutes.
- Lyse du sang par 335 µL de réactif de lyse A, homogénéisation, puis ajout de 100 µL de réactif de lyse B ; incubation de 2 min.
- Analyse : aspiration de 100 µL de la préparation par l'aiguille de l'analyseur et acheminement jusqu'à la cellule d'analyse. Le temps d'analyse est de 45 secondes avec une vitesse d'injection de 70 µL/min.

Le temps entre le chargement d'un échantillon de sang et le résultat pour le premier échantillon est d'environ 20 minutes. Les résultats d'échantillon suivants sont rapportés toutes les deux minutes environ. L'AQUIOS CL est connecté directement au LIS (système d'informations du laboratoire) qui lui envoie les données associées à chaque code-barres (démographie du patient, bilan à effectuer, ...) et récupère les résultats après validation technique sur l'AQUIOS CL.

L'AQUIOS CL possède un système de lecteurs de code-barres, qui scannent et identifient tous les réactifs présents sur l'automate. Le numéro de lot, numéro de flacon, la date d'expiration, la date d'expiration à bord, le nombre de tests réalisables avec chacun des réactifs ainsi que le volume du liquide de gaine, du container à déchet et du liquide de rinçage sont automatiquement enregistrés et mis à jour au passage de chaque nouvel échantillon.

b) Stratégie d'identification des populations cellulaires

L'AQUIOS CL permet l'identification et la mesure simultanées des pourcentages et des valeurs absolues des populations de lymphocytes totaux T, B et natural killer (NK). Nous ne réalisons pas le phénotypage des LB et NK sur l'AQUIOS CL au laboratoire. Les anticorps monoclonaux utilisés pour le phénotypage des sous-populations lymphocytaires T sont conditionnés sous forme d'un mélange dénommé « Tétra 1 » dans un unique flacon. Le panel Tétra 1 est composé des anticorps couplés aux fluorochromes suivants : CD45-FITC / CD4-PE / CD8-ECD / CD3-PC5. Cette combinaison d'anticorps permet la numération des paramètres suivants :

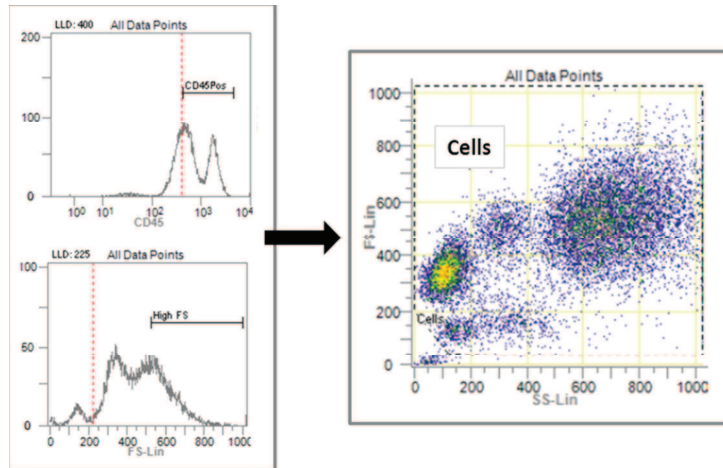
Leucocytes CD45+
Lymphocytes totaux
Lymphocytes T CD3+
Lymphocytes T « helper » CD3+CD4+
Lymphocytes T "cytotoxiques" CD3+CD8+
Rapport LT CD4/LT CD8
Lymphocytes T double-positifs CD3+CD4+CD8+
Lymphocytes T double-négatifs CD3+CD4-CD8-

La stratégie d'identification des populations lymphocytaires de l'AQUIOS CL est très complexe et fait appel à plusieurs algorithmes qu'il est indispensable d'avoir assimilés afin de comprendre et d'être critique quant aux résultats rendus par l'automate.

- **Exclusion des débris.**

A partir de l'ensemble des éléments détectés par le cytomètre, « **All Data Points** », deux histogrammes monoparamétriques sont tracés : CD45 et FS. Des **discriminants de signal CD45 et de taille** sont définis (pointillés rouge), excluant ainsi de l'analyse les débris de petite taille, les globules rouges mal lysés et autres éléments CD45 négatifs.

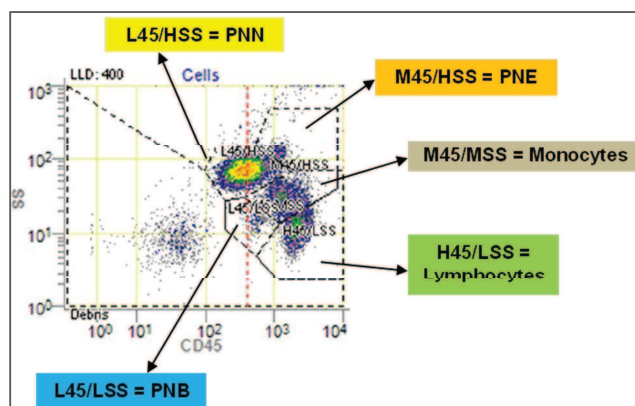
A partir de *All Data Points*, un graphe biparamétrique FS/SS est créé : tous les éléments dont les signaux en FS et/ou en CD45 sont supérieurs aux discriminants y apparaîtront. Ainsi, la région « **Cells** » est définie, excluant les débris de faible FS/SS.



- **Identification et numération des leucocytes.**

Un graphe biparamétrique SS/CD45, issu de la région *Cells*, permet d'identifier les sous-populations leucocytaires. La numération des leucocytes totaux est définie par l'algorithme suivant :

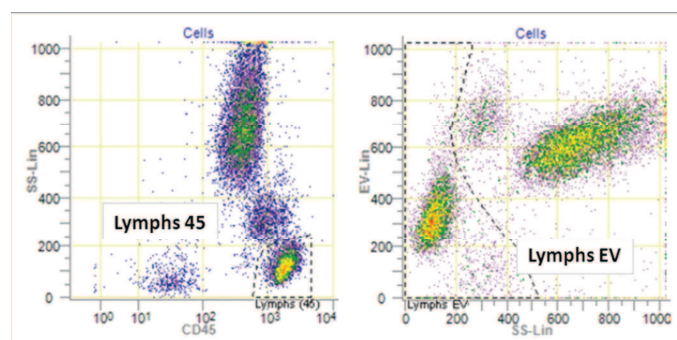
L45/HSS OU M45/HSS OU M45/MSS OU H45/LSS OU L45/LSS



- **Identification des lymphocytes.**

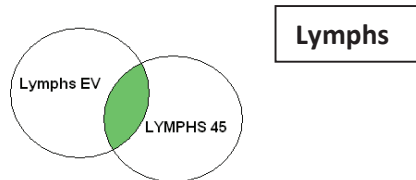
A partir de *Cells*, on définit deux graphes et deux régions distinctes incluant les lymphocytes :

- Région « **Lymphs 45** » sur le graphe biparamétrique SSLin/CD45
- Région « **Lymphs EV** » sur le graphe biparamétrique EVLin/SS



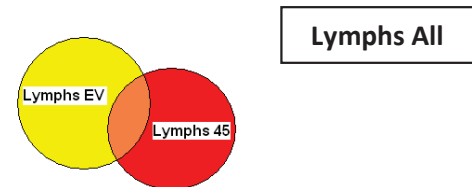
Deux fenêtres sont ensuite définies, représentant respectivement la pureté (« *Lymphs* ») et le recouvrement (« *Lymphs All* ») des lymphocytes :

- « **Lymphs** » est définie par l'algorithme ***Lymphs EV ET Lymphs 45***.
- « **Lymphs All** » est définie par ***Lymphs EV OU Lymphs 45***.



Les cellules sont considérées comme des lymphocytes si elles **appartiennent à la fois** aux 2 régions Lymphs EV et Lymphs 45 (**en vert**).

- ⇒ **Pureté +++ car les monocytes seront exclus par une des deux régions**
- ⇒ Par contre, on perd des lymphocytes qui ne seraient que dans une seule des deux régions = **mauvais**



Les cellules sont considérées comme des lymphocytes si elles sont présentes **dans au moins une des régions** Lymphs EV ou Lymphs 45

- ⇒ **Recouvrement maximal +++ car on ne perd aucun lymphocyte**
- ⇒ Par contre, la **pureté est beaucoup moins bonne** car des monocytes peuvent avoir été inclus dans l'une ou l'autre des régions

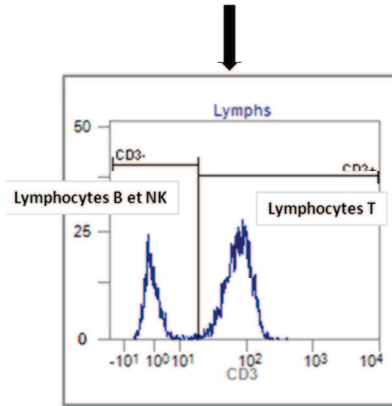
- **Identification des sous-populations lymphocytaires.**

A) A partir de *Lymphs*, région constituée exclusivement de lymphocytes, un histogramme monoparamétrique CD3 est créé. On y définit la position d'un curseur séparant les lymphocytes **CD3+** des lymphocytes **CD3-**.

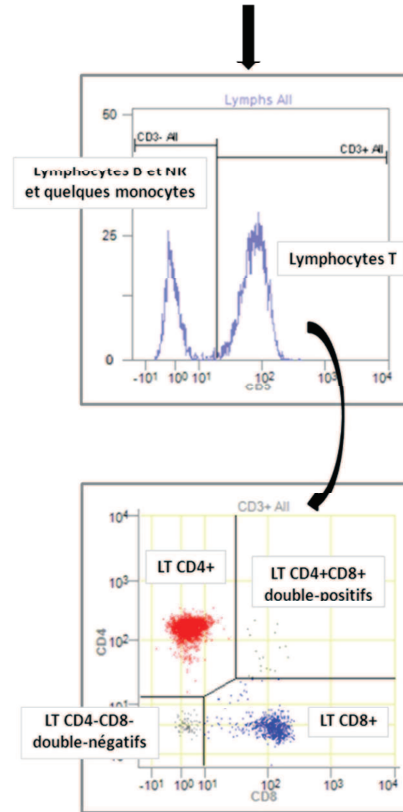
B) Ce curseur est copié exactement à la même place sur un histogramme monoparamétrique CD3 issu de *Lymphs All*, contaminé parfois par des monocytes et donc moins adapté pour séparer la population CD3- (« **CD3- All** ») des cellules CD3+ (« **CD3+ All** »).

A partir de **CD3+All**, un graphe biparamétrique CD4/CD8 est dessiné, à partir duquel on peut identifier et numérer les LT CD4+, CD8+, double-positifs CD4+CD8+ et double-négatifs CD4-CD8-.

A) Lymphs 45 AND Lymphs EV



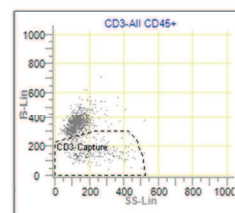
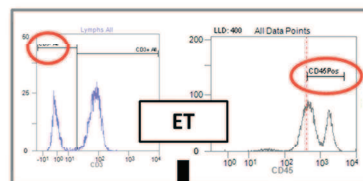
B) Lymphs 45 OR Lymphs EV



• **Numération des lymphocytes totaux.**

Le compte de lymphocytes totaux est une valeur reconstituée :

Lymphocytes Totaux = CD3+All OU CD3- OU CD3-Capture



Dans la fenêtre CD3-Capture, les monocytes inclus éventuellement dans CD3-All sont exclus par critère de taille FS.

- **Détermination des résultats en pourcentage.**

Tous les résultats en pourcentage sont **issus de calculs** par rapport aux lymphocytes totaux; seules les valeurs absolues (VA) des différentes populations sont mesurées par le cytomètre.

- % Lymphocytes CD3+ = $(VA\ CD3+ / VA\ Lymphs\ Total) \times 100$
- % LT CD4+ = $(VA\ LT\ CD4+ / Lymphs\ Total) \times 100$
- % LT CD8+ = $(VA\ LT\ CD8+ / Lymphs\ Total) \times 100$

c) Calibration et contrôles

Le contrôle des performances d'un cytomètre est fondamental. On surveille généralement quotidiennement la stabilité optique, la linéarité de fluorescence (dépendante du fonctionnement correct des photomultiplicateurs), la fluidique, la sensibilité et la résolution de l'instrument. Sur l'AQUIOS CL, ceci est réalisé lors de l'installation et des maintenances annuelles : l'alignement du laser est vérifié à l'aide de billes Flow-Check™ Fluorosphères passées 10 fois de suite ; la standardisation est effectuée et contrôlée à l'aide de billes AQUIOS Rainbow Fluorescent, la calibration de l'instrument est réalisée à l'aide d'un calibrateur (AQUIOS Calibrator) ; 3 passages successifs d'Immuno-Trol™ Cells mélangés à des billes Flow-Count™ Fluorosphères engendrent le calcul de valeurs de correction qui permettent la standardisation de l'automate ; les compensations sont réglées à l'aide des deux niveaux d'Immuno-Trol™, mais peuvent être modifiées par les utilisateurs qualifiés.

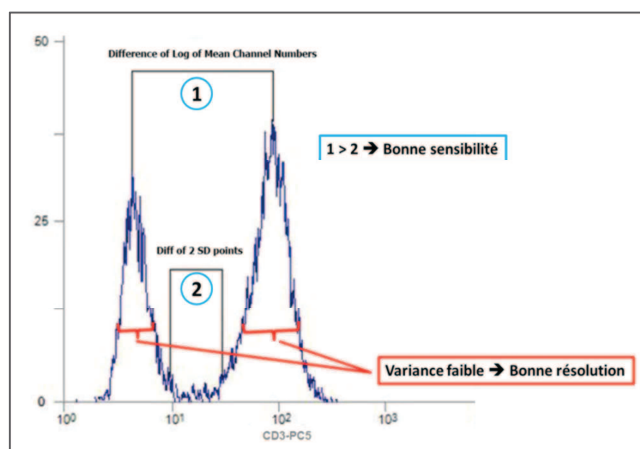
Par la suite, l'AQUIOS CL ne nécessite aucun contrôle quotidien en dehors des CQI. Les CQI employés sont des préparations stabilisées de leucocytes et érythrocytes humains, présentant deux niveaux de concentration de LT CD4 : l'AQUIOS Immuno-Trol™ Cells et AQUIOS Immuno-Trol™ Low Cells. Par l'intermédiaire des résultats de ces CQI, le système vérifie automatiquement la stabilité électronique, fluidique et optique de l'instrument, ainsi que le réglage de compensation. Les données de contrôle sont automatiquement inscrites dans les graphes de Levey-Jennings de différents onglets : résultat, dérive de l'instrument et séparation de l'instrument.

L'onglet « Résultat » permet de suivre les modifications au fil du temps des valeurs absolues et des pourcentages des leucocytes, lymphocytes totaux, LT CD3+, CD4+ et CD8+. Celles-ci reflètent la précision et la stabilité de l'instrument, ainsi que la performance/intégrité des réactifs utilisés.

L'onglet « Dérive de l'instrument » permet de surveiller l'intensité de la fluorescence sur une période donnée pour les canaux CD3, CD4, CD8, FS, SS et CD45.

Dans **l'onglet « Séparation de l'instrument »**, le quotient de séparation (SQ) est un indicateur de sensibilité relative (aptitude à distinguer de très faibles signaux par rapport au bruit de

fond) et de résolution (capacité de mesurer deux particules avec la même quantité de fluorescence et de leur attribuer le même signal) du cytomètre. Plus le quotient de séparation est élevé, meilleure est la séparation ; le SQ recommandé est > 0 .



Le SQ permet de s'assurer de la discrimination entre :

- Lymphocytes CD3⁻ et CD3⁺ sur l'histogramme monoparamétrique CD3 issu de Lymphs
- Lymphocytes CD4⁻ et CD4⁺ sur l'histogramme monoparamétrique CD4 issu de CD3+
- Lymphocytes CD8⁻ et CD8⁺ sur l'histogramme monoparamétrique CD8 issu de CD3+
- Lymphocytes et PNN pour les paramètres CD45, SS, et FS
 - o Comparaison du signal entre les populations Lymphs 45 et L45/HSS (issue du graphe des leucocytes CD45/SS)

De façon intéressante, un contrôle qualité en temps réel est performé sur l'AQUIOS CL lorsque les échantillons des patients sont analysés. Il permet de monitorer la qualité de l'analyse pour chaque patient et engendre des alarmes spécifiques si nécessaire (**Tableau 8**).

Tableau 8. Points de contrôle de qualité en temps réel (75)

Tracking	What is tracked	What is accomplished
Mean channel of key cell populations	Lymphocytes and monocytes (Scatter and Fluorescence)	Detects any drift and ensures instrument stability
Event rate/sec	All Events	Monitors flow rate for bubbles or flow irregularity
Compensation	Compensation matrix	Ensures that compensation values are appropriate for the application being performed
Cell debris	Percent debris	Monitors the percent of unlysed cells or unusual contamination or debris in the sample
Separation Quotient	The distance between relevant populations as a means of measuring both system sensitivity and resolution as a function of separation	Ensures that sample preparation, fluidics, and alignment are performing sufficiently

Enfin, pour les techniques volumétriques, la précision du volume échantillonné doit être régulièrement contrôlée. Deux seringues sont impliquées dans le processus d'analyse sur l'AQUIOS CL : la seringue de préparation, qui échantillonne et distribue les réactifs, et la seringue de l'analyseur qui aspire la préparation et l'envoie dans la cellule d'analyse. Les volumes pris en charge par ces seringues doivent être contrôlés tous les 6 mois par un test de gravimétrie, par les opérateurs du laboratoire. Ce paramètre est critique pour l'obtention de résultats corrects puisqu'il est à la base du principe de numération des populations lymphocytaires. Pour contrôler la justesse et la précision des seringues, un test de gravimétrie est recommandé tous les 6 mois. La seringue de préparation est testée sur un volume de 400 μL , sachant que les volumes utilisés pendant le processus d'analyse s'étendent de 13 μL à 335 μL . La seringue d'analyse prenant en charge 100 μL de préparation est testée sur un volume total de 1,2 mL.

C. Conclusion

Standardiser et accréditer les analyses de cytométrie en flux reste un véritable enjeu pour les laboratoires de biologie médicale spécialisés en immunologie cellulaire. Dans ce contexte, l'avènement de la cytométrie « automatisée », type AQUIOS CL, pourrait représenter une évolution majeure. Dans cette thèse, nous avons donc évalué les performances de l'AQUIOS CL dans différentes conditions pour la numération des LT CD4.

TRAVAIL PERSONNEL

V. TRAVAIL PERSONNEL

Mon travail personnel s'inscrit dans le cadre de l'acquisition et l'installation des AQUIOS CL au laboratoire d'immunologie cellulaire de l'hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon. L'activité du laboratoire d'immunologie cellulaire est d'environ 6 millions de B annuels, parmi laquelle la réalisation d'environ 13.000 phénotypages lymphocytaires T CD4.

Nous avons focalisé notre attention sur trois étapes :

- Evaluation de type β -test sur site d'un AQUIOS CL : il est de pratique assez répandue que les sociétés mettent à disposition de quelques utilisateurs potentiels leur produit avant commercialisation, afin de le mettre à l'épreuve dans un contexte d'utilisation de routine. Cette démarche est valable aussi pour les automates de laboratoire. Ainsi, un an et demi avant son acquisition, nous avons pu évaluer les performances de l'AQUIOS CL dans un contexte clinique, de routine, en tant qu'opérateur indépendant.
- Validation de méthode au moment de l'installation de deux AQUIOS CL au laboratoire
- Retour d'expérience sur les 6 premiers mois d'utilisation en routine

A. β -test sur site d'un AQUIOS CL

En 2014, la société Beckman Coulter nous a confié l'évaluation des performances d'un automate AQUIOS CL, avant sa commercialisation. Ainsi, pendant un mois environ nous avons apprécié la répétabilité, reproductibilité, intervalle de mesure, contaminations inter-échantillon et inter-réactif et enfin réalisé une comparaison de méthode avec le cytomètre FC500 (Beckman Coulter) utilisé pour les analyses de routine dans notre laboratoire, sur 148 échantillons.

Les résultats de cette étude ont été publiés en 2016 dans la revue Cytometry (**Gossez M**, Malcus C, Demaret J, Frater J, Poitevin-Later F, Monneret G. *Evaluation of a novel automated volumetric flow cytometer for absolute CD4+ T lymphocyte quantitation*. Cytometry B Clin Cytom. 2016 Jan 25.). L'article est consultable ci-après.

Ce β -test sur site a fourni des résultats satisfaisants quant aux performances de l'AQUIOS CL et sa facilité d'utilisation. Ainsi, à l'issue de cette évaluation, nous avons envisagé de remplacer le cytomètre FC500 utilisé en routine pour la numération des LT CD4 par l'AQUIOS CL nouvellement disponible sur le marché.

Original Article

Evaluation of a Novel Automated Volumetric Flow Cytometer for Absolute CD4+ T Lymphocyte Quantitation

Morgane Gossez,^{1,2} Christophe Malcus,¹ Julie Demaret,^{1,2} John Frater,³
Françoise Poitevin-Later,¹ and Guillaume Monneret^{1,2*}

¹Hospices Civils De Lyon, Hôpital Edouard Herriot, Laboratoire D'immunologie, Lyon, F-69003, France

²Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, F-69008, France

³Oxford University, Oxford, UK

Background: Bead-based single platform cytometry technology (SPT) is the gold standard when performing CD4 absolute counting. However, it presents drawbacks as precision depends on various critical steps (for example, pipetting methodology, overtime stability of beads, stability of fluidics, regular recalibration. . .) and thus requires skilled operators. The fully automated volumetric SPT AQUIOS CL (Beckman Coulter) has recently emerged as an alternative with no need of beads. It may help improving results standardisation and fulfilling requirements for certification (ISO 15189). In this study, we assessed SPT AQUIOS CL performances in accordance to requirements for ISO 15189 accreditation.

Methods: We evaluated repeatability and reproducibility (precision), bias (trueness), uncertainty (total error), range limits (linearity, quantification, detection limits), and inter-reagent/inter-sample contaminations in enumerating CD4+ T-cells. Concomitantly, we compared AQUIOS CL CD4+ T-cell values with the results obtained with our routine bead-based SPT (that is, FC500 Beckman Coulter, bead-based SPT), on blood samples from 148 patients representative of clinical laboratory routine workload.

Results: Every result (repeatability, reproducibility, trueness, total error) was below the acceptable thresholds proposed in international recommendations. Contamination results and range limits (linearity, quantification, and detection limits) were all found perfectly suitable to routine analysis. The comparison between AQUIOS CL and FC500 exhibited excellent correlation and agreement (Pearson $R=0.99$, $P<0.001$; Lin's concordance correlation coefficient: Lin $\rho_c=0.991$, $C_b=0.999$), and Bland-Altman analysis did not reveal any systematic error.

Conclusions: Our results demonstrate that, upon subsequent validation in more routine conditions, the AQUIOS CL could be a suitable tool for clinical flow cytometry laboratories facing accreditation process.

© 2016 Clinical Cytometry Society

Key terms: CD4; AQUIOS; absolute count; flow cytometry

How to cite this article: Gossez, M., Malcus, C., Demaret, J., Frater, J., Poitevin-Later, Fç. and Monneret, G. Evaluation of a Novel Automated Volumetric Flow Cytometer for Absolute CD4+ T Lymphocyte Quantitation. Cytometry Part B 2016; 00B: 000–000.

Flow cytometry is increasingly used in routine clinical laboratories for the diagnosis, prognosis, and monitoring of disease (1). One typical application is the monitoring of HIV-infected patients as the absolute CD4 T cell count is a crucial marker of disease progression and anti-retroviral therapy (ART) efficiency, and is a key component of WHO guidelines for initiating ART in HIV-infected people (2).

There are different flow cytometry-based methods to determine absolute cell counts. The first technology is

*Correspondence to: Dr. Guillaume Monneret, Immunology Laboratory, Hôpital E.Herriot, Hospices Civils de Lyon, 5 Place d'Arsonval, 69437 Lyon Cedex 03, France. E-mail: guillaume.monneret@chu-lyon.fr

Received 29 June 2015; Revised 12 December 2015; Accepted 20 January 2016

Published online 00 Month 2016 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

DOI: 10.1002/cyto.b.21360

the dual-platform approach in which CD4 T cell count is obtained from the absolute count of lymphocytes determined with a hematological analyzer and subsequently CD4 T cell percentage (among total lymphocytes) is determined by flow cytometry (3). Although significant progress has been achieved in standardization and quality control (for example, CD45 gating for debris exclusion) (1,4,5), the combination of multiple technologies leads to increased variability (1,4-7). It is particularly limiting in inter-laboratory studies that use different hematological analyzers (1,3). To overcome these limitations, the single platform technology (SPT) has been developed.

The SPT measures absolute counts of lymphocyte subsets by a single instrument without the need for the hematology analyzer. This may rely on volumetric counting and most commonly, the use of internal calibrator counting microbeads (8-11). Many studies have demonstrated that implementation of bead-based SPT counting methods significantly reduced intra- and inter-laboratory variation in absolute cell counting compared with dual-platform methods (10,12). So far, this approach is considered as a gold standard when performing CD4 absolute counting. As an illustrative example, more than 94% NEQAS participants in CD4 external quality control program use bead-based SPT (NEQAS - February 2015).

That given, bead-based SPT also presents quality requirements (especially in terms of technical expertise, analyser settings, fluidic stability, time consumption) that may appear as a limitation to its wider use in various types of clinical laboratories (1,3). To circumvent this difficulty, the AQUIOS CL (Beckman Coulter) has recently emerged as a possible alternative. The AQUIOS CL is a single platform, fully automated volumetric flow cytometry technology, with no need of beads to determine absolute cell count. Therefore, it could more easily comply with standardization requirements defined for ISO 15189 accreditation and thus may better fit with recommendations from various societies regarding the management of clinical flow cytometry quality procedures (13-16). Overall, this novel technology may help in improving results standardization which remains a critical point for making clinical diagnostics comparable between different laboratories and for multicentric studies (17).

In the present study, we have assessed AQUIOS CL performances in accordance with standard necessary for clinical cytometry quality, in a context of ISO 15189 accreditation process (13-16). We evaluated reproducibility and repeatability (precision), bias/trueness, uncertainty (total error), measurement range limits, inter-reagent and inter-sample contaminations in enumerating CD4+ T cells. In addition, we concomitantly compared AQUIOS CL CD4+ T cell values with those obtained from our routine bead-based SPT.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Peripheral blood samples were obtained from 148 patients at random from our routine work load. They

were collected in K₃EDTA (BD Vacutainer®, Plymouth, UK), kept at room temperature (22-25°C) and analyzed upon arrival within 24 h after collection. The samples were processed by skilled operators. The cohort comprised 148 individuals from 5 weeks to 82 years old (including 15 patients under 18 years old); sex ratio men/women was 1.3. Main aetiologies were HIV-infection (66%), hematologic malignancies with or without bone-marrow transplant (13%), auto-immune or inflammatory pathologies (8%), infections (4%, including tuberculosis, meningitis, septic shock), immune deficiencies (3%), nephrotic syndrome (3%), various cancers (1%).

CD4 T-Cell Quantitation Method Comparison

The CD4+ T cell absolute counts (and percentages) were performed on AQUIOS CL and FC500 (both cytometers from Beckman Coulter, Hialeah, FL).

Bead-based SPT: FC500 (BeckmanCoulter)

Daily internal quality controls (IQC) were run using Flow Check Fluorospheres and IMMUNO-TROL™ Cells. For cell staining, a ready-to-use mix of antibodies was used (CYTO-STAT® TetraCHROME™, Beckman Coulter): CD45-Fluorescein Isothiocyanate (FITC)(Clone B3,821F4A)/CD4-Phycoerythrin (PE)(Clone SFC12T4D11)/CD8-Phycoerythrin Texas Red®-X (ECD)(Clone SFC121Thy2D3)/CD3-Phycoerythrin-Cyanin 5 (PC5)(Clone UCHT1). Red lysis was performed with IMMUNOPREP™ Reagents, a no-wash erythrocyte automated lysing system (Beckman Coulter). Cell counting was based on the use of microbeads (Flow-Count™ Fluorospheres, Beckman Coulter) and results were analyzed using CXP Cytometer 2.2 Software.

Automated volumetric method: AQUIOS CL (Beckman-Coulter)

This is a direct volumetric single-platform method (11). Pipeline sample processing is possible thanks to 2 multi-tasking probes: one probe is dedicated to cap piercing and sample preparation in a 96 well microplate, while the other aspirates prepared sample for analysis. While the first sample is incubated, the system continues to prepare additional samples and adds them to the queue. Whole blood (140 µL) is added to each well, then specific staining of leukocytes is accomplished by incubating whole blood with the monoclonal antibody reagent. The red blood cells are then removed by no-wash erythrocyte lysis and the remaining leukocytes are analyzed by flow cytometry. It uses a 488 nm solid state diode laser to measure light diffraction, fluorescence and electronic volume which estimates the relative size of the cells. For cell staining, a ready-to-use mix of antibodies was used (Panel AQUIOS Tetra-1, Beckman Coulter): CD45-Fluorescein Isothiocyanate (FITC)(Clone B3,821F4A)/CD4-Phycoerythrin (PE)(Clone SFC12T4D11)/CD8-Phycoerythrin Texas Red®-X (ECD)(Clone SFC121Thy2D3)/CD3-Phycoerythrin-Cyanin 5 (PC5)(Clone UCHT1). The gating strategy includes forward (FS) and side (SS) scatter characteristics, SS/CD45 gating and incorporates

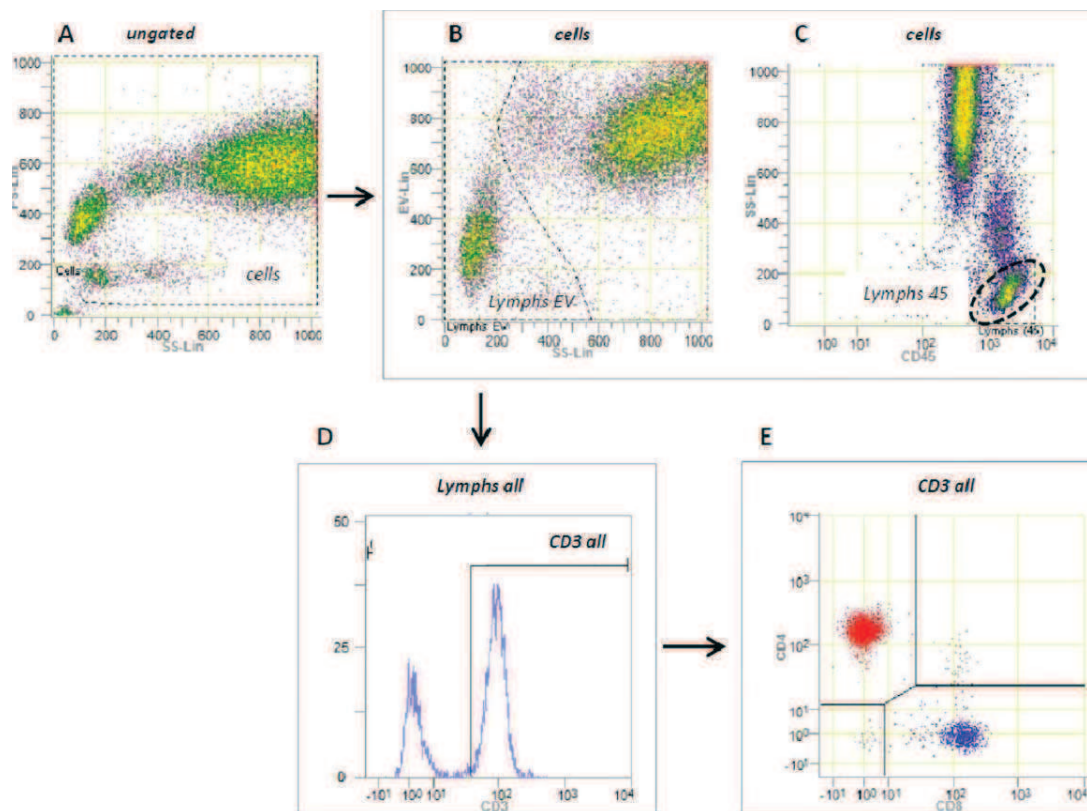


Fig. 1. Lymphocyte gating strategy for T CD4 counting on the Aquios. (A) A first region ("cells") is defined on SS/FS graph to exclude debris. (B) From "cells" gate, a region ("Lymphs EV") is defined on SS/EV graph to exclude monocytes and neutrophils. (C) From "cells" gate, an additional region ("Lymphs 45") is defined on CD45/SS graph to ensure good lymphocyte purity. Then, two Boolean gates are created: "Lymphs all" is "Cells" AND ("Lymphs EV" OR "Lymphs 45"), to improve recovery; and "Lymphs" is "cells" AND ("Lymphs EV" AND "Lymphs 45") to improve purity (to provide % of CD4+ cells among total lymphocytes). (D) From "Lymphs all", a region "CD3 all" is defined on a monoparametric CD3 histogram. (E) From "CD3 all", on a CD8/CD4 graph, a quadrangular region defines 4 sub-populations including the CD4+/CD8- subset that permits CD4 enumeration (illustrative graphs from one patient analysed on AQUIOS CL). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

Electronic Volume (EV) parameter in a dual parameter gate EV/SS, in order to improve the purity and recovery of total lymphocytes (Fig. 1). The EV measurement is based on the Coulter principle (Coulter W, 1953, Patent number 26 56508). Within the evaluation period, it was assessed by running both Aquios IMMUNO-TROL™ Cells and IMMUNO-TROL™ Low Cells twice a day.

Aquios Performance Characteristics

To analyze the performance characteristics, we followed the COFRAC guidelines (Comité Français d'Accréditation "French committee for accreditation, www.cofrac.fr). We followed procedures SH-GTA-04 (<http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04>), and SH-GTA-14 (<https://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-14>) which both rely on ISO 5725-1:1994, and IEC Guide 98-3:2008 (reissue of 1995 version of the international Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, GUM (www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM_100_2008_E.pdf)).

Repeatability

This was estimated as the coefficient of variation (% CV) of CD4 T cell determinations ($n = 31$) made under repeatability conditions, meaning that the operator, the instrument and the laboratory are the same, and the time interval is kept short. For this purpose, we used Aquios IMMUNO-TROL™ Cells (lot number 6170002) and Aquios IMMUNO-TROL™ Low Cells (lot number 6180003).

Reproducibility (intermediate precision): intra-laboratory variability of CD4 T cell measurements

This takes into account many more sources of variation than repeatability (for example, additional variation due to the measurements being performed over a longer period of time). It was estimated as % CV of CD4 T cell determinations performed during 29 days (including 23 working days). For this purpose, we used Aquios IMMUNO-TROL™ Cells (lot number 6170002) and Aquios IMMUNO-TROL™ Low Cells (lot number 6180003), $n = 38$ and 36 respectively.

Bias/trueness

The trueness refers to the closeness of agreement between the arithmetic mean of a large number of test results and the true or accepted reference value. We could not use the AQUIOS CL IQC as there was no external quality assurance (EQA) program dedicated to AQUIOS CL (newly commercialised). Thus, the % CV of repeated CD4 T cell measurements over several days of the quality controls FC500 IMMUNO-TROL™ Cells (lot number 7587066) and FC500 IMMUNO-TROL™ LowCells (lot number 7609082) were compared with those of laboratories participating in the inter-laboratory Quality Assurance Program of Cytometry (IQAP, Beckman Coulter) and using the same lots of internal quality controls. Results (Aquios, that is, “m”) to those of laboratories participating in the inter-laboratory Quality Assurance Program of Cytometry (IQAP, Beckman Coulter) and using the same lots of internal quality controls (peer-group, that is, “v”). The bias was estimated as $(m-v)/v \times 100$.

Uncertainty in Measurement (Total Error): Accuracy of CD4 T Cell Determinations

This represents intermediate precision and uncertainty related to trueness (bias). According to the GUM, intra-laboratory reproducibility is a “Type A” uncertainty, and has been evaluated by repeated measurements of IQC (FC500 IMMUNO-TROL™ Cells, lot number 7587066 and IMMUNO-TROL™ LowCells, lot number 7609082) used to estimate a standard deviation ($u(IQC)$). The uncertainty related to trueness has been determined via the EQA results ($u(EQA)$). As the distribution of the bias represented by $Mean_{Aquios} - Mean_{peer-group}$ is not known, we determined this “Type B” uncertainty assuming a uniform distribution, as $u(EQA) = (Mean_{Aquios} - Mean_{peer-group})/\sqrt{3}$. These two identified sources were then combined by “error-propagation” formulas leading to the combined standard uncertainty $Uc = \sqrt{u^2(IQC) + u^2(EQA)}$. Finally, the expanded uncertainty (Up) was obtained multiplying Uc by the coverage factor $k_p = 2$, to provide an interval about the result of a measurement that may be expected to encompass 95% of the distribution of values that could reasonably be attributed to the measuring. This interval represents the total analytical error. This total error has been also expressed as percentage for both levels of concentration, using the target values given by the manufacturer for each IQC (18–20).

Inter-reagent contamination

CD4 T cell count was determined 10 times on a unique blood sample (Panel AQUIOS Tetra-1). Then, on the same blood sample, CD4 T cell measurements were determined 10 times alternatively with the determination of B and NK cells (Panel AQUIOS Tetra-2). Results from the two batches were finally compared with high-light a potential contamination inter-reagent.

Inter-sample contamination

A blood sample with 1122 CD4 T cells/ μ L was analyzed 3 times (H1, H2, H3, mean mH); then a blood sample with a low CD4 T cells concentration of 99 CD4 T cells/ μ L was measured 3 times (L1, L2, L3). This experimental scheme was repeated 5 times. Means of all L1 (mL1) and all L3 (mL3) were calculated and compared using a Student Test. The degree of contamination is then calculated as $(mL1-mL3)/(mH-mL3) \times 100$.

Measurement Range Limits

Linearity limit

Blood samples of 45 patients collected the same day were pooled. Then, PBMC were isolated by density centrifugation over Ficoll and re-suspended in 1 mL of 1X concentrated Hanks solution and 1 mL of fetal bovine serum. This sample was then diluted several times and the CD4 T cell count measured twice for each dilution.

Quantification limit

A blood sample with a CD4 T cell measured concentration of 600 cells/ μ L was successively diluted 1:2 ten times. The quantification limit was estimated as the mean of the CD4 T cell measurements of the dilution corresponding to a 10% CV and determined on Horwitz curve.

Detection limit

This was estimated by repeated measurement of CD4 T cells in leukocyte-depleted plasma.

Agreement between AQUIOS CL and FC500 Methods

Results from the two platforms were assessed by linear regression analysis, Lin concordance correlation coefficient and Bland Altman statistical method.

Statistical methods

For each characteristic studied, mean and SD were calculated. When there were less than 30 values for the tested parameter, the normal distribution was verified by the Kolmogorov-Smirnov normality test before performing a Student's T test. Pearson correlation coefficient (R) was calculated, and the slope and intercept of each linear regression analysis were compared respectively to 1 and 0 by using student tests (<http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04>). In addition, Lin concordance correlation coefficient ρ_c has been also calculated. The bias correction factor C_b measures how far the best-fit line deviates from the identity line (21). The Bland-Altman data includes a bias value, estimated by the mean difference (d), a bias error which is the standard deviation of the differences (S), and the precision represented by the upper and lower limits of agreement (if the differences are Normally distributed, 95% of them will lie between these limits) (22). All statistical analyses were processed using SPSS 19.0 software (Chicago, IL). Statistical significance was defined by a two-sided P values of < 0.05 .

Table 1
Repeatability of CD4 T Cells Determination on AQUIOS CL and FC500

Instrument	Levels	Lots	Counts	Mean (cells/ μ L)	SD (cells/ μ L)	CV (%)
AQUIOS CL	IMMUNO-TROL™ Cells	6170002	31	625.8	13.90	2.2
	IMMUNO-TROL™ Low Cells	6180003	31	150.8	7.02	4.7
FC500	Patient sample of high concentration ^a	–	20	1,227.2	33.19	2.7
	Patient sample of low concentration ^a	–	20	194.3	8.15	4.2

^aResults obtained during validation method process (personal data).

RESULTS

Performance Characteristics of Aquios Technology

Repeatability

The % CV of repeatability calculated from repeated measurements (on the same day) of IMMUNO-TROL™ Cells and IMMUNO-TROL™ Low Cells was 2.2 and 4.7, respectively (Table 1). In comparison, the % CV of repeatability determined during the validation of method of the FC500 (ISO 15189, personal data) was 2.7 and 4.2 using samples from patients with about 1,200 CD4 T cells/ μ L and 200 CD4 T cells/ μ L, respectively (Table 1).

Reproducibility

For the AQUIOS CL, the first lots used during 1 month (lot number 6170002 and 6180003, measured 38 and 36 times respectively) showed % CV of 3.3 and 9.2 (Table 2). Meanwhile, in comparison, the FC500 cytometer showed % CV of 3.9 and 6.7, respectively, for similar levels of CD4 T cells (Table 2). A second batch of internal controls was then used on the AQUIOS CL during 16 additional days (lot number 6170003 and 6180004, measured 24 times each) showing a % CV of 3.4 and 5.1 respectively. In all cases, values remained largely within desirable range established for CD4+ T-lymphocytes (that is, <12.5%, Ricos et al. <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>)

Trueness

As there is no interlaboratory quality assurance program (IQAP) dedicated to AQUIOS CL, we used reagents devoted to FC500 IQAP (that is, IMMUNO-TROL™ Cells and IMMUNO-TROL™ Low). The results are shown in Table 3. All biases were below 3.3%. No recommendation is available yet from Ricos et al. for CD4 T cell count inaccuracy, but we can still compare these results with desirable specification for total lymphocyte count inaccuracy, which is <9.19% (<https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>)

Uncertainty in measurement

Total errors have been calculated with the reproducibility of AQUIOS CL IMMUNO-TROL™ Cells (Lot 6170002) and IMMUNO-TROL™ Low Cells (Lot 6180003), and EQA results of FC 500 IMMUNO-TROL™ Cells (Lot 7587066) and IMMUNO-TROL™ Low Cells (Lot 7609082). For high and low concentrations of CD4 T cell counts, total errors were 44 and 12 cells/ μ L respectively, representing 7.3 and 11.2% of the target values of the AQUIOS CL internal quality controls used (Table 4). Uncertainty estimates address error from all possible effects (both systematic and random) and usually is the most appropriate means of expressing the accuracy of results. Ricos et al. do not give recommendation for CD4 T cell count total error, so we compared our results with the specification for total lymphocyte count: total error should not be above 17.6% (<https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>).

Inter-sample contamination

We did not find significant difference between mL1 and mL3. Contamination degree was found at 0.3%. Those values indicate there was no any contamination between samples.

Inter-reagent contamination

We found a weak but significant difference between the mean of CD4 T cell counts analyzed alone (276 cells/ μ L) and the mean of CD4 T cell counts (293 cells/ μ L) measured when alternated with B and NK cell counting ($P = 0.028$).

Measurement of range limits

Serial dilutions of a concentrated CD4 T cell sample showed no linearity limit observed in the concentration range studied on AQUIOS CL, until approximately 19 000 CD4 T cells/ μ L (Fig. 2). For total lymphocytes, we observed no linearity limit up to 55 000 cells/ μ L (data not shown). The quantification limit of AQUIOS CL has

Table 2
Reproducibility of CD4 T Cell Determinations on AQUIOS CL and FC500

Instrument	Levels	Lots	Counts	Mean (cells/ μ L)	SD (cells/ μ L)	CV (%)
AQUIOS CL	IMMUNO-TROL™ Cells	6170002	38	632	20.62	3.26
	IMMUNO-TROL™ Low Cells	6180003	36	146	13.42	9.20
FC500	IMMUNO-TROL™ Cells	7587066	27	614.5	24.16	3.93
	IMMUNO-TROL™ Low Cells	7609082	27	115.8	7.75	6.69

Table 3
Trueness of CD4 T Cell Determinations on AQUIOS CL and FC500

Instrument	Levels	Lots	Counts	Mean (cells/ μ L)	Mean of the peer-group (cells/ μ L)	Number of labs in the peer-group	Bias with the peer-group (%)
AQUIOS CL	IMMUNO-TROL™ Cells	7587066	27	614.4	633.2	26	-2.96
	IMMUNO-TROL™ Low Cells	7609082	16	117.2	113.5	50	3.25
FC500	IMMUNO-TROL™ Cells	7587066	27	614.5	633.2	26	-2.95
	IMMUNO-TROL™ Low Cells	7609082	27	115.8	113.5	50	2.03

As there was no inter-laboratory quality assurance program dedicated to AQUIOS CL available yet, we had to use FC500 IQC on the AQUIOS CL and compared the results with the peer-group using FC500.

been determined with the Horwitz curve method (Fig. 3) which showed that with a 10% CV, CD4 T cell count limitation is around 20 cells/ μ L (which is similar to those reported by manufacturers for bead-based SPT). The detection limit was assessed on cell-depleted plasma. As expected, AQUIOS CL did not provide any results for the CD4 T cell counts.

Comparison of Methods

For this purpose, we used CD4 values ($n = 148$) from FC500 as references. The distribution of CD4 T cell count measured on both cytometers from the same samples is depicted in Figure 4. There was an excellent linear correlation between both measurement methods. The coefficient R^2 was 0.984 (Pearson correlation coefficient, $P < 0.001$); the slope did not differ from 1 ($P < 0.001$) showing no systematic proportional difference between both results (Fig. 5). Of note, the intercept was different from 0 (+ 31 CD4/ μ L; $P < 0.001$), pointing out a potential minor bias (that is, AQUIOS CL results were slightly higher than those of FC500). Lin concordance correlation coefficient ρ_c was 0.991 (CI95 [0.988 - 0.994]) and the bias correction factor C_b was 0.999, indicating a very good agreement between results from both cytometers. Finally, a Bland-Altman plot of the differences between the two methods was drawn (Fig. 6). The mean of the differences was -1.17 cells/ μ L (standard error = 63 CD4 T cells/ μ L) which is negligible considering desirable specification for total error, reproducibility and bias. Accordingly, no systematic error was apparent (Fig. 6). Most of the differences in measurements were within the 95% confidence interval of the mean difference, confirming a good agreement between both methods of CD4 T cell quantitation.

DISCUSSION

In the present study, we carried out an evaluation of the performances of AQUIOS CL according to ISO15 189 guidelines. Overall, our results indicate for the first time that the AQUIOS CL meets the level of provision required for ISO 15 189 accreditation. In addition, comparing with bead-based SPT provided excellent results.

Repeatability values were excellent (<5%) at high and low CD4 levels (and comparable to those observed on FC500). Reproducibility results, although acceptable indicated a rather elevated CV at low CD4 T cell levels (9.2%). This result may be explained by minor mechanical issues during the evaluation period. For example, a protection fuse against high pressure had blown, interfering with the sample preparation probe operation, and the wash prep pump had to be replaced due to insufficient power. Reproducibility values obtained subsequently on a second lot of internal control were better (CV < 5.2%). As the latter value was obtained on only 24 measurements, this point should be confirmed by further evaluation. Trueness and total error were found to be largely below the acceptable thresholds proposed by Ricos et al. regarding total lymphocytes. There was no inter-sample contamination during analysis. We observed a weak but significant inter-reagent contamination although it remains difficult to explain how antibodies dedicated to B and NK counting may increase CD4 values. Nevertheless, this result has to be carefully interpreted because this experiment has been made before the waste prep pump had been replaced. Range limits (linearity limit, quantification limit, detection limit) were all found suitable for routine analysis. Finally, the comparison between AQUIOS CL and FC500 showed a very good agreement between both cytometers. Overall, this indicated that the CD4 T cell measurements were not influenced by the counting method used. Of note, the investigated cohort was representative of routine clinical

Table 4
Uncertainty in CD4 T Cell Determination on AQUIOS CL

Levels	Lots	Target value (CD4 T-cells/ μ L)	Total Error (Up) (CD4 T-cell/ μ L)	Total Error (%)
IMMUNO-TROL™ Cells	7587066	596	44	7.3
IMMUNO-TROL™ Low Cells	7609082	106	12	11.2

The target values of each IQC come from the manufacturer (Beckman-Coulter).

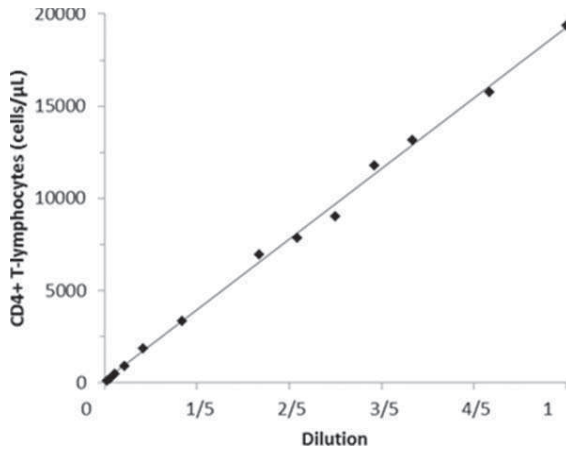


Fig. 2. Linearity limit of CD4 T cell measurement by AQUIOS CL.

laboratory work including patients, not only HIV-infected, with various levels of circulating CD4 T cells. In addition, we have been able to assess AQUIOS CL in particular, samples such as from patient with acute leukemia. Despite an important blast cell population, the CD4 T cell count measured by the AQUIOS CL automatic gating algorithms was similar to the one determined by a skilled operator manual gating on the FC500 (data not shown). We were also able to detect a CD3-CD4+ cell population of a patient suffering from Sezary lymphoma. In this case, the CD4 T cell count was again comparable to the one determined by manual gating on FC500 (data not shown). Of note, for one sample we had to proceed to a wash before the red blood cells lysis on both AQUIOS CL and FC500 to avoid a non-specific staining responsible for incorrect gating and results of CD4 T cell count (data not shown). Overall, on 148 samples, we experienced 4 error messages (delivered by AQUIOS CL) implying a new analysis. After reanalysis, there were no discrepant results compared with those of FC500.

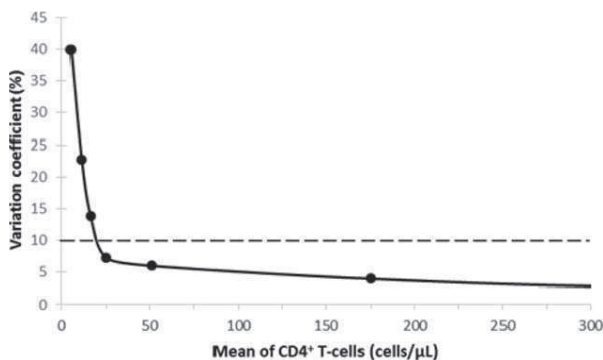


Fig. 3. Quantification limit of CD4 T cell measurement by AQUIOS CL. For each dilution, the mean of CD4 T-cell counts and %CV were used to produce Horwitz curve; The limit of quantification is the CD4 T-cell count matching with a %CV of 10% (dashed line), that is around 20 CD4 T-cells/μL in the case of the AQUIOS CL analyser.

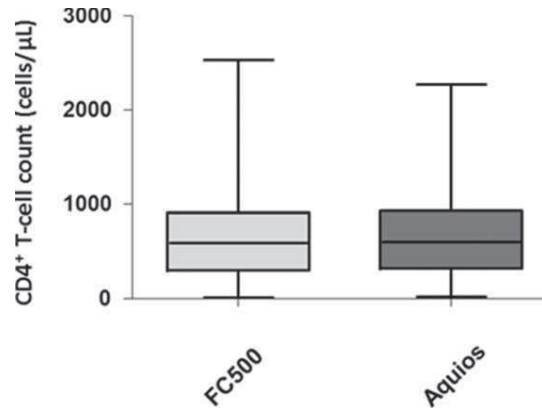


Fig. 4. Absolute values of CD4 T cells in samples analyzed by FC500 and AQUIOS CL cytometers. The ranges of CD4 T-cell counts obtained by each cytometer are presented as the minimum, maximum, quartiles and median of the values obtained.

Despite similar performances to those of FC500 relying on bead-based SPT, the AQUIOS CL volumetric approach presents with major advantages. Its daily use appears simpler than that of bead-based SPT whose precision depends on various critical steps: most of all, accurate pipetting methodology in the staining process [for example, reverse pipetting is known as the most reliable dispensing method (1)] but also overtime stability of expensive counting beads [lot to lot variation, sedimentation, floating, aggregation, sticking to the tube walls and overlapping of fluorescence signals from cells and beads (1)], regular recalibration and strict maintenance by users and service engineers(1,3). Collectively, these tasks require skilled operators (10,12). Furthermore, bead-based SPT is time consuming as it relies on several manual (or semi-automatic) steps (staining, lysis, beads) while AQUIOS automatically accomplishes the entire process from whole blood (“load and go” cytometer). The autoloader holds up to 8 cassettes at a time with up to 5 sample tubes each; the first result is given in approximately 20 min from loading and then every 2

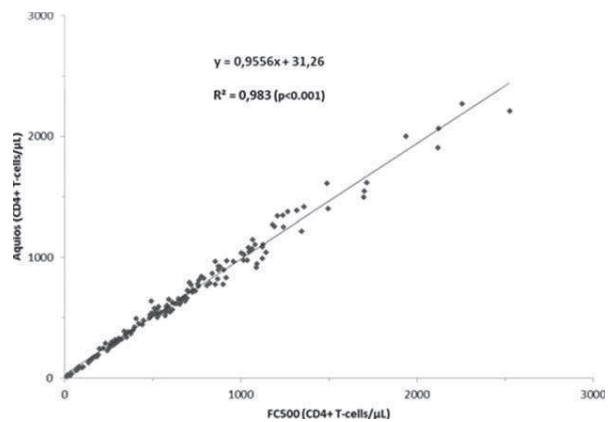


Fig. 5. Correlation of CD4 T cell absolute count after measurement by AQUIOS CL and FC500.

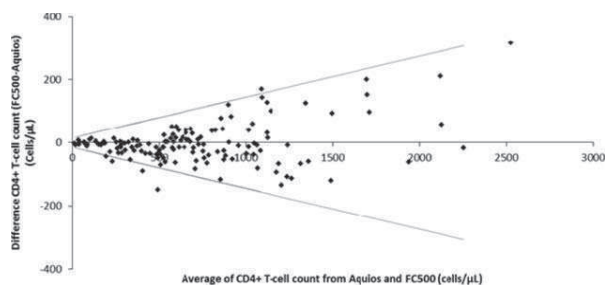


FIG. 6. Bland-Altman plots and statistics from the paired samples. Values on the x-axis indicate the average of the results from both flow cytometry methods for each pair of samples, whereas values on the y-axis represent the difference in the results. Grey lines represent 95% limits of agreement of CD4 T-cell absolute count differences from both methods of CD4 T-cell determination.

min. In addition, AQUIOS CL is supposed to offer various convenient aspects for routine work. First, the barcode scanning systems deals with the number of available tests, the expiry date and lot numbers of each reagent, the remaining volume of reagents and the capacity of waste. This should contribute in better compliance with accreditation requirements. In line, AQUIOS CL software permits easily monitoring of daily QC data, to define the internal laboratory statistics and to compare them to external laboratories. Secondly, in our hands, the automatic gating algorithm generated accurate results and mostly avoids the subjective and potentially time-consuming manual gating. This might be a critical aspect in terms of standardization between laboratories. Another important advantage is the very limited exposure to potentially biohazardous material as there is no need to handle blood samples.

Our study has limitations. We did not assess AQUIOS CL in routine conditions. First, the whole study has been performed by a single operator (MG). Some characteristics announced by the manufacturer have not been evaluated: rate of work, maximum load (we conducted the study with 2 racks of 5 tubes), use of the single-tube loading, small volume samples. As we focused on CD4+ cell counting, reagents for other applications (for example, B and NK determination) have not been tested in the current work. As the present evaluation period lasted 1.5 mo, we could not assess the mechanical robustness of AQUIOS CL which is always a critical point with newly delivered automated system. Of note, we experienced minor issues such as replacement of the waste prep pump, adjustments of the probes and the blown fuse. In addition, linearity should be further assessed with a real whole blood specimen with a very high CD4 count.

In conclusion, this first evaluation of CD4+ cell enumeration using the AQUIOS CL showed very promising results. Analytical performances are in agreement with recommendations and the comparison assessment exhibited excellent correlations between bead-based SPT (that is, FC500) and AQUIOS CL. Upon validation in more routine conditions, these preliminary results indicate that

AQUIOS CL could be a suitable tool for clinical flow cytometry laboratories.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Beckman Coulter through donations of laboratory equipment and supplies. This private company had no role in the study design, the collection or interpretation of the data. Similarly, Beckman Coulter had no role in the preparation of the manuscript or the decision to submit it for publication. The authors would like to thank Annabelle Chauveau, Stéphane Gaudin, Christophe Deiss, Jacques Vigne, and Fathi Mokeddem for their support during study completion.

LITERATURE CITED

1. Brando B, Barnett D, Janosy G, Mandy F, Autran B, Rothe G, Scarpati B, D'Avanzo G, D'Hautcourt JL, Lenkei R, et al. Cytofluorometric methods for assessing absolute numbers of cell subsets in blood. European Work. Group on Clinical Cell Anal.. *Cytometry* 2000;42:327-346.
2. WHO. Consolidated Guidelines on the Use of Antiretroviral Drugs for Treating and Preventing HIV Infection: Recommendations for a Public Health Approach. 2013. Available at: www.who.int/hiv/pub/guidelines/aur2013/en/.
3. Dieye TN, Vereecken C, Diallo AA, Ondoa P, Diaw PA, Camara M, Karam F, Mboup S, Kestens L. Absolute CD4 T-cell counting in resource-poor settings: Direct volumetric measurements versus bead-based clinical flow cytometry instruments. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;39:32-37.
4. Whitby L, Granger V, Storie I, Goodfellow K, Sawle A, Reilly JT, Barnett D. Quality control of CD4+ T lymphocyte enumeration: Results from the last 9 years of the United Kingdom National External Quality Assessment Scheme for Immune Monitoring (1993-2001). *Cytometry* 2002;50:102-110.
5. Whitby L, Whitby A, Fletcher M, Helbert M, Reilly JT, Barnett D. Comparison of methodological data measurement limits in CD4(+) T lymphocyte flow cytometric enumeration and their clinical impact on HIV management. *Cytometry B Clin Cytom* 2013;84:248-254.
6. Reimann KA, O'Gorman MR, Spritzler J, Wilkening CL, Sabath DE, Helm K, Campbell DE. Multisite comparison of CD4 and CD8 T lymphocyte counting by single- versus multiple-platform methodologies: Evaluation of Beckman Coulter flow-count fluorospheres and the tetraONE system. The NIAID DAIDS New Technologies Evaluation Group. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;7:344-351.
7. Barnett D, Granger V, Whitby L, Storie I, Reilly JT. Absolute CD4+ T lymphocyte and CD34+ stem cell counts by single-platform flow cytometry: The way forward. *Br J Haematol* 1999;106:1059-1062.
8. O'Gorman MR, Gelman R. Inter- and intrainstitutional evaluation of automated volumetric capillary cytometry for the quantitation of CD4- and CD8-positive T lymphocytes in the peripheral blood of persons infected with human immunodeficiency virus. Site Investigators and the NIAID New CD4 Technologies Focus Group. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997;4:173-179.
9. Gelman R, Wilkening C. Analyses of quality assessment studies using CD45 for gating lymphocytes for CD3(+)(+)4(+)% . *Cytometry* 2000;42:1-4.
10. Storie I, Sawle A, Goodfellow K, Whitby L, Granger V, Ward RY, Peel J, Smart T, Reilly JT, Barnett D. Perfect count: A novel approach for the single platform enumeration of absolute CD4+ T lymphocytes. *Cytometry B Clin Cytom* 2004;57:47-52.
11. Dietz IJ, Dubrow RS, Manian BS, Sizto NL. Volumetric capillary cytometry: A new method for absolute cell enumeration. *Cytometry* 1996;23:177-186.
12. Hultin LE, Chow M, Jamieson BD, O'Gorman MR, Menendez FA, Borowski L, Denny TN, Margolick JB. Comparison of interlaboratory variation in absolute T-cell counts by single-platform and optimized dual-platform methods. *Cytometry B Clin Cytom* 2010;78:194-200.
13. Sack U, Barnett D, Demirel GY, Fossat C, Fricke S, Kafassi N, Nebe T, Psarra K, Steinmann J, Lambert C. Accreditation of flow cytometry in Europe. *Cytometry B Clin Cytom* 2013;84:135-142.
14. Sack U, Tarnok A. Harmonization of cytometry instrumentation and technologies. *Cytometry A* 2013;83:1055-1056.

15. Tanqri S, Vall H, Kaplan D, Hoffman B, Purvis N, Porwit A, Hunsberger B, Shankey TV. Validation of cell-based fluorescence assays: Practice guidelines from the ICSH and ICCS. III. Analytical issues. *Cytometry B Clin Cytom* 2013;84:291-308.
16. Wood B, Jevremovic D, Bene MC, Yan M, Jacobs P, Litwin V. Validation of cell-based fluorescence assays: practice guidelines from the ICSH and ICCS. V. Assay performance criteria. *Cytometry B Clin Cytom* 2013;84:315-323.
17. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the human immunology project. *Nat Rev Immunol* 2012; 12:191-200.
18. Kristiansen J. Description of a generally applicable model for the evaluation of uncertainty of measurement in clinical chemistry. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:920-931.
19. Krouwer JS. Critique of the Guide to the expression of uncertainty in measurement method of estimating and reporting uncertainty in diagnostic assays. *Clin Chem* 2003;49:1818-1821.
20. Garcia Hejl C, Ramirez JM, Vest P, Chianea D, Renard C. Working towards accreditation by the International Standards Organization 15189 Standard: How to validate an in-house developed method an example of lead determination in whole blood by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Ann Lab Med* 2014;34: 367-371.
21. Lin LI. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics* 1989;45:255-268.
22. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;1:307-310.

B. Validation de méthode des AQUIOS CL AY47058 et AY39049 lors de leur installation au laboratoire

A la suite des résultats de l'étude sur les performances de l'AQUIOS CL, le laboratoire a décidé de s'équiper de deux de ces cytomètres pour remplacer le cytomètre FC500 utilisé en routine pour la numération des sous-populations lymphocytaires T. Cette partie présente les résultats de la validation de méthode de ces deux automates. Les AQUIOS AY47058 et AY39049 seront désignés par la suite comme AQUIOS 1 et 2 respectivement.

Les normes NF EN ISO 15189 et NF EN ISO/CEI 17025 régissent les exigences de qualité et de compétence des laboratoires de biologie médicale. Leurs recommandations sont répertoriées dans différents documents de référence sur lesquels nous nous sommes appuyés pour réaliser la validation de méthode des AQUIOS CL :

- Document SH GTA 04 : Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en biologie médicale (76)
- Document SH GTA 14 : Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale (77)
- Document SH REF 02 : Exigences pour l'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189 (78)

Selon le SH REF 08 (79), une portée flexible standard (A) correspond à « une demande d'accréditation du laboratoire souhaitant avoir la possibilité [...] d'adopter des **méthodes reconnues** reposant sur des **compétences techniques qu'il a précédemment démontrées** ». Le système AQUIOS Tétra requiert l'utilisation de réactifs « fournisseur » et correspond à une méthode marquée CE-IVD. De plus, cet automate repose sur une technique de cytométrie, discipline maîtrisée par notre laboratoire. Ainsi, la méthode AQUIOS CL répond aux critères de la portée flexible A. Les paramètres à évaluer lors de la vérification de méthode d'une méthode quantitative sont décrits dans le **tableau 9** tiré du SH-GTA-04 (76).

Tableau 9. Performances à évaluer lors d'une vérification/validation de méthode quantitative ou qualitative (76)

CRITERES A EVALUER	Vérification (portée A)		Validation (portée B)	
	Méthode quantitative	Méthode qualitative	Méthode quantitative	Méthode qualitative
Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire)	Essai	Essai	Essai	Essai
Justesse/exactitude (approche)	Essai	Essai	Essai	Essai
Incertitudes/facteurs de variabilité et évaluation	Essai	Maîtrise des facteurs de variabilité	Essai	Maîtrise des facteurs de variabilité
Comparaison avec méthode déjà utilisée au laboratoire ou autre méthode du laboratoire (appareil en miroir ⁹ , EBMD) et analyse des discordances ¹⁰	Essai	Essai	Essai	Essai
Intervalle de mesure (Limite de quantification et limites de linéarité)	Bibliographie		Essai	/
Interférences (lipémie, hémoglobine plasmatique, bilirubine, médicaments, ...)	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
Contamination entre échantillons (s'il y a lieu)	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
Robustesse	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
Stabilité réactifs (après ouverture, embarqués)	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
Intervalle de référence (valeurs usuelles)	Bibliographie (fournisseur ou autre, s'assurer de la cohérence avec l'état de l'art)	Bibliographie	Essai	Essai
Limite de détection	/	Bibliographie	/	Essai
Spécificité/sensibilité analytique	/	Bibliographie	/	Essai

Les règles d'accréditation ont été établies pour des systèmes hautement standardisés, par exemple de biochimie clinique. Pour les appliquer aux laboratoires de cytométrie, la norme ISO 15189 doit être modulée et adaptée aux spécificités de cette technique, en justifiant constamment les choix faits : « In essence, write down exactly what you do, do what is written, and document that you have done it » (Einstein (80)).

1. Répétabilité

Selon la norme ISO 15189, l'essai de répétabilité consiste à analyser *un même échantillon dans les conditions les plus optimales possibles: même opérateur, même lot de réactifs, même automate, mêmes réglages dans un délai le plus court possible (76)*. Il est recommandé de tester la répétabilité à deux niveaux de concentration pour un analyte donné. J'ai donc analysé 30 fois à la suite, sur chaque automate, un échantillon d'AQUIOS Immuno-Trol™ Cells et AQUIOS Immuno-Trol™ Low Cells, avec les mêmes lots des différents réactifs. Les résultats sont consignés dans le **tableau 10**.

Tableau 10. Test de répétabilité des AQUIOS CL

Automate	Echantillon	Paramètre	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)
AQUIOS 1	AQUIOS Immunotrol Cells lot 6170010	LT CD4 (%)	30	48,5	0,71	1,47
		LT CD4 (/μL)		564,0	16,68	2,96
	AQUIOS Immunotrol Low Cells lot 6180012	LT CD4 (%)		19,5	0,85	4,52
		LT CD4 (/μL)		148,4	7,39	4,98
AQUIOS 2	AQUIOS Immunotrol Cells lot 6170010	LT CD4 (%)		48,6	0,83	1,71
		LT CD4 (/μL)		583,7	11,46	1,96
	AQUIOS Immunotrol Low Cells lot 6180012	LT CD4 (%)		18,9	0,75	3,94
		LT CD4 (/μL)		150,6	6,58	4,37

Il n'existe aucune recommandation des sociétés savantes pour la numération des LT CD4. Ainsi, nous avons comparé les coefficients de variation (CV) obtenus avec ceux de l'article publié dans Cytometry (81): pour le niveau normal de LT CD4 en valeur absolue, le CV était de 2,2% dans Cytometry, versus 2,96 et 2,0% pour les AQUIOS 1 et 2 respectivement ; pour le niveau bas, le CV était de 4,7% dans l'article, contre 4,98 et 4,4% respectivement pour les AQUIOS 1 et 2. Dans un article de référence de Reimann *et al.* (67), les CV de répétabilité de deux méthodes utilisant des billes calibrées pour la détermination des valeurs absolues de LT CD4 étaient de 4,9 à 5,2% et de 4,6 à 7,4% respectivement pour le niveau normal et bas de LT CD4.

Les CV tirés des publications de Gossez *et al.* et de Reimann *et al.* sont donnés à titre indicatif. Ils nous permettent de comparer les CV obtenus avec les AQUIOS CL et ceux issus de deux études réalisées d'une part sur un autre AQUIOS CL (81) et d'autre part sur un cytomètre de technologie différente (EPICS XL, Beckman Coulter) (67). Ils n'ont en aucun cas été utilisés comme des seuils d'acceptabilité.

2. Reproductibilité intra-laboratoire

Selon la norme ISO 15189, l'essai de reproductibilité intra-laboratoire, également appelé fidélité intermédiaire, consiste à analyser *un même échantillon dans des conditions très variables : opérateurs différents, jours d'analyse différents, lots de réactifs, ...* (76) Il permet de définir les critères d'acceptation des antécédents en combinaison avec les variations biologiques. Les résultats du test de reproductibilité sont présentés dans le **tableau 11**.

Tableau 11. Test de reproductibilité des AQUIOS CL

Automate	Echantillon	Paramètre	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)
AQUIOS 1	AQUIOS Immunotrol Cells lot 617009	LT CD4 (%)	30	47,7	0,88	1,85
		LT CD4 (/μL)		511,6	16,03	3,13
	AQUIOS Immunotrol Low Cells lot 6180011	LT CD4 (%)	31	23,6	0,91	3,86
		LT CD4 (/μL)		154,4	7,92	5,13
AQUIOS 2	AQUIOS Immunotrol Cells lot 617009	LT CD4 (%)	28	47,8	0,87	1,82
		LT CD4 (/μL)		512,8	14,42	2,81
	AQUIOS Immunotrol Low Cells lot 6180011	LT CD4 (%)	29	23,6	1,09	4,60
		LT CD4 (/μL)		155,8	8,56	5,50

Ricos *et al.* préconise un biais limite pour la numération des lymphocytes T CD4+ inférieur à 12,5% (82). Tous les CV des deux cytomètres respectent donc ces critères d'acceptabilité. A titre indicatif, des CV de 3,26 et 9,20% pour les valeurs absolues de LT CD4 issues des AQUIOS Immunotrol™ Cells et Low Cells avaient été montrés dans notre article de Cytometry (81). Le CV élevé du niveau bas de CQI avait été alors expliqué par la survenue de divers incidents techniques sur l'automate lors de la période d'évaluation.

3. Justesse/exactitude

a) Justesse

Selon la norme ISO 15189, la justesse est l'étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence (76). Il n'existe pas de matériau de référence certifié pour la numération des LT CD4 par cytométrie en flux. Ainsi, des programmes de qualité ont été développés pour permettre de comparer la moyenne de plusieurs dosages d'un même échantillon au sein d'un laboratoire, à la moyenne des résultats du dosage de ce même échantillon par les autres laboratoires utilisant la même technique de mesure. Ces laboratoires sont couramment appelés « groupe de pairs ». L'écart observé correspond alors au « biais ». Beckman Coulter a développé un tel programme, appelé « Programme d'Assurance Qualité Interlaboratoire » (IQAP). Tous les laboratoires utilisant les AQUIOS CL pour la numération des LT CD4 soumettent leurs résultats d'AQUIOS Immunotrol™ Cells et Low Cells à l'IQAP, et peuvent ainsi se comparer à leur groupe de pairs.

Les résultats de l'IQAP avec le premier lot de CQI Immunotrol™ Cells sont présentés dans le **tableau 12**.

Tableau 12. IQAP de l'AQUIOS Immuno-Trol™ Cells lot 6170010

CQI	Automate	Paramètre	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Moyenne des pairs	Ecart-type	Ecart-type des pairs	CV (%)	CV des pairs (%)
AQUIOS Immunotrol Cells lot 6170010 01/02/2016 au 28/05/2016	<u>AQUIOS 1</u>	LT CD4 (%)	94	0,5	4,4	0,01	13,73	1,46	82,41
		LT CD4 (/µL)		570,0	561,0	16,00	13,94	2,81	3,59
	<u>AQUIOS 2</u>	LT CD4 (%)	96	0,5	4,4	0,01	13,73	1,66	82,41
		LT CD4 (/µL)		580,0	561,0	18,00	13,94	3,10	3,59

De façon surprenante, les résultats des proportions de LT CD4 sont à soumettre sous forme de décimale (e.g. 0,5) et non de pourcentages (e.g. 49,18%). D'une part, ce format nous paraît peu adéquat car nous perdons de l'information sur le résultat à cause du manque de décimales. De plus, en vue des résultats du rapport obtenu (**Tableau 3**), certains laboratoires du groupe de pairs ont rendu les résultats en pourcentages, ce qui fausse totalement les moyennes et entraîne ainsi des résultats aberrants, tels que les CV de 82,41%. Nous avons signalé l'erreur à Beckman Coulter et sommes en attente de leur correction pour la détermination du biais de la numération de LT CD4.

b) Exactitude

Selon la norme ISO 15189, l'exactitude est l'étroitesse de l'accord entre une valeur mesurée et la valeur vraie d'un mesurande (76). De même que pour la justesse, il n'existe pas d'étalons primaires, de matériaux de référence certifiés (MRC) ou de méthodes de référence traçables au Système International ou à des étalons internationaux pour l'immunophénotypage des LT CD4. Nous avons donc évalué l'exactitude à partir des résultats des Evaluations Externes de la Qualité (EEQ).

Selon le SH REF 02 (78), les laboratoires accrédités doivent participer à une EEQ chaque trimestre pour les examens les plus courants, et cette évaluation de l'exactitude n'est pertinente que lorsque le nombre de participants à l'EEQ est suffisant. La participation au Contrôle National de Qualité (CNQ) de l'ANSM est obligatoire, mais insuffisant compte tenu de sa fréquence (moins d'un par an). Nous participons donc également au programme d'assurance qualité UK NEQAS (United Kingdom National External Quality Assurance Service), diffusé dans le monde entier et permettant la confrontation des résultats de plusieurs centaines de laboratoires réalisant des phénotypes lymphocytaires. Cet EEQ représente 6 consultations annuelles de 2 échantillons de sang stabilisé avec environ 450 participants.

La valeur de LT CD4 rendue par notre laboratoire est comparée à la moyenne des résultats, pour le même échantillon, issus du groupe de pairs « utilisateurs de l'AQUIOS CL ». Nous analysons généralement deux fois de suite l'échantillon d'EEQ et nous comparons notre moyenne à celle des

pairs. L'écart observé correspond à l'inexactitude. Pour les UK NEQAS, un z Score est calculé selon la formule suivante :

$$z \text{ Score} = \frac{\text{moyenne labo} - \text{moyenne des pairs}}{\text{Écart-type des pairs}}$$

Nous avons participé au CNQ de l'ANSM fin mai 2016 avec les AQUIOS CL (échantillons 16TYL1 et 16TYL2). Les résultats figurent dans le **tableau 13**. Moins de 7 laboratoires ayant rendu des résultats issus de l'AQUIOS CL, nous n'avons pu comparer notre résultat à notre groupe de pairs, mais seulement au groupe « toute technique confondue ». Ainsi, selon les critères de l'ANSM, tous nos résultats étaient acceptables, pour l'AQUIOS 1 comme l'AQUIOS 2 (notes A ou B).

Tableau 13. Contrôle national de qualité ANSM 2016

	Automate	Paramètre	Valeur labo	Nombre de participants	Moyenne participants	Limite acceptable	Note
<i>Echantillon 16TYL1 06/2016</i>	<u>AQUIOS 1</u>	LT CD4 (%)	46,41	115	46,71	7%	A
		LT CD4 (/µL)	662	77	705,5	20%	A
	<u>AQUIOS 2</u>	LT CD4 (%)	46,74	115	46,71	7%	A
		LT CD4 (/µL)	695	77	705,5	20%	A
<i>Echantillon 16TI 2 06/2016</i>	<u>AQUIOS 1</u>	LT CD4 (%)	10,89	118	10,24	11%	B
		LT CD4 (/µL)	132	78	130,8	23%	A
	<u>AQUIOS 2</u>	LT CD4 (%)	11,02	118	10,24	11%	B
		LT CD4 (/µL)	144	78	130,8	23%	A

L'écart entre le résultat du labo et la moyenne des participants est apprécié en fonction des limites acceptables (LA) :

A = Bon résultat: écart < 0,5 LA

B = Résultat acceptable: écart entre 0,5 et 1 LA

C = Résultat à contrôler: écart entre 1 et 2 LA

D = Résultat erroné: écart > 2 LA

Le **tableau 14** présente les résultats des premiers UK NEQAS reçus depuis l'installation des AQUIOS CL. L'AQUIOS CL étant commercialisé depuis peu, seuls 16 laboratoires ont répondu à cette EEQ. Deux échantillons ont été reçus, références 025 et 026. N'ayant qu'une seule inscription à l'EEQ UK NEQAS pour deux AQUIOS CL disponibles au laboratoire, nous avons décidé de rendre les résultats de l'AQUIOS 2 pour l'échantillon 025 (moyenne du duplicat) et les résultats de l'AQUIOS 1 pour l'échantillon 026 (moyenne du duplicat également) ; l'échantillon 025 a néanmoins été analysé sur l'AQUIOS 1 (mesure unique) et de même, l'échantillon 026 a été passé sur l'AQUIOS 2 (mesure unique). Ainsi, à la publication des résultats des pairs, nous avons pu comparer et calculer le biais et z Score pour les deux AQUIOS CL. Les résultats du z Score doivent être compris entre [-2 ; +2], c'est-à-dire que notre résultat est distant au maximum de ±2 écart-types de la valeur cible. Le **tableau 14**

montre que tous les échantillons d'UK NEQAS ont répondu à ces critères, sur chacun des deux AQUIOS CL.

Tableau 14. UK NEQAS 025 et 026

	Automate	Paramètre	Mesure 1	Mesure 2	Moyenne	Moyenne des pairs (n=16)	Ecart-type des pairs	z Score
Echantillon 025 30/05/2016	AQUIOS 1	LT CD4 (%)	26,6	-	26,6	26,0	0,60	1,00
		LT CD4 (/μL)	235	-	235	236,2	9,20	-0,13
	AQUIOS 2	LT CD4 (%)	27,0	25,1	26,1	26,0	0,60	0,02
		LT CD4 (/μL)	250	232	241	236,2	9,20	0,52
Echantillon 026 30/05/2016	AQUIOS 1	LT CD4 (%)	48,0	47,3	47,7	47,1	0,89	0,57
		LT CD4 (/μL)	575	546	560,5	571,9	17,87	-0,61
	AQUIOS 2	LT CD4 (%)	47,2	-	47,2	47,1	0,89	0,11
		LT CD4 (/μL)	570	-	570	571,9	17,87	-0,11

Il est à noter que cette EEQ utilise des échantillons spécifiquement formulés pour les AQUIOS CL et inclus dans l'« Immune Monitoring (Alternative Technologies) Programme ». En effet, l'échantillon classique UK NEQAS « Immune Monitoring Programme » envoyé aux utilisateurs d'autres types de cytomètres de flux pour quantifier les populations lymphocytaires, n'était à priori pas adapté à l'AQUIOS CL. Par curiosité, nous avons donc analysé l'échantillon d'EEQ reçu pour notre Navios sur l'AQUIOS (**Fig.10**). Les aspects des histogrammes issus de l'UK NEQAS du Navios paraissent en effet moins jolis que l'UK NEQAS spécifique de l'AQUIOS CL ; la taille (FS et EV) des polynucléaires est affaissée dans l'échantillon du Navios, suggérant une conservation moins optimale que l'échantillon spécifique de l'AQUIOS CL ; les populations leucocytaires sont également moins bien discriminées sur l'histogramme CD45/SS ; enfin sur le graphe biparamétrique CD4/CD8, la population CD8+ est mieux séparée de la population négative dans l'échantillon spécifique de l'AQUIOS CL. Au niveau des résultats quantitatifs de l'UK NEQAS du Navios, on observe pourtant peu de différence entre les résultats rendus par le Navios et par les AQUIOS CL 1 et 2: 48,4% versus 44,4 et 44,6% LT CD4 respectivement ; 651 versus 601 et 643 LT CD4/μL respectivement. Ceci confirme la robustesse des AQUIOS CL pour la numération des LT CD4.

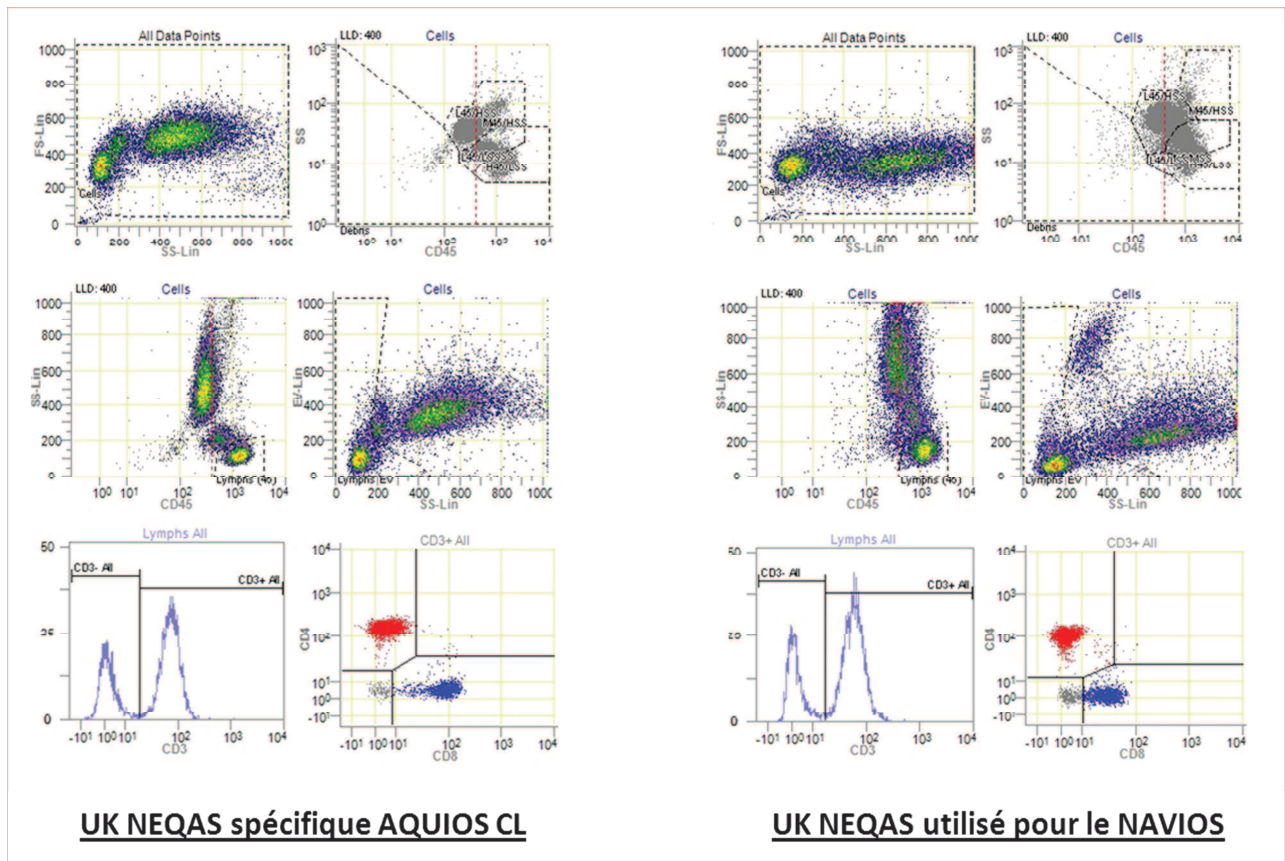


Figure 10. Comparaison des aspects des histogrammes de l'UK NEQAS spécifique des AQUIOS CL et de l'UK NEQAS utilisé pour le NAVIOS

4. Incertitude de mesure

Selon le SH GTA 014 (77), l'incertitude de mesure liée à la phase analytique du processus de l'examen biologique doit être connue afin d'améliorer l'interprétation des résultats. En effet, l'incertitude associée au résultat permet une meilleure évaluation en confortant le diagnostic et la prise de décision thérapeutique. Elle permet d'apporter des informations supplémentaires pour comparer une valeur à son antériorité ou encore appréhender le risque par rapport à un seuil décisionnel (Fig.11).

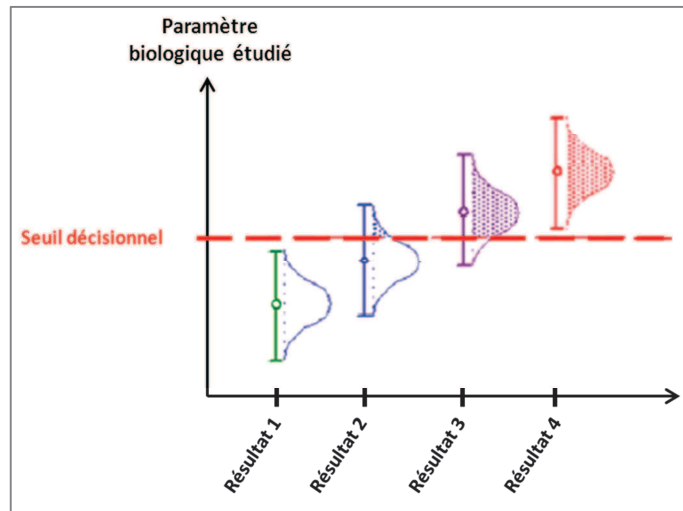


Figure 11. Intérêt de l'incertitude de mesure (77)

L'incertitude de mesure permet d'apprécier la différence significative entre deux valeurs (résultat 1 diffère du résultat 4, mais ne diffère ni du résultat 2 ni 3) et de mettre en évidence les éventuels risques de faux-positifs (résultat 3) ou faux-négatifs (résultat 2) autour d'un seuil décisionnel.

Chacun des facteurs pouvant influencer le résultat de l'examen biologique devra être pris en compte, listé, et si possible en quantifier l'impact sur l'incertitude de mesure : phase pré-analytique, analytique (échantillonnage, préparation des échantillons ...), calibrateurs, matériaux de référence, conditions expérimentales (température, délai, anticoagulant ...), changements de manipulateurs, etc... Tout ceci est consigné dans la partie « maîtrise de risque » du dossier de validation de méthode (**ANNEXE 1**). La variabilité biologique due au patient n'est pas prise en compte dans la détermination de l'incertitude de mesure, mais elle est bien entendu à prendre en considération pour l'exploitation du résultat de l'examen, notamment en termes d'interprétation et de décision cliniques/thérapeutiques par rapport à un seuil ou à un résultat antérieur.

Il existe plusieurs approches valides pour la détermination de l'incertitude de mesure. Nous avons utilisé celle dénommée « méthode intra-laboratoire (CIQ + Matériaux de référence) ». Elle repose sur les résultats disponibles au laboratoire, à savoir ceux de la fidélité intermédiaire et de la justesse (évaluations externes de la qualité). Les composants d'incertitude quantifiables sont :

- L'écart-type de fidélité intermédiaire (déterminé lors de la validation de méthode) : SD_{FI}
 - o L'incertitude liée à la fidélité intermédiaire $U_{FI} = SD_{FI}$
- L'erreur de justesse : $E_{Justesse}$ tirée des résultats d'EEQ
 - o $E_{Justesse} = \text{Valeur du laboratoire} - \text{Moyenne du groupe de pairs}$
 - o L'incertitude liée à la justesse se calcule comme suit :

$$U_{\text{justesse}} = \frac{|E_{\text{justesse}}|}{\sqrt{3}}$$

- L'incertitude d'étalonnage et de modélisation : non accessibles à l'utilisateur des AQUIOS CL

L'incertitude combinée **u(C)** est défini par la racine de la somme quadratique de toutes les composantes d'incertitude $u(C) = \sqrt{(U_{\text{Justesse}}^2 + U_{\text{FI}}^2)}$

Enfin, l'incertitude élargie **U** est défini par **k . u(C)**, en prenant le *facteur d'élargissement* **k = 2**, correspondant à un niveau de confiance à 95% (77). U représente **l'erreur totale analytique**. Elle est exprimée en valeur absolue et en pourcentage à deux niveaux de concentration en LT CD4.

Les résultats sont consignés dans le **tableau 15**. Ainsi, pour une numération des lymphocytes T CD4 de 504 /μL sur l'AQUIOS 1, le résultat devra être présenté sous la forme 504 ± 35 LT CD4 /μL ; à une concentration plus faible de LT CD4, il faudra plutôt utiliser l'erreur totale de 10,4%.

Tableau 15. Incertitude de mesure pour la numération des LT CD4 en valeur absolue

	Echantillon	Valeur cible*	SD _{FI} = U _{FI}	EEQ _{labo}	EEQ _{pairs}	E _{Justesse}	U _{Justesse}	u(C)	U	U (%)
AQUIOS 1	AQUIOS Immunotrol Cells lot 6170009	504	16,0	560,5	571,9	11,4	6,6	17,3	34,7	6,9
	AQUIOS Immunotrol Low Cells lot 6180011	153	7,9	235,0	236,2	1,2	0,7	8,0	15,9	10,4
AQUIOS 2	AQUIOS Immunotrol Cells lot 617009	504	14,4	570,0	571,9	1,9	1,1	14,5	28,9	5,7
	AQUIOS Immunotrol Low Cells lot 618011	153	8,6	241,0	236,2	4,8	2,8	9,0	18,0	11,8

* Valeur cible du CQI fournie par le fournisseur

L'erreur totale limite conseillée par Ricos *et al.* est de 17,6% pour la numération des lymphocytes totaux (82). Aucune recommandation n'est disponible pour les LT CD4 en particulier.

5. Intervalle de mesure

a) Limite de quantification

Selon la norme ISO 15189, la limite de quantification correspond à la plus petite valeur mesurée fournie avec un niveau de fiabilité acceptable et d'incertitude connue, qui peut donc être rendue comme résultat pour un échantillon de patient (76). Ainsi, un échantillon a été dilué en série

et chaque dilution mesurée plusieurs fois (entre 6 et 8 fois selon le volume disponible) afin de déterminer le CV pour chaque concentration. La courbe d'Horwitz permet ensuite de déterminer la limite de quantification qui correspond à la plus petite concentration rendue avec un CV inférieur ou égal à 10% (Fig.12).

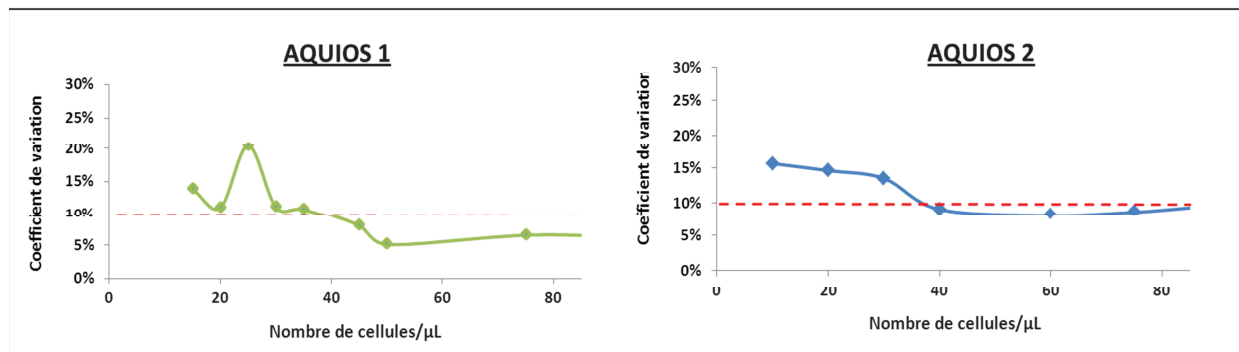


Figure 12. Limite de quantification : courbes d'Horwitz

La limite de quantification des AQUIOS 1 et 2 est de 40 LT CD4/μL. Pour un CV acceptable de 15%, les limites de quantification seraient respectivement de 30 et 20 LT CD4/μL. En pratique, pour des échantillons très lymphopéniques en LT CD4, les biologistes rendent donc « Inférieur à 40 LT CD4/μL » sur les compte-rendus de résultats biologiques destinés aux cliniciens, et non plus une valeur numérique.

Pour rappel, la limite de quantification de l'AQUIOS CL évalué dans l'article de *Cytometry* était différente (20 LT CD4/μL) (81), renforçant l'importance de déterminer le domaine de mesure de chaque nouvel automate avant sa mise en service, afin de maîtriser les résultats rendus.

b) Limite de linéarité

En cytométrie en flux, l'utilisation d'anticorps pour détecter les marqueurs cellulaires implique un phénomène de saturation des anticorps. En effet, pour des échantillons à forte cellularité et présentant le marqueur d'intérêt, le signal de fluorescence atteint un palier de saturation quand tous les anticorps sont liés à l'antigène, malgré le fait qu'il reste des sites antigéniques disponibles. Afin de déterminer cette limite de linéarité, on dilue en série un échantillon de concentration très élevée, et chaque concentration est mesurée deux fois. En traçant la droite linéaire passant par zéro, on détermine la plus haute concentration du domaine de linéarité, au-dessus de laquelle il faudra diluer l'échantillon pour pouvoir rendre le résultat de l'échantillon patient (Fig.13).

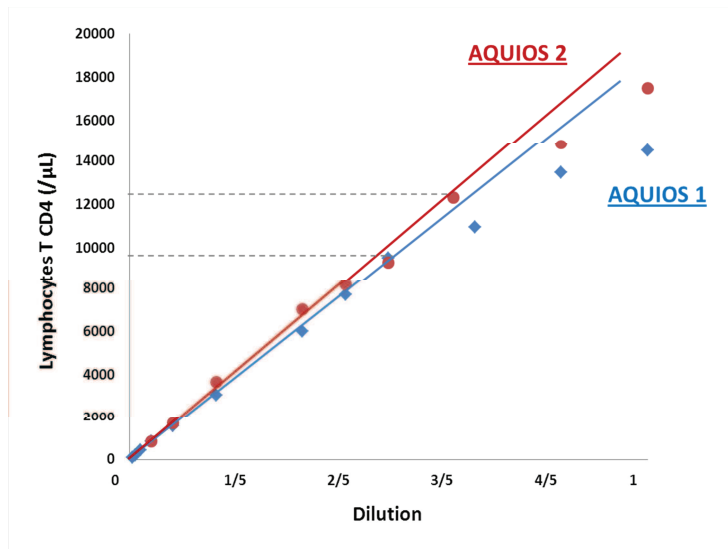


Figure 13. Limite de linéarité des AQUIOS CL

Les limites de linéarité des AQUIOS 1 et 2 sont donc respectivement de 10.000 et 12.000 LT CD4/µL. Cette étude s'est traduite en pratique au laboratoire par une dilution systématique de tout échantillon dépassant la limite de linéarité des automates.

Pour rappel, aucune limite de linéarité n'avait été mise en évidence lors du β -test sur site dans le domaine étudié (jusqu'à environ 20.000 LT CD4/µL) (81); ceci souligne l'importance de déterminer le domaine de mesure de chaque automate avant sa mise en service, afin de maîtriser les résultats rendus.

6. Contaminations

a) Contamination inter-échantillon

Nous avons évalué la potentielle contamination entre deux échantillons analysés successivement sur l'AQUIOS CL. Pour cela, un échantillon présentant une concentration élevée en LT CD4 a été dosé trois fois consécutivement (H1, H2, H3 ; moyenne mH), puis un échantillon de faible concentration en LT CD4 a été également analysé 3 fois (B1, B2, B3). Cette séquence a été répétée 5 fois, afin d'établir la moyenne des B1 (mB1) potentiellement contaminés par le dernier passage de l'échantillon de forte concentration, et la moyenne des B3 (mB3) probablement non contaminés (Fig.14).

Cycle 1	Cycle 2	Cycle 3	Cycle 4	Cycle 5
H1	H1	H1	H1	H1
H2	H2	H2	H2	H2
H2	H2	H2	H2	H2
B1	B1	B1	B1	B1
B2	B2	B2	B2	B2
B3	B3	B3	B3	B3

Figure 14. Schéma du déroulement du test de contamination inter-échantillon

La différence entre ces deux moyennes a été ensuite évaluée à l'aide d'un test de Mann-Whitney, et le pourcentage de contamination entre les échantillons est calculé de la façon suivante:

Pour l'AQUIOS 1, les tests de surcharge ont été effectués à l'aide d'échantillons présentant 3% versus 77% de LT CD4 et 52 versus 1492 LT CD4/ μ L. Pour l'AQUIOS 2, des échantillons 8% versus 49% de LT CD4 et 89 versus 1562 LT CD4/ μ L ont été utilisés. Compte tenu de l'importance clinique de ces examens, il est évident que le niveau de la contamination doit être proche de zéro : pour aucun des deux automates testés il n'a été mis en évidence de contamination inter-échantillon significative (**Tableau 16**).

Tableau 16. Test de contamination inter-échantillon des AQUIOS CL

Automate	Paramètre	pValue	Taux de contamination (%)
AQUIOS 1	LT CD4 (%)	0,596	0,12
	LT CD4 (/μL)	0,528	0,14
AQUIOS 2	LT CD4 (%)	0,116	1,06
	LT CD4 (/μL)	0,139	0,54

b) Contamination inter-réactif

L'AQUIOS CL est capable de déterminer la numération des LB et des NK par un test « Tétra 2 ». Nous n'utilisons pas cette option au laboratoire. Pourtant, nous étions intéressés de tester la potentielle contamination entre le réactif Tétra 1 servant à la numération des LT CD4 et CD8, et le réactif Tétra 2, puisque les réactifs sont distribués par la même seringue. Sur un échantillon, les LT CD4 sont quantifiés 10 fois de suite, puis de nouveau dix fois mais en alternance avec la quantification des LB et NK. La moyenne des LT CD4 de la première série est déterminée, puis celle de la deuxième série passée en alternance avec le Tétra 2. Un test de Mann-Whitney permet ensuite de tester l'égalité des moyennes (**Tableau 17**). Si les moyennes sont différentes, c'est qu'il existe une contamination entre les deux réactifs ayant un impact sur le résultat de la numération des LT CD4.

Tableau 17. Test de contamination inter-réactif des AQUIOS CL

Automate	Paramètre	pValue
AQUIOS 1	LT CD4 (%)	0,149
	LT CD4 (/μL)	0,070
AQUIOS 2	LT CD4 (%)	0,606
	LT CD4 (/μL)	0,069

Aucune contamination significative n'a été montrée sur les AQUIOS CL installés au laboratoire, à la différence de ce qui avait été mis en évidence pendant la β-évaluation de l'AQUIOS CL (81).

7. Comparaison de méthode

30 échantillons de patients issus de notre activité de routine ont été utilisés pour la comparaison de méthode. Le ratio homme/femme était de 0,76 ; l'âge s'étendait de 6 semaines à 81 ans (dont 6 patients pédiatriques) ; les principales pathologies étaient l'infection à VIH (47%), les pathologies auto-immunes (17%), les hémopathies malignes traitées ou non par greffe de moelle osseuse (10%), les asthmes traités au long cours par corticothérapie (10%) et les déficits immunitaires congénitaux (7%). Tel que recommandé par la norme ISO15189, nous avons analysé des valeurs de LT CD4 représentatives de celles rencontrées en routine, sur une gamme la plus large possible.

Nous avons comparé chaque AQUIOS CL avec la méthode de référence utilisée précédemment au laboratoire, le cytomètre FC500 (Beckman Coulter). Nous avons aussi comparé les deux AQUIOS CL entre eux pour vérifier qu'ils étaient bien interchangeables et pouvaient être utilisés en miroir. Pour chacune de ces comparaisons, nous avons étudié la concordance entre les cytomètres, illustrée par le diagramme des différences de Bland-Altman. Nous avons également évalué la corrélation entre les résultats ; pour cela, le coefficient de corrélation de Spearman R a été déterminé et testé statistiquement, l'ordonnée à l'origine et le coefficient directeur de la droite de corrélation comparés à 0.

a) Comparaison AQUIOS CL et méthode de référence FC500

(1) AQUIOS 1 versus FC500

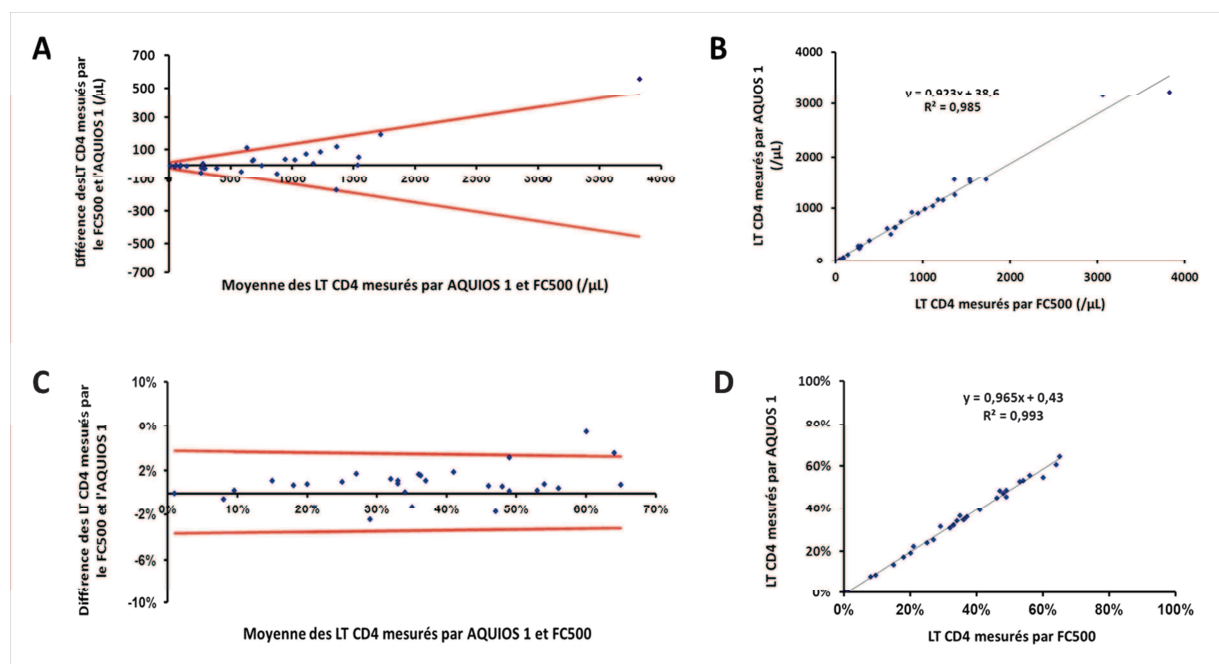


Figure 15. Comparaison de la numération des LT CD4 par l'AQUIOS 1 et le FC500

Les diagrammes de Bland-Altman pour les valeurs absolues (**Fig.15A**) et les pourcentages (**Fig.15C**) de LT CD4 ont mis en évidence 4 déviants. Les histogrammes des échantillons correspondants ont été ré-examinés sur chacun des cytomètres. Les fenêtrages des populations d'intérêt étaient corrects, la séparation entre les monocytes et les lymphocytes était nette et aucun problème de lyse n'a été noté. Les CQI au moment de l'analyse de ces échantillons étaient validés sur chacun des cytomètres. Pour les valeurs absolues (**Fig.15A**), le déviant à 3573 LT CD4/ μ L de moyenne était hors des seuils décisionnels et sans impact sur la prise en charge clinique du patient. Le déviant à 579 LT CD4/ μ L de moyenne se situait juste au niveau de la limite supérieure de concordance et n'aurait pas eu d'impact clinique ou thérapeutique. Pour les pourcentages (**Fig.15C**), les déviants représentaient des différences de 5,4 et 3,6 % par rapport à des moyennes de 57,3 et 62,2% respectivement ; ces différences n'auraient pas non plus eu d'impact sur la prise en charge du patient.

Les résultats de la numération des LT CD4 en valeur absolue et en pourcentage issus des deux cytomètres semblaient linéairement corrélés sur les **figures 15B et 15D** respectivement. Confirmant la corrélation linéaire, les coefficients de corrélation R^2 étaient significatifs (0,985 et 0,993 respectivement pour les valeurs absolues et les pourcentages ; $p < 2.10^{-16}$) et les coefficients directeurs des deux droites significativement différents de 0 ($p < 2.10^{-16}$). Enfin, aucun biais n'a été

mis en évidence entre les résultats de l'AQUIOS 1 et du FC500, puisque les ordonnées à l'origine des valeurs absolues (+38,4 LT CD4/ μ L) et des pourcentages (+0,43% de LT CD4) n'étaient pas significativement différentes de 0 ($p = 0,155$ et $0,493$ respectivement).

CONCLUSION. Les méthodes de numération des sous-populations lymphocytaires T par l'AQUIOS 1 et le FC500 sont considérées comme interchangeables.

(2) AQUIOS 2 versus FC500

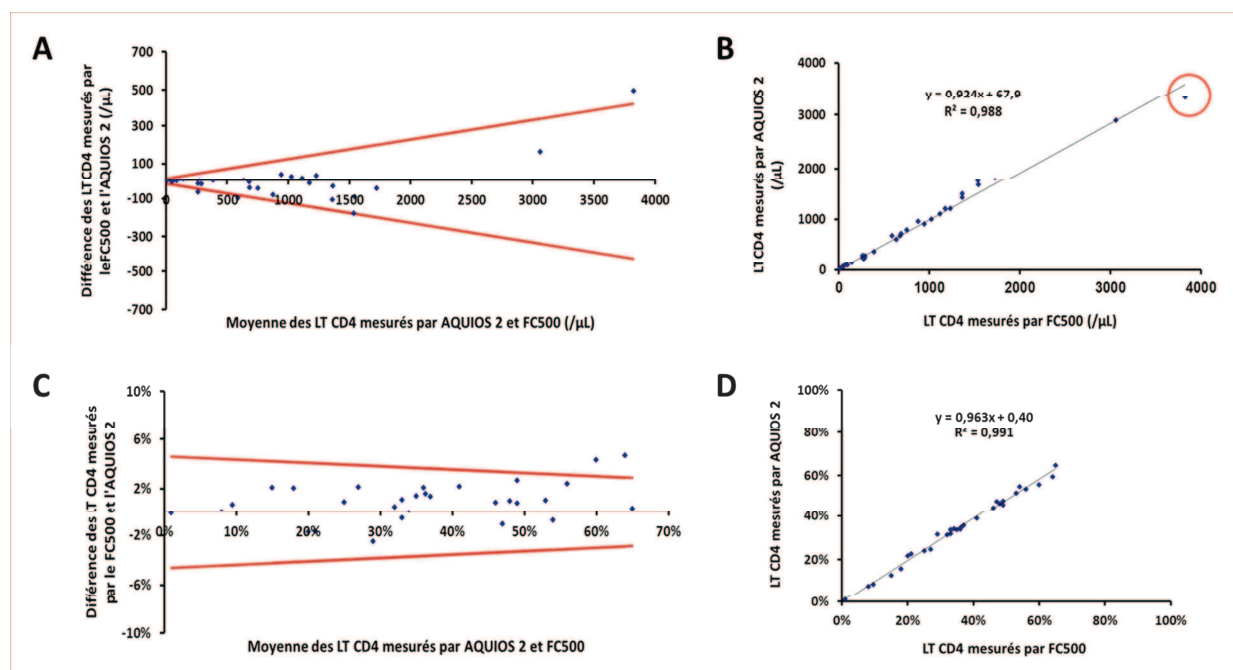


Figure 16. Comparaison de la numération des LT CD4 par l'AQUIOS 2 et le FC500

Les diagrammes de Bland-Altman pour les valeurs absolues (**Fig.16A**) et les pourcentages (**Fig.16C**) de LT CD4 ont mis en évidence 5 déviants. Les histogrammes des échantillons correspondants ont été ré-examinés sur chacun des cytomètres. Les fenêtrages des populations d'intérêt étaient corrects, la séparation entre les monocytes et les lymphocytes était nette et aucun problème de lyse n'a été noté. Les CQI au moment de l'analyse de ces échantillons étaient validés sur chacun des cytomètres. Pour les valeurs absolues (**Fig.16A**), les déviants à 3576 et 638 LT CD4/ μ L de moyenne étaient hors des seuils décisionnels et sans impact sur la prise en charge clinique des patients. Le déviant à 293 LT CD4/ μ L était proche des seuils décisionnels mais se situait juste au niveau de la limite inférieure de concordance. Pour les pourcentages (**Fig.16C**), les déviants représentaient des différences de 4,4 et 4,7% par rapport à des moyennes de 57,9 et 61,7% respectivement ; ces différences étaient également hors des seuils décisionnels et n'auraient pas eu d'impact sur la prise en charge du patient.

Les résultats de la numération des LT CD4 en valeur absolue et en pourcentage issus des deux cytomètres semblaient linéairement corrélés sur les **figures 16B et 16D** respectivement. Confirmant la corrélation linéaire, les coefficients de corrélation R^2 étaient significatifs (0,988 et 0,991 respectivement pour les valeurs absolues et les pourcentages ; $p < 2.10^{-16}$) et les coefficients directeurs des deux droites significativement différents de 0 ($p < 2.10^{-16}$). Enfin, l'ordonnée à l'origine des résultats de pourcentage (+0,40% de LT CD4) n'était pas significativement différente de 0 ($p = 0,560$), alors que celle des valeurs absolues (+67,9 LT CD4/ μ L) était associée à une pValue significative ($p = 0,008$), suggérant une potentielle surestimation des valeurs absolues de LT CD4 par l'AQUIOS 2 par rapport au FC500. Lorsque l'on s'affranchit du principal déviant visible sur cette corrélation (3823 et 3328 LT CD4/ μ L sur le FC500 et l'AQUIOS 2 respectivement) (**Fig.16B**), le biais disparaît, le coefficient directeur passant de 0,924 à 0,989 et l'ordonnée à l'origine de +67,9 à +27,6. Nous n'avons donc pas retenu ce biais, provenant principalement d'un déviant qui est par ailleurs totalement hors des bornes décisionnelles et n'a donc aucun impact sur la prise en charge du patient.

CONCLUSION. Les méthodes de numération des sous-populations lymphocytaires T par l'AQUIOS 2 et le FC500 sont considérées comme interchangeables.

b) Comparaison AQUIOS 1 et AQUIOS 2

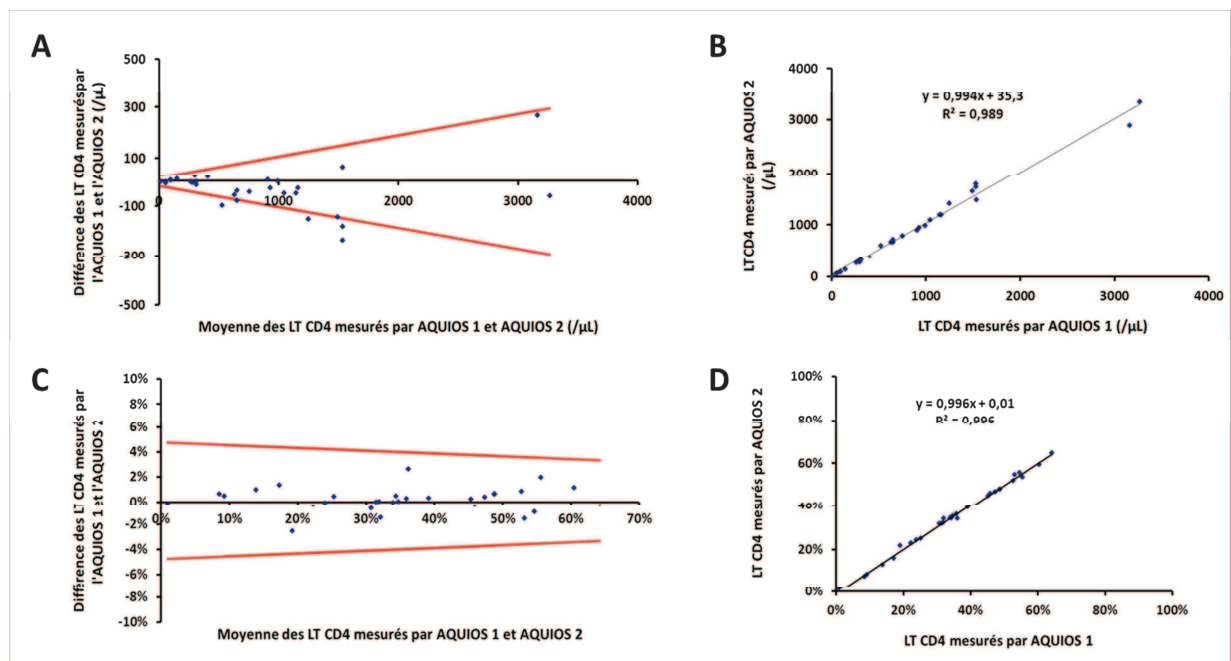


Figure 17. Comparaison de la numération des LT CD4 par l'AQUIOS 1 et l'AQUIOS 2

Les diagrammes de Bland-Altman ont mis en évidence 4 déviants pour les valeurs absolues uniquement (**Fig.17A et 17C**). Les histogrammes des échantillons correspondants ont été ré-examinés sur chacun des cytomètres. Les fenêtrages des populations d'intérêt étaient corrects, la séparation entre les monocytes et les lymphocytes était nette et aucun problème de lyse n'a été noté. Les CQI au moment de l'analyse de ces échantillons étaient validés sur chacun des cytomètres. Les déviants à 1622, 1330, 1649, 572 et 689 LT CD4/ μ L de moyenne étaient hors des seuils décisionnels et sans impact sur la prise en charge clinique des patients.

Les résultats de la numération des LT CD4 en valeur absolue et en pourcentage issus des deux cytomètres semblaient linéairement corrélés sur les **figures 17B et 17D** respectivement. Confirmant la corrélation linéaire, les coefficients de corrélation R^2 étaient significatifs (0,989 et 0,996 respectivement pour les valeurs absolues et les pourcentages ; $p < 2.10^{-16}$) et les coefficients directeurs des deux droites significativement différents de 0 ($p < 2.10^{-16}$). Enfin, aucun biais n'a été mis en évidence entre les résultats de l'AQUIOS 1 et de l'AQUIOS 2, puisque les ordonnées à l'origine des valeurs absolues (+35,3 LT CD4/ μ L) et des pourcentages (+0,01% de LT CD4) n'étaient pas significativement différentes de 0 ($p = 0,291$ et $0,784$ respectivement).

***CONCLUSION.** Les méthodes de numération des sous-populations lymphocytaires T par l'AQUIOS 1 et 2 sont considérées comme interchangeables, les deux cytomètres sont donc considérés comme des automates en miroir.*

8. Récapitulatif et conclusion

Le **tableau 18** résume les résultats obtenus lors de la validation de méthode des AQUIOS 1 et 2. L'ensemble de cette validation de méthode a donné des résultats satisfaisants sur les deux cytomètres, conformes à l'état de l'art de la méthodologie de cytométrie, et répondant aux recommandations des sociétés savantes et exigences du COFRAC. Les résultats ont été consignés dans les dossiers de validation de méthode des cytomètres, où figurent également la maîtrise des risques de la numération des LT CD4. Ils ont été envoyés pour relecture à la société CT2M (Centre Technologique Méditerranéen de Métrologie), et archivés après prise en compte de leurs remarques. Le dossier de validation de méthode de l'AQUIOS 1 est consultable en **ANNEXE 1** à titre d'exemple.

Tableau 18. Récapitulatif des résultats de validation de méthode des AQUIOS 1 et 2

	AQUIOS 1				AQUIOS 2			
	% LT CD4		LT CD4 / μ L		% LT CD4		LT CD4 / μ L	
	Immunotrol Low Cells	Immunotrol Cells	Immunotrol Low Cells	Immunotrol Cells	Immunotrol Low Cells	Immunotrol Cells	Immunotrol Low Cells	Immunotrol Cells
Répétabilité CV (%)	4,32	1,47	4,98	2,96	3,94	1,71	4,37	1,96
Reproductibilité CV (%)	3,86	1,85	5,13	3,13	4,60	1,82	5,50	2,81
Justesse	<i>En attente des résultats de l'IQAP</i>							
Exactitude	CNQ de l'ANSM: notes A et B, UK NEQAS: z Scores entre [-2 ; +2]							
Incertitude de mesure	LT CD4 / μ L: Entre 6,9 et 10,4%				LT CD4 / μ L: Entre 5,7 et 11,8%			
Intervalle de mesure	40 - 10 000 LT CD4/ μ L				40 - 12 000 LT CD4 / μ L			
Taux de contamination inter-échantillon (%)	0,12		0,14		1,06		0,54	
Contamination inter-réactif	Aucune contamination				Aucune contamination			
Comparaison de méthode	AQUIOS 1 comparable et interchangeable à la méthode de référence FC500				AQUIOS 2 comparable et interchangeable à la méthode de référence FC500			
	AQUIOS 1 et AQUIOS 2 comparables et interchangeables : automates en miroir							

C. Retour d'expérience sur les 6 premiers mois d'utilisation en routine

1. Rédaction des procédures d'utilisation

a) Procédure d'utilisation de l'AQUIOS CL

La procédure d'utilisation de l'AQUIOS CL est disponible en **ANNEXE 2** : « Numération des lymphocytes T en valeur absolue par le cytomètre en flux AQUIOS CL (Beckman Coulter) ».

b) Procédure de gestion des contrôles de qualité

(1) Procédure de gestion des CQI

Les résultats des CQI sont consultables dans un onglet dédié sur l'AQUIOS CL. Cet onglet présente les résultats de CQI sous forme de diagramme de Levey-Jennings associés aux bornes fixes du fournisseur d'une part et de bornes mobiles (2SD et 3SD) d'autre part. Or, les premières sont généralement très peu adaptées à la pratique clinique : par exemple, sur l'Immuno-Trol™ Cells (lot 6170009), les bornes pour les lymphocytes totaux sont de $1092 \pm 371/\mu\text{L}$, représentant un CV de 11% environ, alors que les recommandations de Ricos *et al.* sont $< 5\%$; les bornes pour les LT CD4 sont de $504 \pm 106/\mu\text{L}$, représentant un CV de 7% environ alors que les CV observés au laboratoire sont habituellement de 3% environ. Quant aux bornes mobiles, elles ne permettent pas de suivre une éventuelle dérive ou la nécessité de recibler un CQI par exemple. Pour pallier à ces inconvénients, nous suivons donc les résultats des CQI sur le logiciel Laboratory Production Manager (LPM), où les bornes peuvent être définies par les biologistes selon la procédure de gestion des contrôles (période probatoire, alarmes pour les règles d'alerte/de rejet, ...)

La procédure de gestion des contrôles de qualité est disponible en **ANNEXE 3** : « Procédure de gestion des contrôles qualité de l'immunologie cellulaire ».

(2) Exemple de prise en charge d'un CQI incorrect

Le 30 mai 2016, le CQI Immuno-Trol™ Low Cells du matin passé sur l'AQUIOS 2 est incorrect : les séparations sont effondrées et les aspects des histogrammes impactés en conséquence (**Fig.18**). Nous avons donc repassé le CQI, pour éliminer un éventuel problème technique lors de la précédente analyse. Le nouveau résultat était identique au précédent. N'ayant changé aucun lot ou flacon de réactif par rapport à la veille, nous avons donc conclu que ce flacon particulier de CQI était peut-être en cause. Ainsi, nous avons passé un nouveau flacon d'Immuno-Trol™ Low Cells (même lot) sur l'AQUIOS 2 ; en parallèle, le flacon posant problème a été analysé sur l'AQUIOS 1. Les résultats du nouveau flacon de CQI passé sur l'AQUIOS 2 étaient alors corrects ; le flacon ayant posé problème sur l'AQUIOS 2 était également mauvais sur l'AQUIOS 1. Ceci validait donc le fait que les résultats

incorrects du CQI était liés au flacon d'Immuno-Trol™ Low Cells et non pas à une défaillance du cytomètre AQUIOS 2.

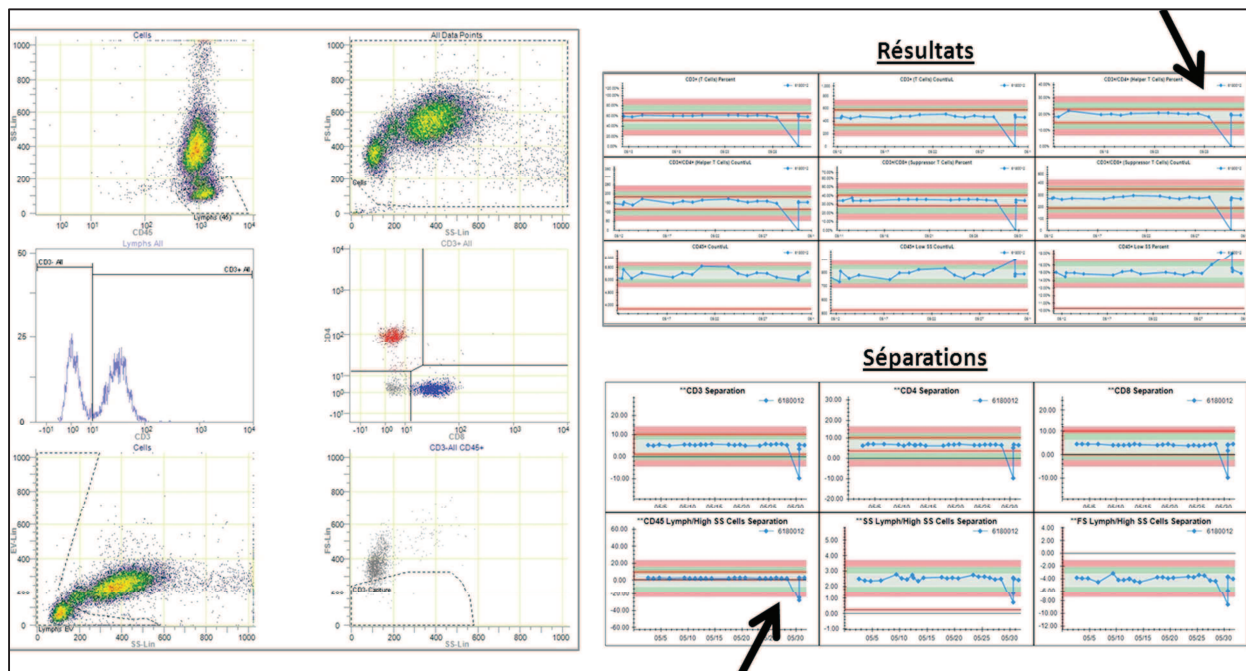


Figure 18. Histogrammes et diagrammes de Levey-Jennings du CQI incorrect

Les nuages de différentes sous-populations leucocytaires sont collés les uns aux autres sur les graphiques ; la séparation entre les pics CD3-All et CD3+All est insuffisante; la population de LT CD8+ est peu dissociée des LT CD8-. Ces aspects inhabituels sont retranscrits sur les Levey-Jennings par des résultats et des séparations totalement aberrants.

A noter, ce dernier présentait un aspect noir laqué différent des autres flacons d'Immuno-Trol™ Low Cells du même lot, dont celui de la même boîte, comme illustré sur la **figure 19**. Le flacon avait été reçu au laboratoire dans la glace, stocké dès réception à +4°C et jamais sorti du réfrigérateur avant utilisation.



Figure 19. Aspect noir laqué du flacon d'AQUIOS Immunotrol Low Cells incorrect

A droite, le flacon ayant posé problème ; à gauche, le deuxième flacon de la boîte, d'aspect normal.

c) Procédure de validation technique et biologique

La procédure de validation technique et biologique de l'AQUIOS CL est disponible en **ANNEXE 4** : « Validation technique et biologique des numérations de lymphocytes T CD3+, CD4+ et CD8+ (TETRA 1) sur le cytomètre AQUIOS CL ».

2. Analyse des problèmes rencontrés

a) Problèmes de lyse et d'histogramme SS/EV

(1) Description des problèmes de lyse

Le principal problème rencontré lors de l'utilisation de l'AQUIOS CL est un problème de lyse sur de nombreux échantillons. Ces problèmes n'avaient pas été observés lors du β -test de l'AQUIOS CL au laboratoire. Ils ont plusieurs conséquences sur l'analyse et le résultat :

- Une perturbation du fenêtrage des sous-populations leucocytaires entraînant une numération des leucocytes erronée (**Fig.20A**)
- Une perturbation de l'histogramme SS/EV empêchant d'éliminer les monocytes du fenêtrage Lymphs EV.
 - o Si le pic CD3+All est contaminé par les monocytes, ceci engendre une surestimation des valeurs absolues de lymphocytes totaux, LT CD3, LT CD4 et CD8 (**Fig.20B**)
 - o Si la contamination ne touche pas le pic CD3+All mais seulement le pic CD3-All, il n'y a aucune conséquence sur les valeurs absolues des lymphocytes totaux, LT CD3, CD4 et CD8 (ni sur leurs pourcentages).
- Une perturbation de l'histogramme SS/EV ainsi que de l'histogramme SSLin/CD45 : contamination de Lymphs EV et Lymphs 45 par des monocytes, voire des polynucléaires (**Fig.20C**). Dans ce cas, le pic CD3- est contaminé, surestimant le nombre de lymphocytes totaux, et faussant les pourcentages des sous-populations lymphocytaires T CD3, CD4 et CD8 (**Fig.20C**). Le pic CD3+All peut également être contaminé, engendrant des valeurs absolues de LT CD3, CD4 et CD8 erronées.

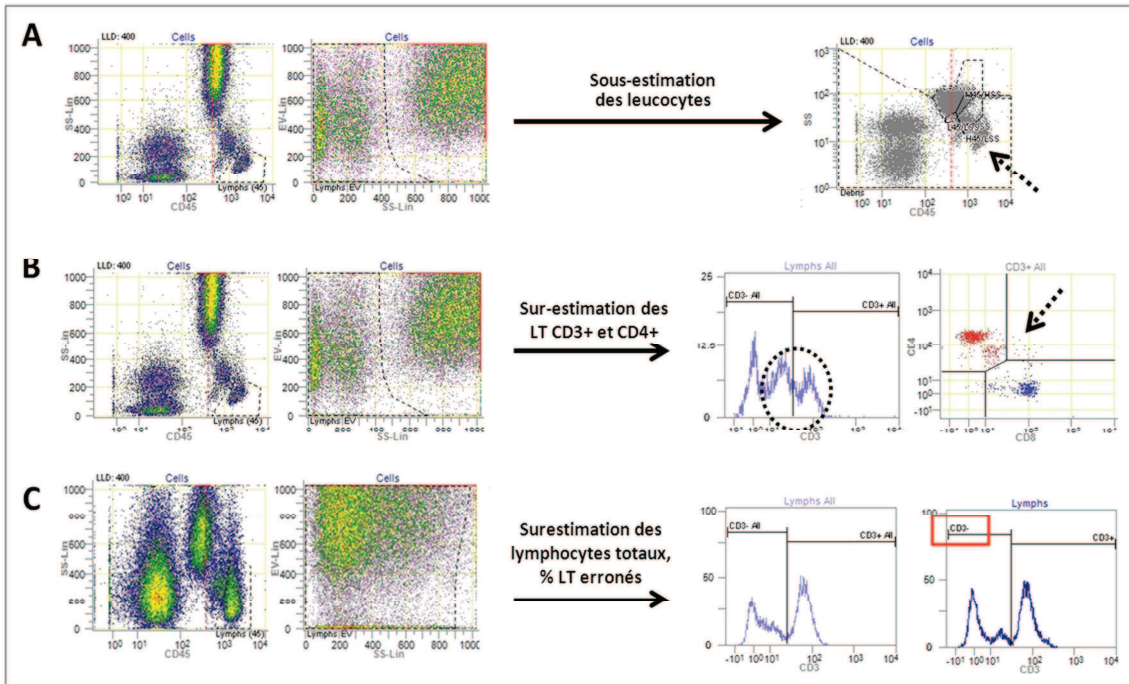


Figure 20. Problèmes de lyse rencontrés sur l'AQUIOS CL

De plus, malgré une lyse satisfaisante, certains échantillons présentent un histogramme SS/EV perturbé, empêchant une bonne distinction des monocytes et des lymphocytes (**Fig.21**). Cette contamination des résultats par les monocytes est visible sur l'histogramme monoparamétrique du CD3, surestimant ainsi le compte de LT, plus particulièrement LT CD4 (cf histogramme biparamétrique CD8/CD4), et de lymphocytes totaux. Sur la **figure 21**, l'option 2 de fenêtrage, paraît exclure les monocytes de lymphs EV sur le graphe SS/EV par rapport à l'option 1, mais pourtant ne suffit pas à éliminer la contamination monocyttaire visible sur l'histogramme biparamétrique CD8/CD4.

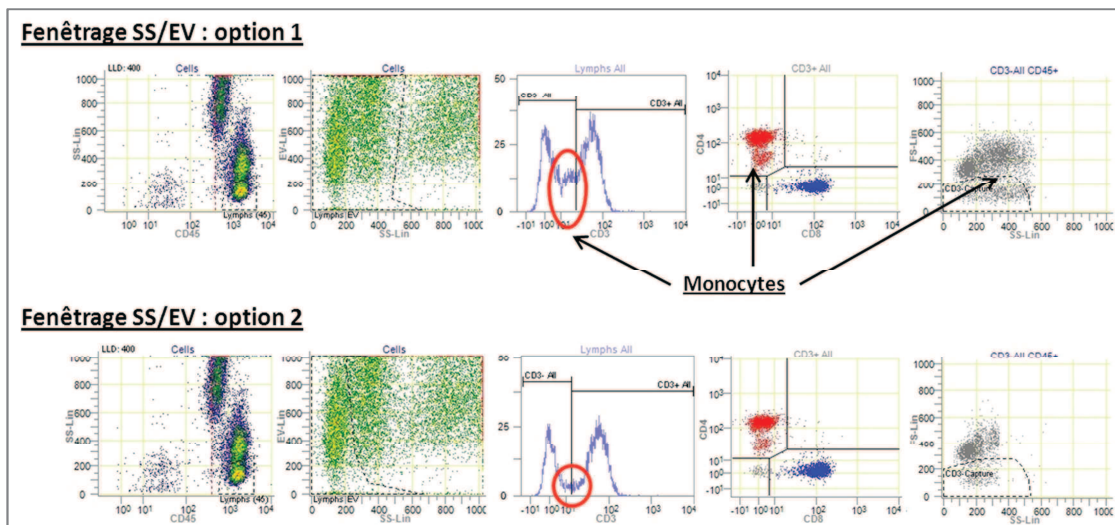


Figure 21. Aspect problématique de l'histogramme SS/EV

Nous avons étudié, sur un mois complet, la fréquence de ce problème de lyse ou de VE, afin d'essayer de mettre en évidence une éventuelle relation avec la démographie des patients ou les habitudes du laboratoire.

1233 échantillons ont été analysés entre le 14 mars et le 14 avril 2016. 607 (49,2%) ont été pris en charge sur l'AQUIOS 1 et 626 (50,8%) sur l'AQUIOS 2. 135 (10,9%) problèmes de lyse ont été répertoriés, dont 54 sur l'AQUIOS 1 et 81 sur l'AQUIOS 2. Il est intéressant de noter que lorsque l'on repasse un bilan mal lysé sur le deuxième AQUIOS CL, le problème ne se corrige pas, éliminant une éventuelle anomalie d'un des automates. L'âge des patients analysés s'étalait de 3 jours de vie à 87 ans, avec une moyenne de 54,9 ans. Le sexe ratio homme/femme était de 0,59. Les pathologies impliquées étaient très diverses, dans des proportions représentatives de la globalité des patients traités en routine : 61 infections à VIH, 24 maladies autoimmunes, 16 hémopathies, 4 fibromyalgies, 4 pathologies d'hépatologie, 2 cancers, 1 déficit immunitaire congénital, 2 bilans d'allergologie, 7 pathologies diverses et 13 sans informations cliniques disponibles. Certains patients avaient reçu des traitements pouvant impacter l'immunité et les différentes lignées cellulaires: chimiothérapies (4), greffe de moelle osseuse ou cellules souches (11), immunoglobulines (2), immunosuppresseurs dont corticothérapie au long cours (18) et Rituximab (12). Le délai entre le prélèvement et l'analyse sur l'AQUIOS CL s'étalait de 54 min à 23,3h. La température de la pièce est constamment suivie par une sonde de température étalonnée par un prestataire de métrologie accrédité COFRAC (**Fig.22**), et elle est également relevée manuellement au moment de l'allumage des AQUIOS CL. Les recommandations de Beckman Coulter par rapport aux variations de température sont:

- maintenir la température de la pièce entre 18 °C et 26 °C
- éviter les fluctuations de plus de $\pm 2,8$ °C lorsque le cytomètre est utilisé
- conserver les réactifs de lyse entre 18 et 26°C.

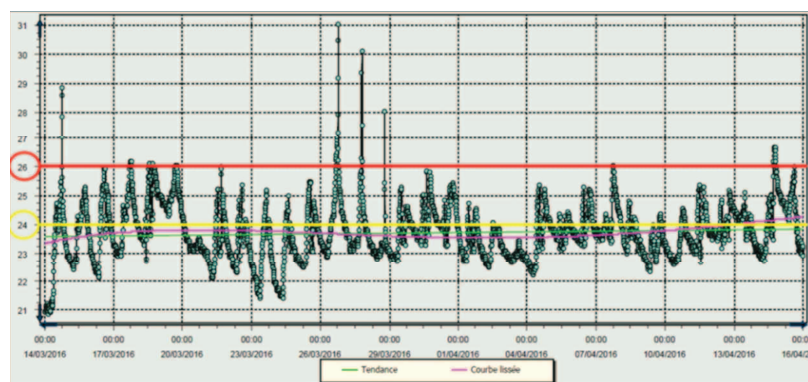


Figure 22. Relevé des températures de la pièce des AQUIOS CL

Sur ce graphique apparaissent la limite recommandée de 26°C (—) et la moyenne des températures relevée au moment de la mise en route des AQUIOS CL (—).

On note sur la **figure 22** que les minimums recommandés sont bien respectés puisque la température ne descend jamais en dessous de 20°C. Au contraire, on remarque plusieurs valeurs maximum au-dessus de 26°C ; en réalité, ces valeurs marginales correspondent à des périodes pendant lesquelles aucun échantillon n'est analysé sur les AQUIOS CL : après 17h30, week-end et jours fériés. La moyenne des températures relevées au moment de l'allumage des AQUIOS CL au cours du mois étudié était de 24,0°C ; on constate que la température pendant les heures d'utilisation des AQUIOS CL est bien comprise entre $24 \pm 2,8^\circ\text{C}$. Le seul bémol mis en évidence par rapport à la température de la pièce pourrait être le stockage des réactifs de lyse lorsque le système de climatisation ne fonctionne pas, puisque l'on remarque quelques pics de température au-dessus de 26°C hors des périodes d'activité du laboratoire ; pour remédier à cet inconvénient, nous avons donc depuis décidé de laisser le système de climatisation constamment en marche. Enfin, il est à noter que parmi les 135 patients dont les échantillons présentaient un problème de lyse, 32 avaient eu des bilans antérieurs analysés sur l'AQUIOS CL : 7 d'entre eux avaient des antécédents bien lysés et 26 présentaient déjà ce problème sur au moins un des bilans précédents.

Les problèmes de lyse ne paraissent donc pas être associés à la démographie des patients (aucune pathologie ou traitement spécifique), ni à un automate en particulier, ni être causés par un mauvais suivi de la température de la pièce de cytométrie ou un délai d'analyse trop important.

Les échantillons à problème étudiés ont été classés, après lecture par deux opérateurs différents, selon leur intensité : +, ++, +++ (**Fig.23**). 5 échantillons présentaient une lyse impeccable, mais ont été inclus dans l'étude à cause d'histogrammes SS/EV anormaux, entraînant les mêmes problématiques que les lyses incomplètes (**Fig.23A**). Parmi les problèmes de lyse, 15 échantillons correspondaient au premier groupe (**Fig.23B**), 74 au deuxième (**Fig.23C**) et 41 au dernier groupe (**Fig.23D**). Nous avons essayé de mettre en évidence des éventuels facteurs associés à ce dernier groupe, puisqu'avec le recul des premiers mois d'utilisation, celui-ci représente les seuls échantillons qui seront ré-analysés selon notre algorithme de validation (Cf **ANNEXE 5**) ; ainsi, aucune différence n'a été soulignée pour les échantillons du groupe « problème de lyse +++ » par rapport aux autres échantillons, en termes d'âge ($p = 0,975$; Mann-Whitney), de délai d'analyse ($p = 0,537$; Mann-Whitney), de sexe ratio ($p = 0,903$; Test du Chi2), de pathologie ($p = 0,176$; Test exact de Fisher), de traitement ($p = 0,139$; Test exact de Fisher) ou du modèle d'AQUIOS CL utilisé ($p = 0,061$; Test du Chi2).

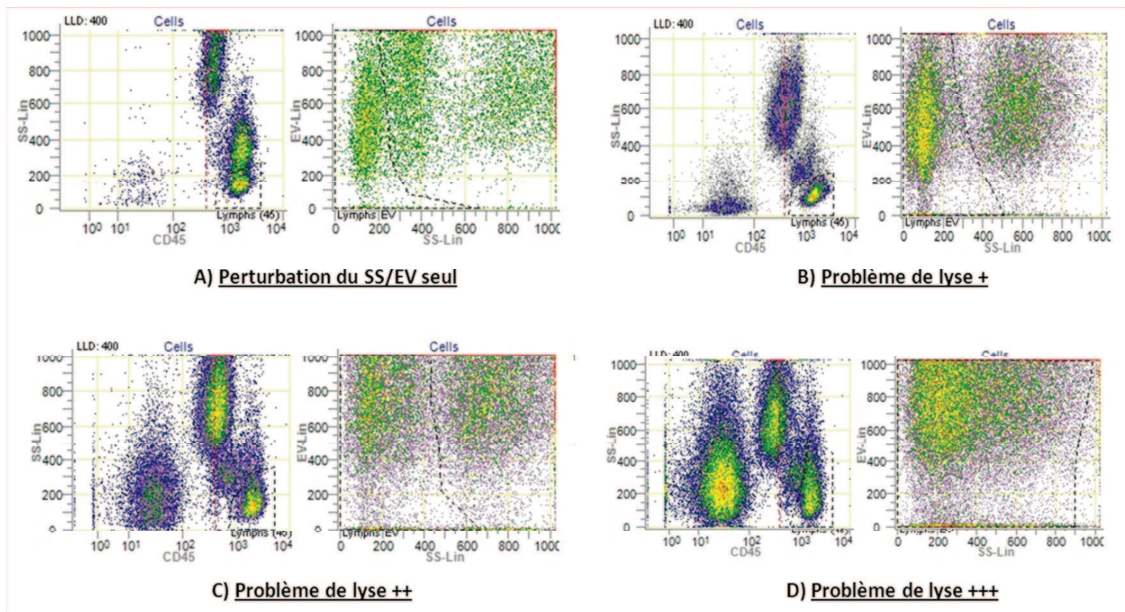


Figure 23. Stratification des problèmes de lyse rencontrés selon leur intensité

Les échantillons ont été classés selon l'importance de la population non lysée CD45^{neg} sur le graphe CD45/SS, jugée par la taille et l'intensité de coloration de ce nuage.

Sur 135 échantillons présentant une mauvaise lyse, 21 (15,6%) ont été ré-analysés sur le Navios avec un protocole de marquage utilisant de l'OptiLyse® C, sans billes de calibration, afin de vérifier les pourcentages rendus par l'AQUIOS CL ; aucune différence significative n'a été observée entre les résultats de pourcentage des populations lymphocytaires rendues par l'AQUIOS CL et le Navios (**Tableau 19**).

Tableau 19. Comparaison des pourcentages de lymphocytes totaux et T CD4 mesurés sur l'AQUIOS CL et le Navios

	P Value (Wilcoxon)	
	21 repasses	13 repasses avec problème de lyse +++
% Lymphocytes totaux	0,196	0,624
% LT CD4	0,122	0,173

Au final, différentes stratégies ont été adoptées pour rendre les résultats issus de ces 21 bilans ré-analysés:

- 6 bilans complets ont été rendus à partir des résultats de l'AQUIOS CL, dont 3 avec un problème de lyse +++ ; en effet, les résultats AQUIOS CL / Navios / NFP étaient concordants.
- 7 bilans ont été rendus à partir des leucocytes de l'AQUIOS CL (concordants avec la NFP) et les pourcentages des populations lymphocytaires du Navios ; 5 étaient des échantillons du groupe « problème de lyse +++ »

- 8 bilans ont été rendus à partir des leucocytes de la NFP et les pourcentages des populations lymphocytaires issus du Navios ; il est à noter que les pourcentages de l'AQUIOS CL étaient discordants de plus de 5% par rapport à ceux du Navios pour seulement 3 de ces bilans (dont 1 seul du groupe « problème de lyse +++ »).

(2) Solution apportée

Dans les cas problématiques de mauvaise lyse, particulièrement ceux du groupe décrit précédemment comme « problème de lyse +++ », ou de populations anormales non fenêtrables sur l'AQUIOS CL (*cf chapitre III. C. 2. b*)), la solution proposée serait de travailler en méthode double plateforme « leucocytes de la NFP associés aux pourcentages des sous-populations lymphocytaires mesurés par le Navios ». Il a donc fallu valider l'utilisation de cette alternative double plateforme. En effet, dans le cas où cette technique double plateforme NFP/Navios n'était pas validée, il faudrait envisager de conserver une technique simple plateforme de back-up sur le Navios du laboratoire, utilisant des billes de calibration pour numérer les sous-populations lymphocytaires T CD4 et CD8.

Afin de répondre à cette problématique, nous avons d'abord conduit une étude comparative des numérations issues de l'AQUIOS CL et de celles obtenus par l'automate LH780 (Beckman Coulter) du service d'hématologie appartenant à notre laboratoire ; ensuite, nous avons comparé les taux de sous-populations lymphocytaires issus de l'AQUIOS CL avec ceux déterminés sur le Navios. 60 échantillons issus de notre activité de routine et représentatifs des services cliniques prescripteurs ont été sélectionnés (**Tableau 20**). Chaque tube de sang total a été analysé successivement sur l'AQUIOS CL, le LH780 du laboratoire d'hématologie, et le Navios, dans un délai de 4h maximum.

Tableau 20. Services prescripteurs des échantillons analysés dans la comparaison de méthode AQUIOS CL/LH780

Service prescripteur	Proportion de l'activité du laboratoire (%)	Nombre d'échantillon analysés
CS Infectieux	66,8	27 (45%)
Rhumato / Médecine interne	6,4	9 (15%)
Cancérologie	6,3	6 (10%)
Pédiatrie	5,7	8 (13,3%)
Onco-hématologie pédiatrique	3,4	3 (5%)
Cardio-pneumologie	3,4	4 (6,7%)
Neurologie	2,4	1 (1,7%)
Néphrologie	1	2 (3,3%)

(a) Comparaison AQUIOS CL / LH780

Les résultats de numération des leucocytes et lymphocytes totaux ont ici été comparés sur l'AQUIOS CL et le LH780. Pour chaque paramètre étudié, un diagramme des différences de Bland-Altman a été réalisé (Fig.24). Les 60 échantillons présentait des résultats inclus dans les limites de concordance pour les leucocytes (Fig.24A) et le pourcentage des lymphocytes totaux (Fig.24B). En ce qui concerne les valeurs absolues de lymphocytes totaux (Fig.24C), un unique déviant a été observé ; l'écart entre les valeurs représentait un potentiel biais de 12%. Les graphiques des populations d'intérêt ont été vérifiés sur l'AQUIOS CL comme sur le LH780 : aucune erreur de fenêtrage ou alarme n'a pu expliquer cette différence. Nous avons considéré ce point comme acceptable, étant donné que le résultat est dans la fourchette très haute des valeurs de lymphocytes, sans impact clinique ou thérapeutique possible.

Parmi ces 60 échantillons, 9 ont présenté un problème de lyse sur l'AQUIOS CL. Les résultats pour ces échantillons sont représentés par les points rouges sur les diagrammes de Bland-Altman (Fig.24). On remarque qu'aucun des résultats correspondant à ces bilans ne se trouve en dehors des limites de concordance, et ce pour les trois paramètres étudiés. Il est important de noter que parmi ces 9 échantillons, aucun ne correspondait au groupe « problème de lyse +++ ».

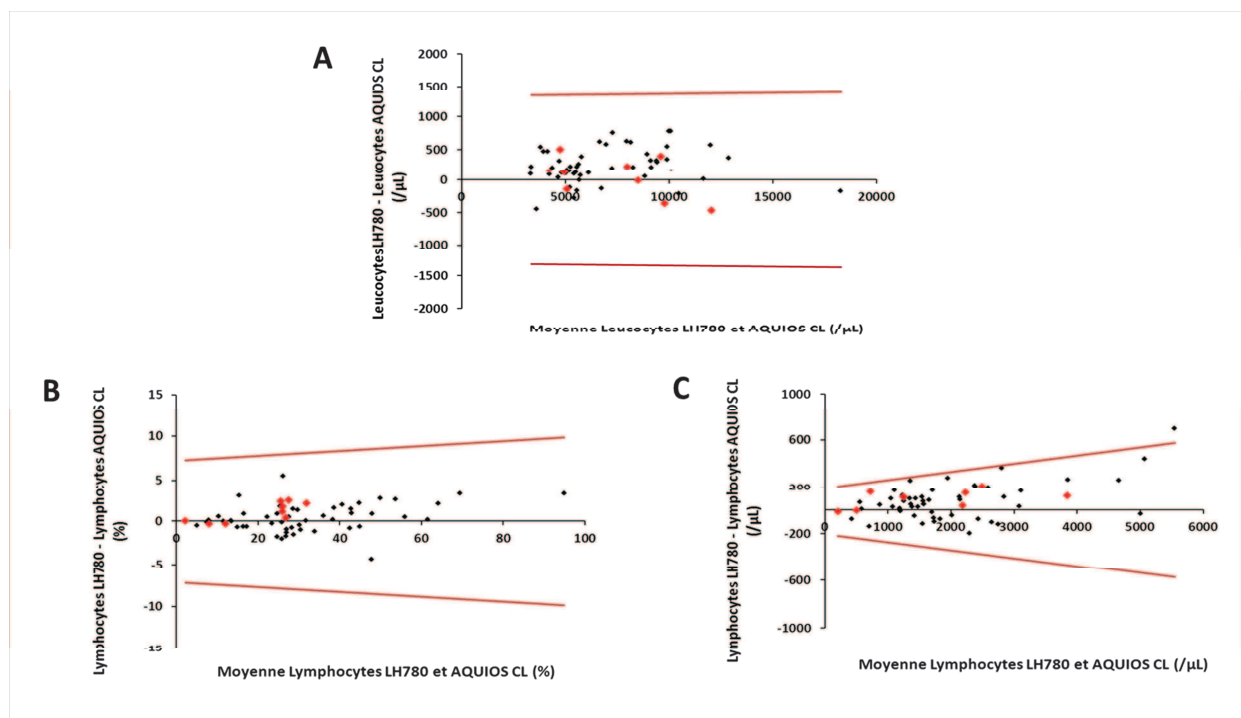


Figure 24. Comparaison des numérations AQUIOS CL / LH780

Diagrammes de Bland-Altman comparant les résultats issus de l'AQUIOS CL et du LH780 pour les valeurs absolues de leucocytes (A), les pourcentages (B) et les valeurs absolues (C) de lymphocytes totaux. Les points rouges représentent les échantillons présentant une mauvaise lyse.

Ces résultats montrent que l'AQUIOS CL et l'automate d'hématologie LH780 sont concordants et les méthodes interchangeables. Ainsi, cette étude valide l'utilisation des résultats de numération des leucocytes et lymphocytes issus de la NFP à la place de ceux de l'AQUIOS CL quand ces derniers sont incorrects, lorsque la NFP a été prélevée le même jour que l'échantillon reçu au laboratoire d'immunologie cellulaire.

(b) Comparaison AQUIOS CL / Navios

Les résultats des taux de lymphocytes totaux et LT CD4 issus de l'AQUIOS CL et du Navios ont ensuite été comparés, sur les 60 échantillons de la cohorte précédente. Les diagrammes des différences de Bland-Altman ne montrent aucun déviant hors des limites de concordance entre les résultats issus du Navios et de l'AQUIOS CL, que ce soit pour les taux de lymphocytes totaux (**Fig.25A**) ou les taux de LT CD4 (**Fig.25B**). Il est à noter que les résultats des 9 échantillons mal lysés (points rouges) étaient également compris dans les limites de concordance, ce que nous attendions puisqu'aucun de ces bilans n'appartenait au groupe « problème de lyse +++ ». Par ailleurs, nous avons observé un léger biais surestimant les proportions de LT CD4 sur le Navios par rapport à l'AQUIOS CL (**Fig.25B**), explicable par le fenêtrage beaucoup plus précis des lymphocytes sur le Navios, qui exclue davantage de monocytes de la population CD3+ que l'AQUIOS CL. Pour information, il est à noter que les résultats pour les LT CD3 et LT CD8 étaient également tous dans les bornes de suivi.

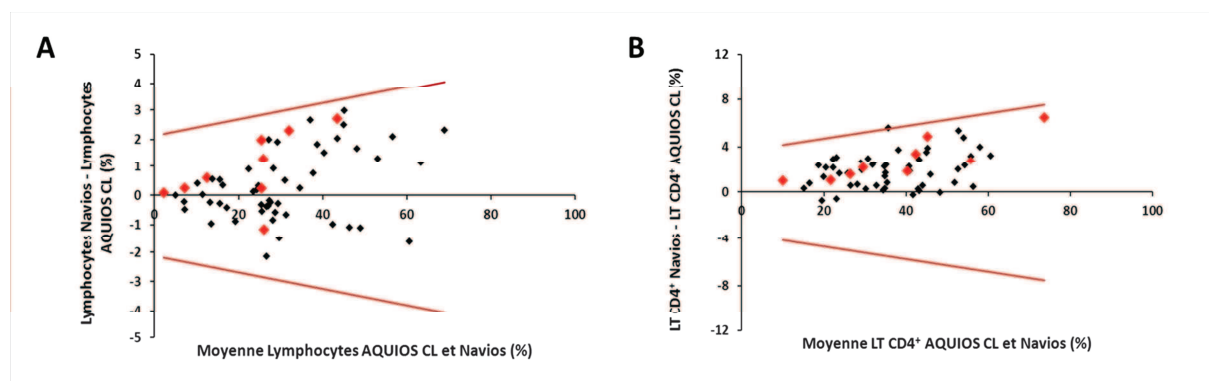


Figure 25. Comparaison des taux de lymphocytes totaux et T CD4 AQUIOS CL / Navios

Diagrammes de Bland-Altman comparant les résultats issus de l'AQUIOS CL et du Navios pour les pourcentages de lymphocytes totaux (A) et LT CD4 (B). Les points rouges représentent les échantillons avec une mauvaise lyse.

Ces résultats montrent donc que les résultats des pourcentages des sous-populations lymphocytaires issus de l'AQUIOS CL et du Navios sont concordants et interchangeables. Cette étude nous a donc permis de valider l'utilisation du Navios pour le phénotypage des sous-populations

lymphocytaires T lorsque les pourcentages issus de l'AQUIOS CL sont faussés à cause d'un problème de lyse ou de la présence d'une population anormale.

Ainsi, grâce à ces deux comparaisons, nous avons pu valider l'utilisation de la méthode double plateforme NFP/Navios pour les bilans problématiques sur l'AQUIOS CL. Cette démarche est donc retrouvée dans l'algorithme de validation biologique que nous avons élaboré après plusieurs mois d'expérience sur l'AQUIOS CL (Cf ANNEXE 4).

b) Histogrammes particuliers

(1) Marquage non spécifique

Il arrive que les cellules de certains patients présentent un marquage non-spécifique en cytométrie de flux. Les histogrammes sont généralement très caractéristiques (Fig.26A). Ainsi, nous avons un protocole de marquage sur cellules préalablement lavées disponible au laboratoire (Cf ANNEXE 4), qui conduit à des résultats très satisfaisants une fois analysées sur l'AQUIOS CL (Fig.26B). Des leucocytes sont éliminés au cours de cette étape, c'est pour cela que seuls les pourcentages des différentes sous-populations sont rendus sur ce passage, mais que les valeurs absolues sont ensuite recalculées à partir du résultat de leucocytes du premier passage, antérieur au lavage des cellules.

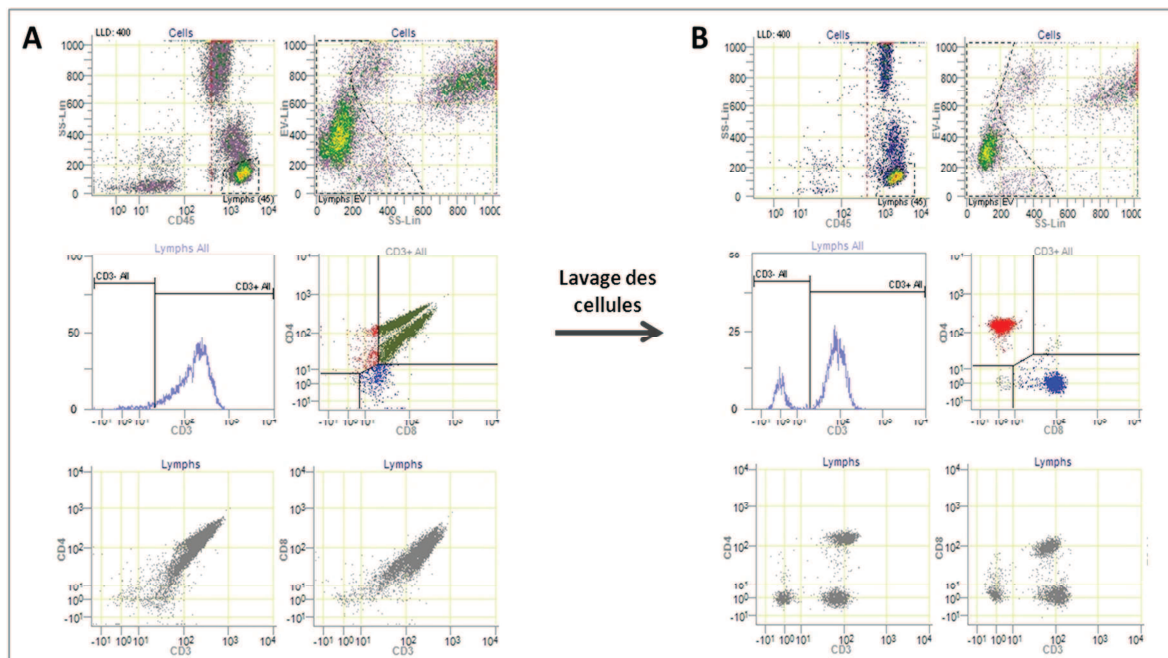


Figure 26. Prise en charge des marquages non spécifiques sur l'AQUIOS CL

Exemple d'histogrammes lors d'un marquage non spécifique, avant lavage (A) et après lavage des cellules (B)

(2) Lymphocytes T double-positifs

Il est courant chez les patients infectés par le VIH de voir apparaître des lymphocytes T exprimant à la fois le CD4 et le CD8 (**Fig.27**). Ces lymphocytes sont appelés « LT double-positifs ».

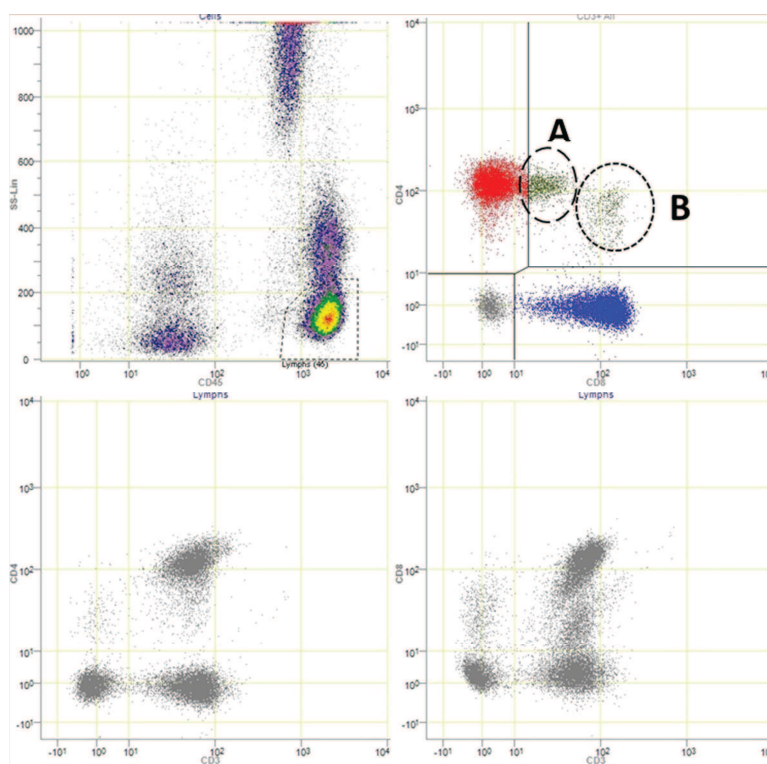


Figure 27. Mise en évidence de LT double positifs CD4+CD8+ sur l'AQUIOS CL

Sur la **figure 27**, deux populations de LT double positifs sont visibles : les LT CD4⁺ exprimant faiblement le CD8 (**Fig.27A**), et les LT exprimant fortement le CD4 et le CD8 simultanément (**Fig.27B**).

Les automates AQUIOS CL rendent systématiquement la numération de LT double-positifs, mais le fenêtrage est généralement à modifier manuellement car l'algorithme a tendance à sous-estimer les LT CD4⁺ CD8^{low}.

(3) Lymphocytes T $\gamma\delta$

Sur certains bilans, une population de lymphocytes T exprimant le CD3 plus fortement que les autres est visible ; ces lymphocytes n'expriment ni le CD4 ni le CD8 (**Fig.28**). Nous avons pu confirmer pendant ces quelques mois d'utilisation que ces LT double-négatifs sont bien visibles sur l'AQUIOS CL, comme ils l'étaient sur le FC500 précédemment utilisés.

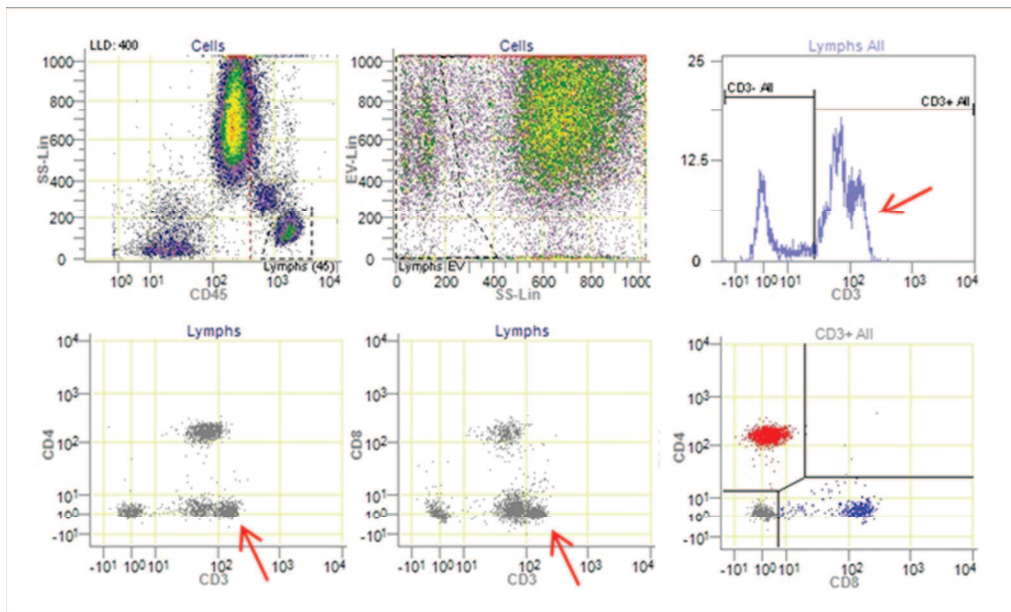


Figure 28. Mise en évidence de lymphocytes T CD4-CD8- sur l'AQUIOS CL

Grâce à un marquage des TCR $\gamma\delta$ et $\alpha\beta$, nous avons pu confirmer sur ce bilan la présence significative d'une population de LT CD3 $\gamma\delta$ à un taux de 29% des LT totaux.

(4) Résultat hors limite de linéarité

Nous recevons des demandes de numération des LT CD4 résiduels pour des patients présentant des pathologies hématologiques malignes à type de leucémie lymphoïde chronique (LLC) ou leucémie aigüe (LA). Certains de ces échantillons sont hyperleucocytaires et généralement hyperlymphocytaires, avec des résultats dépassant les limites de linéarité des AQUIOS CL. Les résultats rendus sur échantillon pur sont donc généralement sous-estimés et nous diluons donc le sang total dans du sérum AB avant de le repasser sur l'AQUIOS CL. Deux cas de figures sont ensuite possible :

- **On peut rendre les résultats de l'échantillon dilué**, en prenant en compte le facteur de dilution, si :
 - o la dilution engendre un résultat dans le domaine de mesure de l'AQUIOS CL
 - o l'histogramme SS/CD45 inclut bien toutes les populations leucocytaires (**Fig.29A**)
 - o il n'y a pas de population lymphoïde CD45^{low} sur l'histogramme SSLin/CD45 (**Fig.29B**)

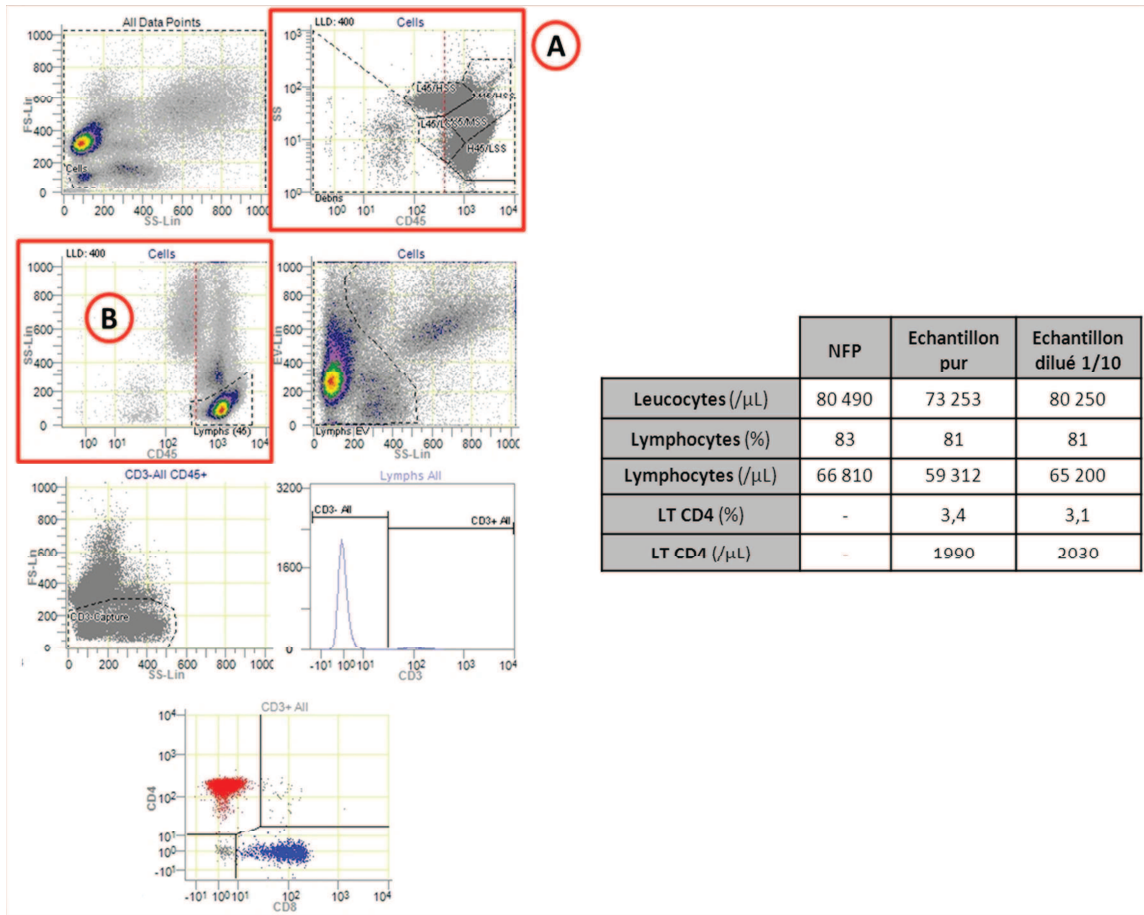


Figure 29. Validation des résultats de l'AQUIOS CL après dilution d'un échantillon de LLC

L'AQUIOS CL sous-estime la leucocytose et lymphocytose à partir de l'échantillon pur ; après dilution jusqu'au domaine de linéarité de l'AQUIOS CL, les résultats obtenus sont comparables avec ceux de la NFP.

L'histogramme de numération des leucocytes prend bien compte l'ensemble des sous-populations leucocytaires (A) et aucune population CD45^{low} n'est observée.

- **On ne peut pas rendre le résultat de l'AQUIOS CL sur l'échantillon dilué dans les cas suivants :**
 - o l'histogramme permettant d'énumérer les leucocytes est perturbé (Fig.30 et 31)
 - o il existe une population lymphoïde CD45^{low} sur l'histogramme SS/CD45 (Fig.31)

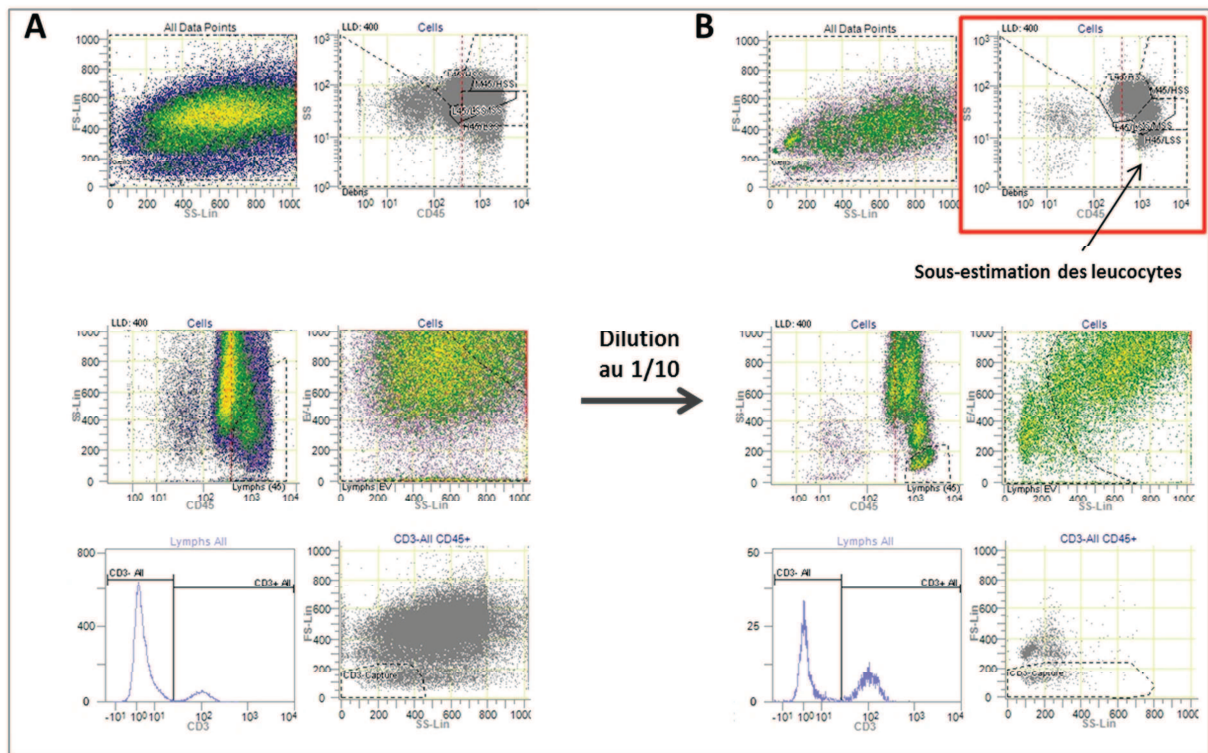


Figure 30. Hyperleucocytose avec myélémie hors limite de linéarité de l'AQUIOS CL

Récidive de cirrhose auto-immune sur greffon hépatique, en cours de traitement par GM-CSF.

(A) Echantillon pur rendant 36.910 leucocytes/ μ L versus 45.950/ μ L sur la NFP. Les différentes sous-populations leucocytaires sont peu distinguables les unes des autres.

(B) Echantillon dilué au 10^{ème}, avec 5.610 lymphocytes/ μ L versus 5.510/ μ L sur la NFP ; les nuages des différentes sous-populations leucocytaires sont assez bien identifiables pour un bon fenêtrage Lymphs 45 et Lymphs EV ; par contre l'histogramme CD45/SS permettant la numération des leucocytes est perturbé, engendrant un nombre de leucocytes et un taux de lymphocytes totaux incorrects.

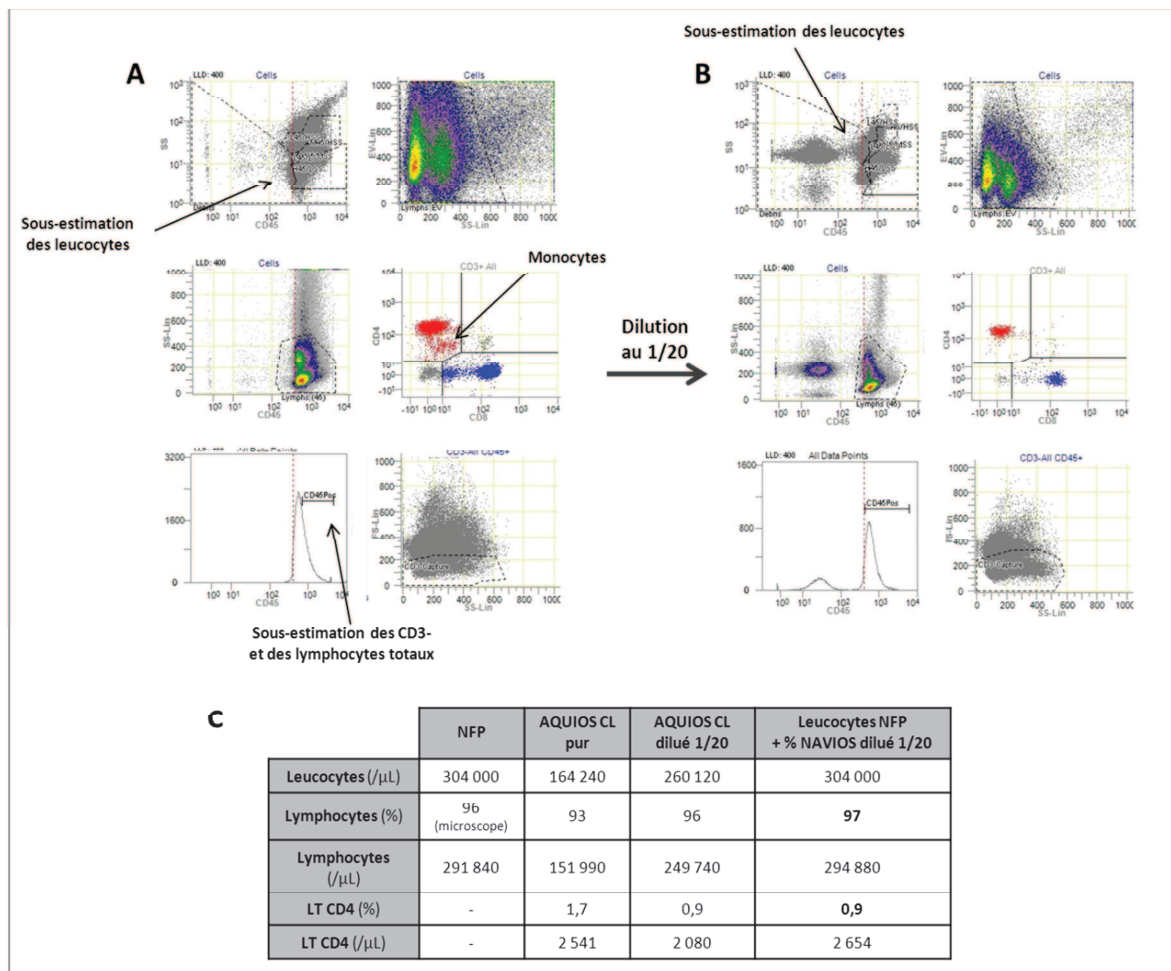


Figure 31. Hyperleucocytose et hyperlymphocytose à lymphocytes CD45low hors limite de linéarité de l'AQUIOS CL

Leucémie lymphoïde chronique.

(A) L'échantillon analysé pur est hors limite de linéarité ; les leucocytes sont mal fenêtrés et sous-estimés ; les lymphocytes ne sont pas bien discriminés des monocytes, surestimant le compte de LT CD4 ; le fenêtrage CD45Pos, que l'on ne peut pas modifier, exclue une grande partie des lymphocytes CD45low de l'algorithme de numération des lymphocytes totaux (via le CD3 capture) ; le discriminant CD45 élimine une partie des cellules lymphoïdes de l'analyse (barre rouge pointillée).

(B) Après dilution au 20^{ème}, le mauvais fenêtrage des leucocytes persiste, ainsi que le problème lié au discriminant CD45 (barre rouge pointillée).

(C) Le tableau compare les résultats issus de différentes techniques. La différence persistante entre les résultats de l'AQUIOS CL et de la NFP prélevée à la même heure peut également être expliquée par la fragilité des lymphocytes de LLC qui meurent au bout de quelques heures dans le tube.

Dans ces cas-là, il faudra alors repasser l'échantillon sur le Navios pour obtenir les proportions des différentes populations lymphocytaires, à l'aide d'un protocole utilisant de l'Optilyse® C sans bille de calibration, et se baser sur les résultats de leucocytes de la NFP pour en déduire les valeurs absolues (Fig.31C).

(5) Population lymphoïde CD45^{low}

Sans hyperleucocytose ou hyperlymphocytose, il arrive qu'une population lymphoïde exprimant faiblement le CD45 soit observable dans certains échantillons. La **figure 32** montre l'exemple d'une leucémie aigüe présentant un nuage important de blastes CD45^{low} (*histogramme CD45Lin/SS en bas à gauche*). La problématique est dans ce cas identique aux cas précédents : les leucocytes sont sous-estimés puisque l'*histogramme en haut à droite* est perturbé et exclue la population blastique CD45^{low} du compte des leucocytes ; le discriminant CD45 (barre rouge pointillée) sous-estime le nombre de cellules lymphoïdes. D'autre part, du fait du système très fermé de l'AQUIOS CL qui ne permet pas d'ajouter de nouveaux fenêtrages sur certaines populations particulières pour en estimer la proportion, la discrimination blastes/lymphocytes normaux n'est pas possible.

Ainsi, ce genre d'échantillon est ré-analysé sur le Navios (sans bille de calibration) afin d'estimer les pourcentages des différentes populations d'intérêt ; puis nous les combinons avec les résultats de leucocytes et lymphocytes totaux de la NFP pour rendre les valeurs absolues des sous-populations lymphocytaires T CD4 et CD8 (cf **tableau Fig.32**).

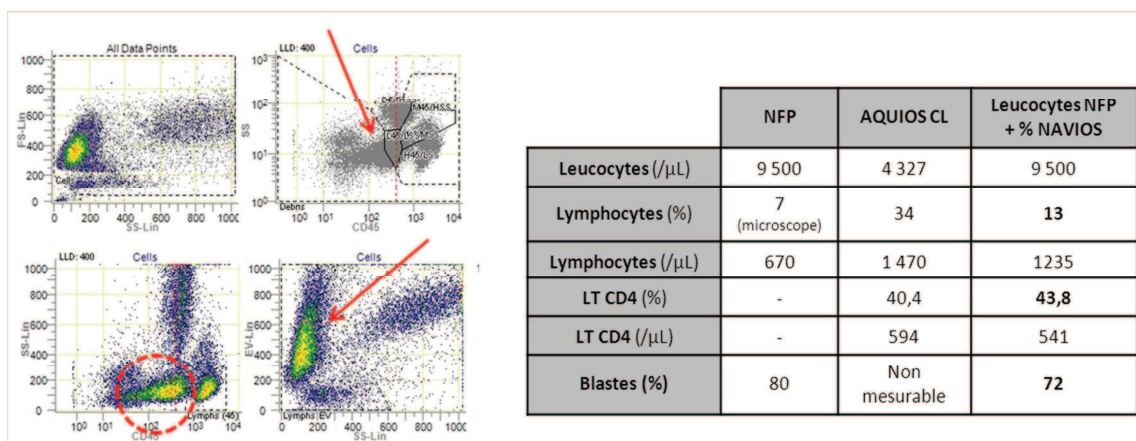


Figure 32. Leucémie aigüe lymphoïde B présentant une importante population blastique CD45^{low}

c) Problèmes mécaniques

Plusieurs incidents mécaniques et électroniques sont survenus dans les mois suivants l'installation des AQUIOS CL au laboratoire. Nous les avons ici répertoriés et présenté leur prise en charge.

(1) Erreur de communication avec le LIS

Deux erreurs récurrentes avec un message dans l'onglet MAINTENANCE sont encore non résolues. Elles n'impactent néanmoins en aucun cas les résultats des échantillons concernés.

- “An error occurred processing LIS order request, unable to insert job to database. Specimen ID: 0160XXXXXX02, test name: TETRA 1”.

L’erreur apparaît au moment de la lecture du code-barres sur le tube. Ce dernier est pris en charge sur la cassette sans aucun souci et le test réalisé normalement. Cette erreur a été relevée 21 et 22 fois sur l’AQUIOS 1 et 2 respectivement, en un mois d’étude.

- “Host query for Specimen ID: 0160XXXXXX02 failed”. La demande passe en « Incomplete » et le tube est rejeté sans qu’aucun test n’ait été réalisé dessus. Puis la demande est recrée spontanément dans « Request ». En chargeant de nouveau la cassette, le tube est pris en charge correctement et le test réalisé normalement. Cette erreur a été relevée 4 et 6 fois sur l’AQUIOS 1 et 2 respectivement, en un mois d’étude.

(2) Pompes à déchets de préparation

Les pompes à déchets de préparation n’étaient pas assez puissantes et ont donc dû être remplacées sur les deux AQUIOS CL. Cette défaillance entraînait l’arrêt du cytomètre et l’apparition des messages d’erreur suivant :

- Sur l’écran principal
 - o « Potential wash station error. »
 - o « The system has stopped due to a prep wash station failure. Please power down and check the system. »
- Dans l’onglet MAINTENANCE
 - o « System crash. Wash station error! Liquid overflow. »

A chaque fois, les tests en cours d’analyse ont été rejetés en « Incomplete ». La majorité du temps, on notait la présence de liquide au niveau du plateau de débordement.

Les interventions pour résoudre ce problème sont listées dans le **tableau 21**. Avant de changer les pompes, on s’est d’abord assuré que les filtres à déchet et la station de lavage n’étaient pas obstrués. De plus, le tuyau d’évacuation de l’AQUIOS 2 passant derrière le cytomètre au-dessus du rebord de la paillasse, nous avons percé la paillasse pour faciliter l’écoulement des déchets. Enfin, sur l’AQUIOS 2, un clapet anti-retour a été installé afin d’empêcher le reflux dans le circuit d’élimination des déchets de la station de lavage ; en effet, ce phénomène était causé par la pression de la pompe à déchet principale, beaucoup plus puissante que la pompe à déchet de la station de lavage (**cf schéma tableau 21**).

Tableau 21. Intervention sur les AQUIOS CL par rapport aux problèmes de pompe à déchet de préparation

	AQUIOS 1	AQUIOS 2
22 mars	Vérification que la station de lavage et le filtre à déchets de ne soient pas obstrués Remplacement du filtre à déchet	
30 mars	Vérification du filtre à déchet : non obstrué	
11 avril	Remplacement de la pompe à déchet de préparation	
3 juin		Remplacement du filtre à déchet en prévention
17 juin		<p>Les tuyaux d'évacuation des déchets sont déplacés devant l'AQUIOS CL Installation d'un clapet anti-retour</p>
27 juin		Remplacement de la pompe à déchet de préparation Mise en place d'un tuyau plus rigide Perçage du fond de la paillasse

(3) Crash de l'aiguille de prélèvement/préparation

Dès les premiers jours de la validation de méthode, les AQUIOS CL ont fait l'objet de défaillances au niveau de la seringue de prélèvement/préparation. Les erreurs suivantes ont été rencontrées selon les différents contextes (**Tableau 22**) :

- « System crashed ! Lowering needle. Into wash station »
- « System crashed ! Lowering needle. Into reagent carousel »
- « System crashed ! Needle could not be raised »
- « System crashed! Syringe error »

Tableau 22. Crashes de l'aiguille de prélèvement/préparation

	Automate	Crash et intervention
18 janvier	AQUIOS 2	Aiguille endommagée par l'impact avec la station de lavage, Remplacement de l'aiguille et réglages par BC, Ne plus utiliser que les positions 1 et 2.
18 février	AQUIOS 2	Impact de l'aiguille avec un flacon d'anticorps, sans dommage. Réglages de l'aiguille et du carrousel d'anticorps par BC.
4 mars	AQUIOS 2	Crash de l'aiguille sans dommage
12 mars	AQUIOS 2	Crash de l'aiguille sans dommage
15 mars	AQUIOS 2	Crash de l'aiguille sans dommage
22 mars	AQUIOS 2	Changement du moteur du carrousel réactif par BC
1 avril	AQUIOS 1	Crash de l'aiguille sans dommage
28 avril	AQUIOS 2	Crash de l'aiguille sans dommage
12 mai	AQUIOS 2	Impact avec un flacon d'anticorps Hotline: ne plus utiliser que les positions 1 et 2
4, 5 et 10 août	AQUIOS 1	Fuite au niveau de la pompe de la seringue de préparation; Remplacement de la pompe.

Beckman Coulter a mis en évidence une possible anomalie dans le logiciel des AQUIOS CL, engendrant probablement ces défaillances lorsque les flacons d'anticorps sont chargés en position 9 et 10 du carrousel. De plus, le dernier crash recensé en août a révélé une fuite au niveau de la pompe de la seringue de préparation, entraînant la formation de rouille sur un des pistons commandant le déplacement de la seringue (**Fig.33**). Enfin, une malfaçon sur certains flacons d'anticorps, entraînant une profondeur insuffisante de ces flacons, pourrait être responsable de quelques-uns de ces crashes.



Figure 33. Fuite au niveau de la pompe de la seringue à prélèvement

(4) Problèmes électroniques

Sur les deux AQUIOS CL installés au laboratoire, plusieurs crashes semblant plutôt d'origine électronique ont été observés. Ces problèmes ont été répertoriés dans le **tableau 23**. A chaque fois, l'AQUIOS CL a été réinitialisé, soit par un redémarrage rapide (EXIT, « short start-up »), soit en l'éteignant complètement par un arrêt régulier (« shut-down ») ou directement par les interrupteurs du chariot d'alimentation et du cytomètre quand la procédure normale ne fonctionnait pas. Pour essayer de résoudre ces problèmes, les ports USB utilisés sur les unités centrales ont été modifiés.

Tableau 23. Problèmes électroniques rencontrés sur les AQUIOS CL

	AQUIOS 1	AQUIOS 2
25 mars	<ul style="list-style-type: none"> - Ne rend pas la cassette - « System could not pierce as autoloader has crashed » - Arrêt du cytomètre impossible 	
1 avril	<ul style="list-style-type: none"> - Ne rend pas la cassette - Aucun message d'erreur - La cassette contenant les mêmes tubes est chargée sur l'AQUIOS 2, sans aucun problème... - Arrêt du cytomètre impossible 	
	<ul style="list-style-type: none"> - Ne rend pas la cassette - « System crashed! Syringe error » - Arrêt du cytomètre impossible 	
	Changement de place des ports USB	
27 mai		<ul style="list-style-type: none"> - Aucun échantillon à bord mais le témoin de l'aiguille de prélèvement/préparation est orange (« occupé ») et sa position est au milieu de l'automate est non à sa position de repos (à droite). - Ne prend en charge aucune cassette - Aucun message d'erreur
		IDEM 27 mai
30 mai		<ul style="list-style-type: none"> - « Autoloader crashed unloading the cassette. Please remove the cassette. Next open the reagent door (with button press). Then close the reagent door to restart the system. » - Pas de message dans MAINTENANCE - Le CQI en cours n'est pas rejeté en « incomplete »
3 juin		Changement de place des ports USB

(5) Blocage des portes des chargeurs à tube unique

A plusieurs reprises, les portes des chargeurs à tube unique des deux AQUIOS CL se sont bloquées : soit à l'ouverture, ne libérant pas la porte et empêchant le chargement du tube, soit à la fermeture, laissant l'ouverture béante. Dans le deuxième cas, le seul moyen était de sortir du logiciel (EXIT) puis d'effectuer un démarrage court du cytomètre, entraînant généralement le rejet en « incomplete » des échantillons en cours de préparation. Il a fallu faire appel plusieurs fois au technicien Beckman Coulter pour régler les portes. Ce problème apparaît généralement après une maintenance ou une intervention sur les AQUIOS CL ayant nécessité d'enlever le capot avant des

automates. Une attention particulière devra donc être portée pour vérifier le bon fonctionnement de ces portes à la fin des futures interventions sur les cytomètres.

(6) Problème de lecture de réactifs chargés sur l'automate

Nous avons eu à plusieurs reprises des problèmes avec certains réactifs chargés sur l'automate et qui n'était pas reconnus par l'AQUIOS CL (**Tableau 24**). Beckman Coulter a évoqué le mauvais positionnement des étiquettes code-barres ou flash-code, mais cette hypothèse peut probablement être rejetée puisque les réactifs étaient généralement correctement lus sur le deuxième AQUIOS CL. Il est plus probable que les lecteurs code-barres soient déréglés et nécessitent une optimisation de la position du scanner.

Tableau 24. Problème de lecture de certains réactifs chargés sur les AQUIOS CL

	AQUIOS 1	AQUIOS 2
6 juin	- Au moment d'un changement de flacon d'anticorps, ne parvient pas à scanner le flacon A du réactif de lyse qui était déjà à bord depuis le début de la journée. - Flacon bien scanné par l'AQUIOS 2	
26 juillet		Ne reconnaît pas une plaque 96 puits chargée; elle est neuve et bien lue par l'AQUIOS 1
2 août	Ne reconnaissent pas une plaque 96 puits insérée; elle est neuve et n'est lue ni par l'AQUIOS 1 ni par l'AQUIOS 2	
16 août		Ne reconnaît pas une plaque 96 puits chargée; elle est neuve et bien lue par l'AQUIOS 1
18 août		Ne reconnaît pas une plaque 96 puits chargée; elle est neuve et bien lue par l'AQUIOS 1

(7) Canules à déchet

La canule à déchet de chacun des AQUIOS CL s'est cassée au niveau du flotteur. Nous avons donc dû court-circuiter le « waste sensor », c'est-à-dire le détecteur du niveau de déchet, et retirer le flotteur des canules. Ceci n'a pas posé de problème particulier dans notre laboratoire puisque nous changeons les réservoirs à déchet tous les soirs, sans attendre l'alarme spécifique de l'AQUIOS CL. Ces pièces sont certes considérées comme « consommables », nous soulignons néanmoins ici leur fragilité puisque nous aurions dû les changer après quelques mois d'utilisation seulement.

D. Discussion

Les bons résultats observés lors du β -test de l'AQUIOS CL ont été confirmés lors de la validation de méthode. Cette dernière, menée de front pour deux cytomètres, a été un travail assez lourd pour répondre aux recommandations du COFRAC mais facilité par l'expérience acquise lors du β -test (aspects pratiques et interprétation des statistiques). Comme nous l'attendions, les points faibles décrits lors du β -test (CV de reproductibilité élevé, contamination inter-réactif) n'ont pas été retrouvés sur les deux automates installés au laboratoire. Ainsi, le travail accepté pour publication dans *Cytometry* (81) pourra probablement représenter une aide utile à la validation de méthode des techniques de cytométrie en flux pour d'autres laboratoires impliqués dans le processus d'accréditation. D'un point de vue global, après 6 mois d'utilisation des AQUIOS CL, le premier bilan est satisfaisant. Les performances analytiques sont adaptées à une utilisation quotidienne en routine dans un contexte clinique. La numération des LT CD4 en valeur absolue paraît robuste, même sur des échantillons compliqués (*e.g.* problèmes de lyse, voir ci-après). Le changement de technologie a été bien accepté par les différents utilisateurs. Il reste néanmoins plusieurs points à améliorer. Pour y remédier, il faut souligner l'importance de la coopération entre les deux partenaires, *i.e.*, le laboratoire hospitalier et la société Beckman Coulter. Le premier est indispensable pour documenter et faire remonter les informations liées à tout problème rencontré tandis que le deuxième se doit de mettre rapidement en œuvre des solutions appropriées.

D'abord, différents problèmes mécaniques ont été recensés et corrigés. Les « crashes » à répétition de l'aiguille de prélèvement ont fait apparaître une anomalie dans le software de l'AQUIOS CL et une fuite au niveau de la pompe de la seringue de préparation. Les problèmes d'évacuation des déchets par la station de lavage de l'aiguille ont montré une faiblesse des pompes à déchet, remplacées par des pompes plus puissantes. Les problèmes électroniques ont révélé l'importance du bon positionnement des ports USB. Ces incidents mécaniques sont assez caractéristiques de l'installation de tout instrument nouvellement commercialisé et devraient diminuer au fil du temps avec la résolution de chaque problème. La **figure 34** illustre cette tendance. Elle montre l'évolution de la fréquence et la nature des problèmes rencontrés sur les deux AQUIOS CL sur la base des principales interventions réalisées par la société Beckman Coulter. Nous observons ainsi une diminution du nombre d'incidents dans les derniers mois d'utilisation, conséquence notamment de la résolution des problèmes électroniques et du remplacement des pompes à déchet. Les crashes de l'aiguille de prélèvement restent le principal problème à résoudre.

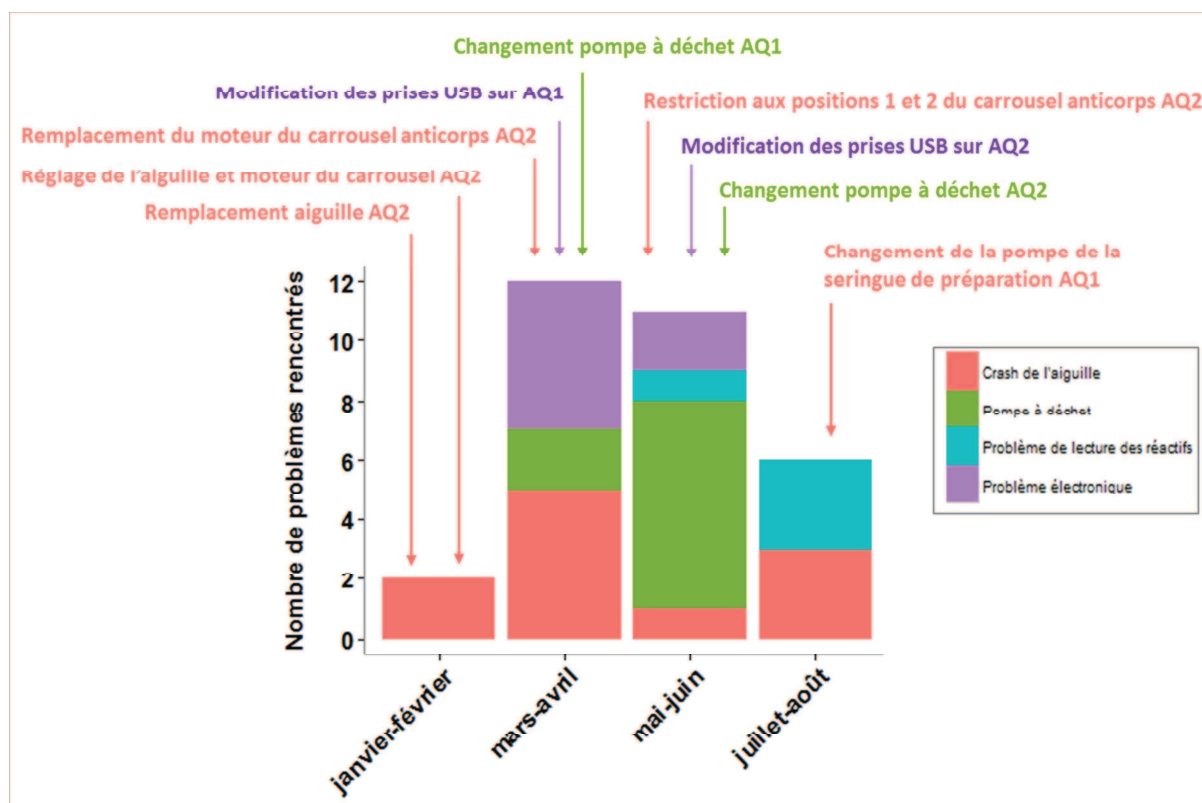


Figure 34. Evolution dans le temps des incidents techniques sur les AQUIOS CL et principales interventions du technicien BC

Ensuite, de nombreux problèmes de lyse ont été mis en évidence, comme dans la plupart des laboratoires utilisant l'AQUIOS CL (informations fournies par Beckman Coulter). Cela pose la question d'une éventuelle reformulation du réactif de lyse. Ces problèmes de lyse ont engendré un important travail de comparaison de méthode (en utilisant les valeurs de la NFP et ou du Navios) et d'analyse des résultats afin de définir la démarche à suivre dans chaque cas (Cf chapitre III.C.2.a). La disponibilité des résultats de NFP et la vérification de certains résultats avec une autre technique de cytométrie en flux deviennent indispensables pour palier à certains de ces problèmes de lyse. Ainsi, nous avons dû mettre en place un algorithme de validation des résultats issus de l'AQUIOS CL (Fig.35 et ANNEXE 4).

ALGORITHME DE VALIDATION BIOLOGIQUE DES NUMERATIONS CD3, CD4, CD8 SUR AQUIOS CL

La validation technique conformément au 5.1 a permis de détecter les anomalies visibles sur les graphes analysés. Les données ont été retraitées si besoin.

Validation technique conforme
ET résultats concordants avec les ATCD :
 - Ecart entre -10 et +20% pour les VA des lymphocytes
ET résultats concordants avec la NFP si ATCD discordants ou indisponibles :
 - Ecart < 5% pour les pourcentages de sous-populations lymphocytaires

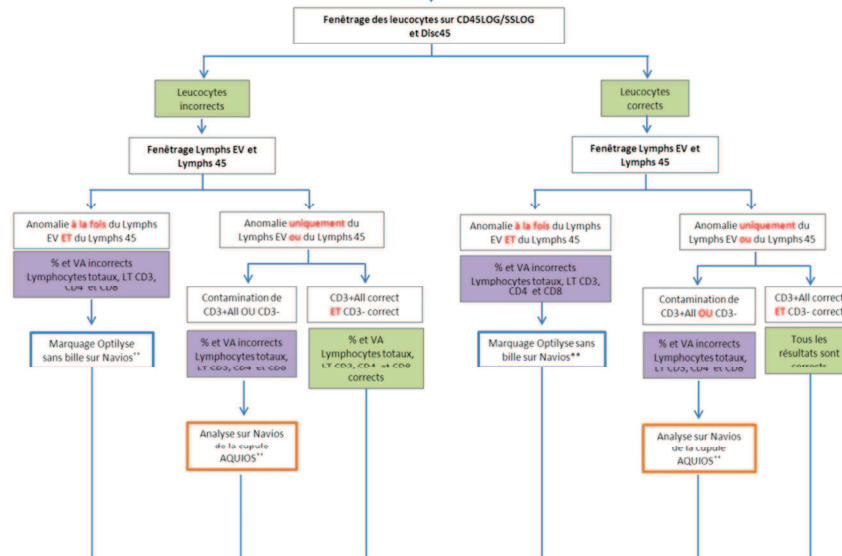
Validation technique non conforme
OU résultats discordants avec NFP :
 - Ecart non compris entre -10 et +20% pour les VA des lymphocytes
OU résultats discordants avec les ATCD sans NFP disponible
 - Ecart > 5% pour les pourcentages de sous-populations lymphocytaires

ETAPE 2: consulter la matrice de 16 histogrammes

- 1) Graphe des leucocytes CD45LOG/SSLOG
- 2) Discriminant CD45
- 3) Fenêtrage Lymphs 45 sur le graphe CD45LOG/SSLIN
- 4) Fenêtrage Lymphs EV sur le graphe EVLIN/SSLIN
- 5) Population CD3- sur Lymphs et CD3+All sur LymphsAll

RISQUES

- Ne pas prendre tous les leucocytes ou inclure des érythrocytes mal lysés
- Exclure des lymphocytes CD45 faibles
- Inclure des monocytes ou PNB / perdre en recouvrement / exclure des CD45 faibles
- Inclure des monocytes / perdre en recouvrement
- Suresimer le compte de lymphocytes totaux et LT CD3, CD4 et CD8



ETAPE 3: conduite à tenir pour le rendu des résultats

Leucocytes	AQUIOS
Lymphocytes (%)	AQUIOS
Lymphocytes (VA)	AQUIOS
CD3+ (%)	AQUIOS
CD3+ (VA)	AQUIOS
CD4+ (%)	AQUIOS
CD4+ (VA)	AQUIOS
CD8+ (%)	AQUIOS
CD8+ (VA)	AQUIOS

NFP*	NFP*	NFP ou disc
NFP*	NFP*	NFP ou disc
NFP* + code « HNUMH »	NFP* + code « HNUMH »	AQUIOS
NAVIOS	NAVIOS	AQUIOS
NAVIOS	NAVIOS	AQUIOS
NAVIOS	NAVIOS	AQUIOS
Calcul*	Calcul*	AQUIOS
NAVIOS	NAVIOS	AQUIOS
Calcul*	Calcul*	AQUIOS

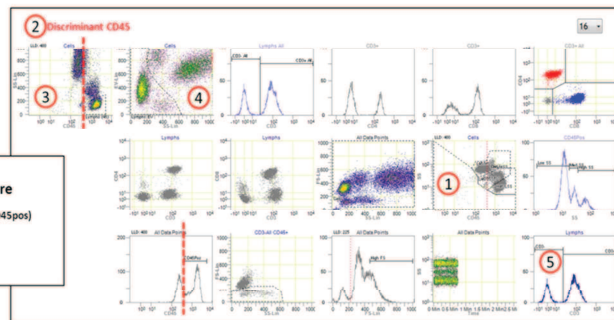
AQUIOS	AQUIOS	AQUIOS
NAVIOS	NAVIOS	AQUIOS
Calcul	Calcul	AQUIOS
NAVIOS	NAVIOS	AQUIOS
NAVIOS	NAVIOS	AQUIOS
NAVIOS	NAVIOS	AQUIOS
Calcul	Calcul	AQUIOS
NAVIOS	NAVIOS	AQUIOS
Calcul	Calcul	AQUIOS

* Si aucune NFP n'est disponible, ne rendre que les % issus du Navios et noter un commentaire: « L'analyse de cet échantillon par cytométrie ne permet pas de rendre les valeurs absolues des sous-populations lymphocytaires »

** Si la pureté est insuffisante, le résultat pourra être rendu en tenant compte de la contamination par les monocytes et en appliquant la correction proposée dans HI-PostA-IT-001

Tous les résultats présentant une anomalie phénotypique ou analytique doivent être accompagnés d'un commentaire

RAPPEL:
 Lymphocytes totaux (VA) = CD3+All + CD3- + CD3-capture
 (Lymphs 45 OU Lymphs EV) (Lymphs 45 ET Lymphs EV) (CD3-All ET CD45pos)
 CD3/CD4/CD8 en VA issus de CD3+All
 CD3/CD4/CD8 en %: VA rapportées aux VA des lymphocytes totaux



Matrice 16 histogrammes

Figure 35. Algorithme de validation biologique des résultats de phénotypage lymphocytaire T CD4 et CD8

Enfin, d'autres problèmes ont été rapportés mais ne sont pour l'instant pas résolus : problème de détection de certains réactifs, laissant pressentir un dérèglement des lecteurs de code-barres/flash-codes ; erreurs de communication entre l'AQUIOS CL et le LIS ; enfin, rapport erroné de l'IQAP.

L'un des avantages principaux mis en avant des cytomètres mesurant les valeurs absolues par technique volumétrique est un plus faible coût d'utilisation, puisque l'on s'affranchit de l'emploi de billes calibrées onéreuses ; nous nous sommes donc intéressés au coût d'un phénotypage lymphocytaire T mesuré sur l'AQUIOS CL versus sur le FC500. Sur une période du 1^{er} février au 31 août 2016, un phénotypage T CD4 présentait un coût moyen de 13 euros ; sur une période de 3 ans (2012 à 2014), le coût moyen sur le FC500 était de 11,5 euros. Cette estimation prend en compte l'ensemble des réactifs consommés, incluant les repasses des échantillons quand un contrôle est nécessaire, ainsi que le passage des CQI journalier ; elle ne prend en compte ni les frais de validation de méthode, ni de maintenance, ni d'abonnement aux EEQ. Les premiers mois d'utilisation de l'AQUIOS CL ayant sûrement engendré davantage de repasses (familiarisation avec la nouvelle technique, incidents mécaniques, ...) qu'une utilisation normale du cytomètre, une probable légère diminution du coût est prévisible. Néanmoins, ces estimations montrent que cette technique volumétrique automatisée, s'affranchissant des réactifs coûteux des cytomètres classiques tels que billes calibrées de numération (*e.g.* Flow-Count™ Fluorospheres) et de standardisation (*e.g.* Flow-Set™ et Flow-Check™ Fluorospheres), entrainera probablement peu d'économie par rapport à notre technique précédente.

Sur un plan plus subjectif, après 6 mois d'utilisation des AQUIOS CL en routine, il nous est apparu intéressant de recueillir le ressenti des techniciens, internes et biologistes, novices ou ayant de l'expérience en cytométrie en flux. Pour les points négatifs, nous avons relevé :

- « Heureusement que nous avons deux AQUIOS CL en miroir car ces six mois d'utilisation ont été rythmés par plusieurs pannes et journées d'immobilisation, qui auraient été problématiques au bon fonctionnement du laboratoire. »
- « Les containers à déchet ne sont pas adaptés à l'usage quotidien du laboratoire. Ils pèsent lourds (10L), l'ajout d'une quantité optimale de javel n'est pas possible et l'homogénéisation impossible. Nous avons dû les remplacer par des bidons en plastique dur, gradués. De plus, la canne contenant le connecteur à déchet est très fragile. »
- « Les CQI sont faciles à passer, semblent robustes, et les résultats sont très facilement exportables et consultables. Par contre, les bornes fournisseurs ne sont pas vraiment adaptées à l'utilisation en contexte clinique (trop larges). Les deux automates en miroir

nécessitent de déterminer des bornes communes, non paramétrable sur les AQUIOS, obligeant à valider les CQI sur un deuxième logiciel, LPM. »

- « L'incapacité à modifier les fenêtres ou en ajouter obligent parfois à ré-analyser sur le Navios des résultats qui auraient pu être rendus sur l'AQUIOS CL. Une deuxième technique de cytométrie est indispensable pour les bilans particuliers que l'on rencontre à l'hôpital, et nécessitant un fenêtrage manuel des populations particulières. »

Pour les points positifs, nous avons relevé :

- « La première chose qui vient à l'esprit est sa facilité d'utilisation de l'AQUIOS CL, il est très intuitif».
- « La technique volumétrique de l'AQUIOS CL est très simple et moins contraignante que l'utilisation de billes de calibration. »
- « L'automatisation de l'analyse nous a fait gagner beaucoup de temps sur ce poste technique, et nous en gagnerions d'autant plus quand les AQUIOS CL ne seront plus autant sujets aux diverses pannes. »
- « L'arrivée de l'AQUIOS CL a permis une réorganisation des paillasse techniques ; le technicien en charge de la numération des LT CD4 peut maintenant s'occuper également de l'enregistrement informatique des bilans, des phénotypages des LBA et des PNN. Ceci permet de dégager du temps technicien pour le poste qualité/accréditation. »
- « L'AQUIOS CL est plus adapté au contexte d'accréditation qu'un cytomètre traditionnel, notamment en terme de traçabilité : réactifs utilisés, incidents enregistrés dans le journal de bord, outils de sauvegarde/archivage. »
- « L'identification nominative des échantillons est très pratique pour récupérer les données des bilans antérieurs. »
- « L'AQUIOS CL est très performant et robuste pour la numération des valeurs absolues de LT CD4. »

L'AQUIOS CL paraît donc avoir trouvé sa place au sein d'un laboratoire de routine clinique, d'une part en termes de performances analytiques et de respect des exigences liées à l'accréditation, et d'autre part en termes de facilité d'utilisation. Ceci dégage notamment du temps aux opérateurs par rapport à une méthode traditionnelle de cytométrie en flux de numération des LT CD4, leur permettant de s'impliquer dans d'autres tâches du laboratoire. En revanche, une formation poussée des utilisateurs reste primordiale, aussi bien techniciens que biologistes ; en effet, la stratégie de fenêtrage, robuste mais complexe, est indispensable à maîtriser pour vérifier le bon fenêtrage des différentes populations et s'assurer de la cohérence des résultats par rapport au contexte clinique.

SYNTHESE ET PERSPECTIVES

VI. SYNTHÈSE ET PERSPECTIVES

L'amélioration de l'automatisation et la standardisation de la cytométrie en flux est en marche. L'AQUIOS CL en est un parfait exemple. D'abord, il est plus abordable que les techniques habituelles de cytométrie en flux car ne nécessite pas l'utilisation de billes calibrées pour la numération des valeurs absolues, ni de billes de calibration journalière. Ensuite, c'est un instrument simple à utiliser, ne nécessitant pas un personnel aussi qualifié que pour les techniques de cytométrie traditionnelles. La prise en charge automatique de l'analyse depuis l'échantillonnage jusqu'au rendu du résultat, les algorithmes de fenêtrage et de numération des différentes populations cellulaires, les réactifs prêts à l'emploi et gérés par informatique, sont autant de paramètres en faveur d'une amélioration de la standardisation. Enfin, nous avons montré que l'automatisation de l'AQUIOS CL n'est pas préjudiciable aux performances analytiques puisque les résultats du β -test et de la validation de méthode respectent les recommandations internationales et les exigences du processus d'accréditation en cours.

D'autres techniques automatisées sont en cours d'évaluation. Par exemple, l'AQUIOS CL est également disponible avec un panel d'anticorps énumérant les LB et les lymphocytes NK (83). Par ailleurs, dans le cadre du monitoring clinique du sepsis par des biomarqueurs immunologiques, LeukoDX commercialise un cytomètre automatisé (miniaturisé, potentiellement utilisable au lit du malade), l'Accellix, dont la fonction est de quantifier l'expression du CD64 à la surface des PNN, augmentée lors d'infections bactériennes. L'Accellix est composé de cartouches à usage unique, contenant 3 réactifs : le mélange d'anticorps monoclonaux, le tampon de lyse des érythrocytes et les billes de standardisation. L'opérateur doit simplement ajouter quelques μ L de sang total à la cartouche pour lancer l'analyse. Le résultat est rendu sous forme d'un index, sans aucune intervention manuelle de l'opérateur (84). L'Accellix est en cours d'évaluation pour la mesure de l'expression de HLA-DR à la surface des monocytes comme biomarqueur pronostic du choc septique (85), et dans un autre contexte, pour la numération des cellules souches CD34+. L'avantage de cet automate est que n'importe quel utilisateur peu qualifié peut l'utiliser ; ceci ouvre la perspective de son utilisation 24/24 dans les laboratoires et unités de soins non familiarisés avec la cytométrie en flux, permettant ainsi la généralisation de l'utilisation de cette technique, qui a longtemps constitué un frein au développement clinique de certains marqueurs biologiques.

Nous assistons également à un effort de standardisation des tests de cytométrie en flux à visée diagnostique et clinique. Par exemple, un consortium européen Euroflow a mis au point un protocole standardisé de cytométrie en flux pour le diagnostic et la classification des hémopathies malignes. Le but principal de ce projet était d'obtenir des résultats comparables entre les différents

laboratoires d'hématologie réalisant des phénotypages lymphocytaires. Au final, 11 panels 8 couleurs ont été mis au point pour répondre à tous les critères diagnostiques de l'OMS (86, 87). Par ailleurs, les sociétés fabricantes de cytomètres de flux commencent également à mettre en place des réactifs lyophilisés prêts à l'emploi pour standardiser et développer l'utilisation de certaines analyses telles que les tests fonctionnels. Par exemple des kits de perméabilisation cellulaire (PerFix EXPOSE kit), facilitent et améliorent le dosage de diverses protéines intracellulaires comme les cytokines, FOXP3 ou les phosphoantigènes (88-90). Ce type d'approche devrait permettre la réalisation de ces tests fonctionnels dans les essais cliniques multicentriques) et à terme, leur utilisation en condition de routine dans les laboratoires d'immunologie.

En conclusion, nous assistons à la mise en place progressive de l'automatisation et de la standardisation de la cytométrie en flux. Dans un contexte actuel de plus en plus axé vers la médecine personnalisée, la cytométrie en flux ne doit plus être seulement réservée aux activités de recherche mais doit encore se développer pour devenir un vrai outil de monitoring clinique. L'exemple du « cancer immunogram » récemment publié dans Science en est le parfait exemple (91). Avec le développement exponentiel des biothérapies, il est raisonnable de penser que la cytométrie en flux aura une place prépondérante dans l'évaluation du statut immunitaire des patients.

CONCLUSIONS

VII. CONCLUSIONS

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

FACULTE DE PHARMACIE DE LYON

8, avenue Rockefeller – 69373 LYON Cedex 08

04.78.77.71.98 – Fax : 04.78.77.72.81

CONCLUSIONS

THÈSE SOUTENUE PAR : Morgane GOSSEZ-COULAUD

La cytométrie en flux (CMF) simple-plateforme basée sur l'utilisation de billes calibrées représente la technique de référence de la numération des valeurs absolues de lymphocytes T (LT) CD4. La précision et la reproductibilité de cette analyse biologique sont fondamentales, notamment dans le cadre du suivi des patients séropositifs au Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH). Or, il s'agit d'une méthode complexe, couteuse, nécessitant des opérateurs qualifiés. Récemment, une méthode alternative, automatisée, basée sur une approche volumétrique ne nécessitant pas de billes de quantification a été proposée (Cytomètre AQUIOS CL, Beckman Coulter). Cette technologie pourrait ainsi améliorer la standardisation et l'accréditation des résultats de numération des LT CD4.


Dans le cadre de cette thèse, nous avons évalué les performances et la mise en place en routine de deux cytomètres AQUIOS CL dans un laboratoire de biologie clinique. Nous avons effectué une première étude des performances de l'AQUIOS CL avant sa commercialisation (évaluation type β -test sur site). Par la suite, nous avons réalisé une validation de méthode pour deux AQUIOS CL installés au laboratoire, selon les recommandations du COFRAC (Comité Français d'Accréditation). Enfin, nous avons évalué leur mise en pratique en routine pendant les six premiers mois d'utilisation.

Les résultats très satisfaisants du β -test ont été récemment publiés (Gossez *et al.* Cytometry 2016) et ont conforté le choix des AQUIOS CL pour la réalisation en routine des numérations de LT CD4 au laboratoire. La validation de méthode a confirmé les performances dans le cadre des exigences du COFRAC (*e.g.* pour les LT CD4/ μ L - CV reproductibilité selon les niveaux de concentrations : 2,8-5,5% ; CV répétabilité : 2,0-5,0%). Les premiers mois d'utilisation ont permis d'identifier quelques problèmes mécaniques résolus depuis par l'industriel. Nous avons également mis en évidence des problèmes de lyse des érythrocytes pour lesquels nous avons défini des algorithmes décisionnels permettant la validation biologique. Enfin, malgré un changement radical des pratiques, l'arrivée de l'AQUIOS CL a été bien vécue par l'équipe du laboratoire (techniciens, internes et praticiens).

En conclusion, cette étude illustre l'intérêt de l'AQUIOS CL pour la numération des LT CD4 en routine clinique dans un laboratoire hospitalier d'immunologie cellulaire. Ces résultats seront à confirmer sur une plus longue période d'étude, et à confronter avec ceux d'autres laboratoires équipés de cette nouvelle technologie. D'une manière plus générale, ce travail s'inscrit dans l'effort actuel de standardisation de la cytométrie en flux en clinique.

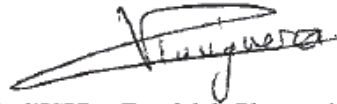
Le Président du Jury,
(Nom et Signature)

HONNERET



VU ET PERMIS D'IMPRIMER,

Lyon, le



Vu, la Directrice de l'ISPB – Faculté de Pharmacie de Lyon
Pour le Président de l'Université Claude Bernard Lyon 1,

Professeur C. VINCIGUERRA



BIBLIOGRAPHIE

VIII. BIBLIOGRAPHIE

1. Brando B, Barnett D, Janossy G, Mandy F, Aufran B, Rothe G, et al. **Cytofluorometric methods for assessing absolute numbers of cell subsets in blood.** *European Working Group on Clinical Cell Analysis. Cytometry.* 2000;42(6):327-46.
2. Bertrand Y, Baleyrier F. **Diagnostic d'un déficit immunitaire primitif de l'enfant.** *Revue Francophone des Laboratoires.* 2010;2010(424):53-8.
3. Picard C. **Comment explorer un déficit immunitaire héréditaire?** *La revue du praticien.* 2007;57.
4. Picard C, Pellier I. **Évoquer et diagnostiquer un déficit immunitaire héréditaire.** 2007. Available from: <http://pap-pediatrie.com/immunoinfectioparasito/%C3%A9voquer-et-diagnostiquer-un-d%C3%A9ficit-immunitaire-h%C3%A9r%C3%A9ditaire>.
5. Appelbaum FR. **Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy.** *Nature.* 2001;411(6835):385-9.
6. Fallen PR, Duarte RF, McGreavey L, Potter M, Ethell M, Prentice HG, et al. **Identification of non-naive CD4+CD45RA+ T cell subsets in adult allogeneic haematopoietic cell transplant recipients.** *Bone Marrow Transplant.* 2003;32(6):609-16.
7. Hakim FT, Gress RE. **Reconstitution of thymic function after stem cell transplantation in humans.** *Curr Opin Hematol.* 2002;9(6):490-6.
8. Villard J, Chapuis B, Helg C, Roosnek E. **Immunité cellulaire : les leçons de la transplantation de moelle osseuse allogénique (TMO).** *Rev Med Suisse* 2002.
9. Kohler S, Thiel A. **Life after the thymus: CD31+ and CD31- human naive CD4+ T-cell subsets.** *Blood.* 2009;113(4):769-74.
10. Mackay CR. **Dual personality of memory T cells.** *Nature.* 1999;401(6754):659-60.
11. Gurkan S, Luan Y, Dhillon N, Allam SR, Montague T, Bromberg JS, et al. **Immune reconstitution following rabbit antithymocyte globulin.** *Am J Transplant.* 2010;10(9):2132-41.
12. Ducloux D, Courivaud C, Bamoulid J, Vivet B, Chabroux A, Deschamps M, et al. **Prolonged CD4 T cell lymphopenia increases morbidity and mortality after renal transplantation.** *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(5):868-75.
13. Longuet H, Sautenet B, Gatault P, Thibault G, Barbet C, Marliere JF, et al. **Risk factors for impaired CD4+ T-cell reconstitution following rabbit antithymocyte globulin treatment in kidney transplantation.** *Transpl Int.* 2014;27(3):271-9.
14. Lopez-Diego RS, Weiner HL. **Novel therapeutic strategies for multiple sclerosis--a multifaceted adversary.** *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(11):909-25.
15. Dalakas MC. **B cells as therapeutic targets in autoimmune neurological disorders.** *Nat Clin Pract Neurol.* 2008;4(10):557-67.
16. Bohmig GA, Farkas AM, Eskandary F, Wekerle T. **Strategies to overcome the ABO barrier in kidney transplantation.** *Nat Rev Nephrol.* 2015;11(12):732-47.

17. Pham T, Fautrel B, Gottenberg JE, Goupille P, Hachulla E, Masson C, et al. **Rituximab (MabThera) therapy and safety management. Clinical tool guide.** Joint Bone Spine. 2008;75 Suppl 1:S1-99.
18. Bader-Meunier B, Aladjidi N. **Traitement de l'enfant par Rituximab pour une maladie systémique ou une cytopénie auto-immune. RECOMMANDATIONS.** 2009. Available from: http://www.cerhumip.fr/assets/files/recommandations_rtx_ped.pdf.
19. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **Pneumocystis pneumonia--Los Angeles.** MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 1981;30(21):250-2.
20. Montagnier L. **25 years after HIV discovery: prospects for cure and vaccine.** Virology. 2010;397(2):248-54.
21. WHO. **HIV/AIDS - Fact sheet 2016.** Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/en/>.
22. Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruet J, Guetard D, Hercend T, et al. **T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV.** Nature. 1984;312(5996):767-8.
23. Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. **The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus.** Nature. 1984;312(5996):763-7.
24. McCune JM. **The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease.** Nature. 2001;410(6831):974-9.
25. Fahey JL, Taylor JM, Detels R, Hofmann B, Melmed R, Nishanian P, et al. **The prognostic value of cellular and serologic markers in infection with human immunodeficiency virus type 1.** N Engl J Med. 1990;322(3):166-72.
26. Holodniy M, Katzenstein DA, Sengupta S, Wang AM, Casipit C, Schwartz DH, et al. **Detection and quantification of human immunodeficiency virus RNA in patient serum by use of the polymerase chain reaction.** J Infect Dis. 1991;163(4):862-6.
27. Lin HJ, Myers LE, Yen-Lieberman B, Hollinger FB, Henrard D, Hooper CJ, et al. **Multicenter evaluation of quantification methods for plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA.** J Infect Dis. 1994;170(3):553-62.
28. Goujard C, Bonarek M, Meyer L, Bonnet F, Chaix ML, Deveau C, et al. **CD4 cell count and HIV DNA level are independent predictors of disease progression after primary HIV type 1 infection in untreated patients.** Clin Infect Dis. 2006;42(5):709-15.
29. Williams JP, Hurst J, Stohr W, Robinson N, Brown H, Fisher M, et al. **HIV-1 DNA predicts disease progression and post-treatment virological control.** Elife. 2014;3:e03821.
30. Mellors JW, Munoz A, Giorgi JV, Margolick JB, Tassoni CJ, Gupta P, et al. **Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection.** Ann Intern Med. 1997;126(12):946-54.
31. Spijkerman IJ, Prins M, Goudsmit J, Veugelers PJ, Coutinho RA, Miedema F, et al. **Early and late HIV-1 RNA level and its association with other markers and disease progression in long-term AIDS-free homosexual men.** AIDS. 1997;11(11):1383-8.

32. de Wolf F, Spijkerman I, Schellekens PT, Langendam M, Kuiken C, Bakker M, et al. **AIDS prognosis based on HIV-1 RNA, CD4+ T-cell count and function: markers with reciprocal predictive value over time after seroconversion.** AIDS. 1997;11(15):1799-806.
33. Lundgren JD, Mocroft A, Gatell JM, Ledergerber B, D'Arminio Monforte A, Hermans P, et al. **A clinically prognostic scoring system for patients receiving highly active antiretroviral therapy: results from the EuroSIDA study.** J Infect Dis. 2002;185(2):178-87.
34. Yerly S, Perneger TV, Hirschel B, Dubuis O, Matter L, Malinverni R, et al. **A critical assessment of the prognostic value of HIV-1 RNA levels and CD4+ cell counts in HIV-infected patients. The Swiss HIV Cohort Study.** Arch Intern Med. 1998;158(3):247-52.
35. Gossez M, Ramjee G, Hurst J, Kaleebu P, Rees H, Porter K, et al. **Virological Remission After ART Interruption in African HIV-1 Seroconverters.** Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI); Boston, Massachusetts 2016.
36. Ledergerber B, Lundgren JD, Walker AS, Sabin C, Justice A, Reiss P, et al. **Predictors of trend in CD4-positive T-cell count and mortality among HIV-1-infected individuals with virological failure to all three antiretroviral-drug classes.** Lancet. 2004;364(9428):51-62.
37. Eholie SP, Badje A, Kouame GM, N'Takpe J B, Moh R, Danel C, et al. **Antiretroviral treatment regardless of CD4 count: the universal answer to a contextual question.** AIDS Res Ther. 2016;13:27.
38. Strategies for Management of Antiretroviral Therapy Study G, El-Sadr WM, Lundgren J, Neaton JD, Gordin F, Abrams D, et al. **CD4+ count-guided interruption of antiretroviral treatment.** N Engl J Med. 2006;355(22):2283-96.
39. Danel C, Moh R, Minga A, Anzian A, Ba-Gomis O, Kanga C, et al. **CD4-guided structured antiretroviral treatment interruption strategy in HIV-infected adults in west Africa (Trivacan ANRS 1269 trial): a randomised trial.** Lancet. 2006;367(9527):1981-9.
40. Kitahata MM, Gange SJ, Abraham AG, Merriman B, Saag MS, Justice AC, et al. **Effect of early versus deferred antiretroviral therapy for HIV on survival.** N Engl J Med. 2009;360(18):1815-26.
41. Severe P, Juste MA, Ambroise A, Eliacin L, Marchand C, Apollon S, et al. **Early versus standard antiretroviral therapy for HIV-infected adults in Haiti.** N Engl J Med. 2010;363(3):257-65.
42. Eholie SP, Vella S, Anglaret X. **Commentary: Antiretroviral therapy initiation criteria in low resource settings--from 'when to start' to 'when not to start'.** AIDS. 2014;28 Suppl 2:S101-4.
43. Ying R, Granich RM, Gupta S, Williams BG. **CD4 Cell Count: Declining Value for Antiretroviral Therapy Eligibility.** Clin Infect Dis. 2016;62(8):1022-8.
44. WHO. **Consolidated Guidelines on the Use of Antiretroviral Drugs for Treating and Preventing HIV Infection: Recommendations for a Public Health Approach.** 2013. Available from: <http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/arv2013/en/>.
45. WHO. **Guideline on when to start antiretroviral therapy and on pre-exposure prophylaxis for HIV.** 2015. Available from: <http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/earlyrelease-arv/en/>.
46. O'Brien WA, Hartigan PM, Daar ES, Simberkoff MS, Hamilton JD. **Changes in plasma HIV RNA levels and CD4+ lymphocyte counts predict both response to antiretroviral therapy and therapeutic failure. VA Cooperative Study Group on AIDS.** Ann Intern Med. 1997;126(12):939-45.

47. Kitchen CM, Kitchen SG, Dubin JA, Gottlieb MS. **Initial virological and immunologic response to highly active antiretroviral therapy predicts long-term clinical outcome.** Clin Infect Dis. 2001;33(4):466-72.
48. Sterling TR, Chaisson RE, Moore RD. **HIV-1 RNA, CD4 T-lymphocytes, and clinical response to highly active antiretroviral therapy.** AIDS. 2001;15(17):2251-7.
49. Egger M, May M, Chene G, Phillips AN, Ledergerber B, Dabis F, et al. **Prognosis of HIV-1-infected patients starting highly active antiretroviral therapy: a collaborative analysis of prospective studies.** Lancet. 2002;360(9327):119-29.
50. Deeks SG. **Determinants of virological response to antiretroviral therapy: implications for long-term strategies.** Clin Infect Dis. 2000;30 Suppl 2:S177-84.
51. Colebunders R, Moses KR, Laurence J, Shihab HM, Semitala F, Lutwama F, et al. **A new model to monitor the virological efficacy of antiretroviral treatment in resource-poor countries.** Lancet Infect Dis. 2006;6(1):53-9.
52. Meya D, Spacek LA, Tibenderana H, John L, Namugga I, Magero S, et al. **Development and evaluation of a clinical algorithm to monitor patients on antiretrovirals in resource-limited settings using adherence, clinical and CD4 cell count criteria.** J Int AIDS Soc. 2009;12:3.
53. Phan V, Thai S, Koole O, Menten J, Meheus F, van Griensven J, et al. **Validation of a clinical prediction score to target viral load testing in adults with suspected first-line treatment failure in resource-constrained settings.** J Acquir Immune Defic Syndr. 2013;62(5):509-16.
54. Lynen L, An S, Koole O, Thai S, Ros S, De Munter P, et al. **An algorithm to optimize viral load testing in HIV-positive patients with suspected first-line antiretroviral therapy failure in Cambodia.** J Acquir Immune Defic Syndr. 2009;52(1):40-8.
55. Abouyannis M, Menten J, Kiragga A, Lynen L, Robertson G, Castelnuovo B, et al. **Development and validation of systems for rational use of viral load testing in adults receiving first-line ART in sub-Saharan Africa.** AIDS. 2011;25(13):1627-35.
56. Labhardt ND, Lejone T, Setoko M, Poka M, Ehmer J, Pfeiffer K, et al. **A clinical prediction score in addition to WHO criteria for anti-retroviral treatment failure in resource-limited settings--experience from Lesotho.** PLoS One. 2012;7(10):e47937.
57. Lanier LL. **Just the FACS.** J Immunol. 2014;193(5):2043-4.
58. Mandy FF, Bergeron M, Minkus T. **Evolution of leukocyte immunophenotyping as influenced by the HIV/AIDS pandemic: a short history of the development of gating strategies for CD4+ T-cell enumeration.** Cytometry. 1997;30(4):157-65.
59. **BD Launches BD FACSymphony™ High-Speed Cell Analyzer to Enable Identification and Analysis of Rare Cell Types.** [press release]. Feb. 8 2016.
60. Bendall SC, Nolan GP, Roederer M, Chattopadhyay PK. **A deep profiler's guide to cytometry.** Trends Immunol. 2012;33(7):323-32.
61. Sack U, Barnett D, Demirel GY, Fossat C, Fricke S, Kafassi N, et al. **Accreditation of flow cytometry in Europe.** Cytometry B Clin Cytom. 2013;84(3):135-42.

62. Hultin LE, Chow M, Jamieson BD, O'Gorman MR, Menendez FA, Borowski L, et al. **Comparison of interlaboratory variation in absolute T-cell counts by single-platform and optimized dual-platform methods.** *Cytometry B Clin Cytom.* 2010;78(3):194-200.
63. Dieye TN, Vereecken C, Diallo AA, Ondo P, Diaw PA, Camara M, et al. **Absolute CD4 T-cell counting in resource-poor settings: direct volumetric measurements versus bead-based clinical flow cytometry instruments.** *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2005;39(1):32-7.
64. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **1997 revised guidelines for performing CD4+ T-cell determinations in persons infected with human immunodeficiency virus (HIV).** *MMWR Recomm Rep.* 1997;46(RR-2):1-29.
65. Mandy FF, Nicholson JK, McDougal JS, CDC. **Guidelines for performing single-platform absolute CD4+ T-cell determinations with CD45 gating for persons infected with human immunodeficiency virus.** Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep.* 2003;52(RR-2):1-13.
66. Schnizlein-Bick CT, Spritzler J, Wilkening CL, Nicholson JK, O'Gorman MR. **Evaluation of TruCount absolute-count tubes for determining CD4 and CD8 cell numbers in human immunodeficiency virus-positive adults. Site Investigators and The NIAID DAIDS New Technologies Evaluation Group.** *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000;7(3):336-43.
67. Reimann KA, O'Gorman MR, Spritzler J, Wilkening CL, Sabath DE, Helm K, et al. **Multisite comparison of CD4 and CD8 T-lymphocyte counting by single- versus multiple-platform methodologies: evaluation of Beckman Coulter flow-count fluorospheres and the tetraONE system. The NIAID DAIDS New Technologies Evaluation Group.** *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000;7(3):344-51.
68. Gelman R, Wilkening C. **Analyses of quality assessment studies using CD45 for gating lymphocytes for CD3(+)/CD4(+)%.** *Cytometry.* 2000;42(1):1-4.
69. Sack U, Tarnok A. **Harmonization of cytometry instrumentation and technologies.** *Cytometry A.* 2013;83(12):1055-6.
70. Tanqri S, Vall H, Kaplan D, Hoffman B, Purvis N, Porwit A, et al. **Validation of cell-based fluorescence assays: practice guidelines from the ICSH and ICCS - part III - analytical issues.** *Cytometry B Clin Cytom.* 2013;84(5):291-308.
71. Wood B, Jevremovic D, Bene MC, Yan M, Jacobs P, Litwin V, et al. **Validation of cell-based fluorescence assays: practice guidelines from the ICSH and ICCS - part V - assay performance criteria.** *Cytometry B Clin Cytom.* 2013;84(5):315-23.
72. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. **Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project.** *Nat Rev Immunol.* 2012;12(3):191-200.
73. WHO. **Prequalification of Diagnostics Programme. PUBLIC REPORT. Product: Aquios CL flow cytometer.** 2015 Nov. 9. Report No.: PQDx 0156-053-00.
74. Coulter WH, inventor. **Means for counting particles suspended in a fluid.** Patent US2656508 A. 1953 Oct. 20.
75. Beckman-Coulter. **Quality Control on the AQUIOS CL system for the Tetra Application.** 2015. Technical application information document n°FLOW.172TCH06.15-C. Available from: <http://www.beckman.com/getattachment/44854dc6-bb14-4bc0-bc21-1981f7b996d0/Daily%20Quality%20Control%20on%20the%20AQUIOS%20CL%20System%20for%20the%20Tetra%20Application>.

76. COFRAC. **Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en Biologie Médicale.** Document SH GTA 04 Rév. 01.
77. COFRAC. **Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en Biologie Médicale.** Document SH GTA 14 Rév. 00.
78. COFRAC. **Exigences pour l'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189.** Document SH REF 02 Rév. 05.
79. COFRAC. **Expression et évaluation des portées d'accréditation.** Document SH REF 08 Rév. 03.
80. Calaprice A. **The Ultimate Quotable Einstein.** 2010. In: Princeton University Press [Internet]. [384-5, 475]. Available from: <http://press.princeton.edu/titles/9268.html>.
81. Gossez M, Malcus C, Demaret J, Frater J, Poitevin-Later F, Monneret G. **Evaluation of a novel automated volumetric flow cytometer for absolute CD4+ T lymphocyte quantitation.** Cytometry B Clin Cytom. 2016.
82. Ricos C, Alvarez V, Cava F, Garcia-Lario JV, Hernandez A, Jimenez CV, et al. **Current databases on biological variation: pros, cons and progress.** Scand J Clin Lab Invest. 1999;59(7):491-500. Database updated in 2014, available from: <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>
83. Beckman-Coulter. **AQUIOS CL, The first true load-and-go flow cytometer... with a small footprint.** Available from: <http://www.beckman.com/coulter-flow-cytometry/instruments/flow-cytometers/aquios-cl>.
84. LeukoDX. **Accellix: User-friendly, push-button, in vitro diagnostics platform.** Available from: <http://www.leukodx.com/the-accellix-platform/>.
85. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. **Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy.** Nat Rev Immunol. 2013;13(12):862-74.
86. Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VH, Martin-Ayuso M, Bottcher S, Ritgen M, et al. **EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols.** Leukemia. 2012;26(9):1986-2010.
87. van Dongen JJ, Orfao A, EuroFlow C. **EuroFlow: Resetting leukemia and lymphoma immunophenotyping. Basis for companion diagnostics and personalized medicine.** Leukemia. 2012;26(9):1899-907.
88. Monneret G, Demaret J, Gossez M, Reverdiau E, Malergue F, Rimmele T, et al. **Novel Approach in Monocyte Intracellular TNF Measurement: Application to Sepsis-Induced Immune Alterations.** Shock. 2016.
89. Demaret J, Gossez M, Venet F, Monneret G. **Intracellular Flow Cytometry Improvements in Clinical Studies.** In: GB, editor. Cell cycle synchronization IId edition. 761. Springer New York Heidelberg London ed: Methods in molecular biology; 2016 (in press).
90. Dupont G, Demaret J, Venet F, Malergue F, Malcus C, Poitevin-Later F, et al. **Comparative dose-responses of recombinant human IL-2 and IL-7 on STAT5 phosphorylation in CD4+FOXP3- cells versus regulatory T cells: a whole blood perspective.** Cytokine. 2014;69(1):146-9.
91. Blank CU, Haanen JB, Ribas A, Schumacher TN. **CANCER IMMUNOLOGY. The "cancer immunogram".** Science. 2016;352(6286):658-60.

ANNEXES

Ces annexes sont des procédures officielles consultables sur le logiciel de gestion de la qualité utilisé au laboratoire, Kalilab.

- **Annexe 1** : Dossier de validation de méthode de l'AQUIOS 1
 - Ajout dans Kalilab en cours
- **Annexe 2** : Numération des lymphocytes T en valeur absolue par le cytomètre en flux AQUIOS CL (Beckman Coulter)
 - Document HI-ANA-MT-021-01
- **Annexe 3** : Procédure de gestion des contrôles qualité de l'immunologie cellulaire
 - Document HI-ANA-DE-009-01
- **Annexe 4** : Validation technique et biologique des numérations de lymphocytes T CD3+, CD4+ et CD8+ (TETRA 1) sur le cytomètre AQUIOS CL
 - Document HI-PostA-IT-005-01

ANNEXE 1 : DOSSIER DE VALIDATION DE METHODE DE L'AQUIOS 1

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE

Numération des valeurs absolues de lymphocytes T CD3+ totaux, CD4+ et T CD8+ sur le cytomètre AQUIOS CL AY47058

Processus simple ; Processus complexe

DESCRIPTION DU PROCESSUS

Modalités de vérification/validation¹ :

1. Répétabilité
2. Fidélité intermédiaire
3. Variabilité inter-opérateurs
4. Justesse
5. Exactitude
6. Sensibilité et spécificité analytique
7. Incertitudes
8. Etendue de mesure
9. Comparaison de méthodes
10. Interférences
11. Contamination
12. Robustesse et fiabilité des réactifs
13. Intervalle de référence

Numération des valeurs absolues de lymphocytes T CD3+ totaux, CD4+ et CD8+.

Remarques :

- Les interférences et la spécificité analytique sont décrites dans le document Beckman Document Beckman « performance analytique réactifs cytométrie » AcrodiPack (Version 1.1_ avril 2012).

Les interférences et les limites analytiques de la technique sont également décrites dans le manuel d'utilisation AQUIOS CL (B44245AB, avril 2015 ; Chap.1 : « utilisation et fonctionnement – Limites »).

Les interférences sont détectables lors de l'analyse cytométrique. Elles n'ont donc été pas vérifiées. La spécificité analytique est assurée par le classement des anticorps monoclonaux en Classe de Différenciation leucocytaire (CD).

- La robustesse et fiabilité des réactifs n'ont pas été vérifiées car les réactifs utilisés sont du fournisseur, marquée CE IVD, utilisés très rapidement et selon ses recommandations.

¹ Note : Pour la vérification/validation de méthodes quantitatives, le renseignement des items 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 est attendu, a minima. Pour la vérification/validation de méthodes qualitatives, le renseignement des items 3, 6, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 est attendu, a minima.


Le type de vérification (bibliographique ou essais) est à indiquer.

L'absence d'applicabilité de certains items (NA) doit être justifiée dans le corps du document.

DESCRIPTION DE LA METHODE																																																																														
Analyte / Mesurande	Lymphocytes T CD3+ totaux, CD4+ et CD8+.																																																																													
Principe de la Méthode	Méthode quantitative volumétrique par cytométrie en flux simple plateforme. L'échantillon primaire est chargé sur l'AQUIOS CL qui prélève le sang total et le dépose dans une plaque 96 puits. Le sang est ensuite marqué par les anticorps monoclonaux du panel Tétrra-1 (CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5), lysé sans étape de lavage, puis injecté dans la cellule d'analyse du cytomètre de flux pour quantification des différentes sous populations lymphocytaires.																																																																													
Type d'échantillon primaire :	Sang total.																																																																													
Type de récipient, additifs	Tube EDTA.																																																																													
Prétraitement de l'échantillon	Aucun prétraitement nécessaire.																																																																													
Unités	Nombre de lymphocytes en pourcentage et cellules /µL de sang.																																																																													
	Valeurs pédiatriques : <i>Comans-Biters et al. 1997 et Shearer et al. 2003</i> ; Valeurs adultes : <i>Bisser et al. 2004</i>																																																																													
Critères d'interprétation	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Age</th> <th>Ly CD3 %</th> <th>Ly CD3 /µL</th> <th>LT CD4 %</th> <th>LT CD4 /µL</th> <th>LT CD8 %</th> <th>LT CD8 /µL</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>< 7 jour</td> <td>28-76</td> <td>600-5000</td> <td>17-52</td> <td>400-3500</td> <td>10-41</td> <td>200-1900</td> </tr> <tr> <td>7 jours - 3 mois</td> <td>53-84</td> <td>2500-500</td> <td>35-64</td> <td>1600-4000</td> <td>12-28</td> <td>580-1700</td> </tr> <tr> <td>3 - 6 mois</td> <td>51-77</td> <td>2500-5600</td> <td>35-56</td> <td>1800-4000</td> <td>12-23</td> <td>590-1600</td> </tr> <tr> <td>6 - 12 mois</td> <td>49-76</td> <td>1900-5900</td> <td>31-56</td> <td>1400-4300</td> <td>12-24</td> <td>500-1700</td> </tr> <tr> <td>12 - 24 mois</td> <td>53-75</td> <td>2100-6200</td> <td>32-51</td> <td>1300-3400</td> <td>14-30</td> <td>620-2000</td> </tr> <tr> <td>2 - 6 ans</td> <td>56-75</td> <td>1400-3700</td> <td>28-47</td> <td>700-2200</td> <td>16-30</td> <td>490-1300</td> </tr> <tr> <td>6 - 12 ans</td> <td>60-76</td> <td>1200-2600</td> <td>31-47</td> <td>650-1500</td> <td>18-35</td> <td>370-1100</td> </tr> <tr> <td>12- 18 ans</td> <td>56-84</td> <td>1000-2200</td> <td>31-52</td> <td>530-1300</td> <td>18-35</td> <td>330-920</td> </tr> <tr> <td>18 - 70 ans (F)</td> <td>61-83</td> <td>595-1861</td> <td>31-63</td> <td>314-1270</td> <td>12-37</td> <td>147-836</td> </tr> <tr> <td>18 - 70 ans (H)</td> <td>62-85</td> <td>521-1772</td> <td>33-62</td> <td>336-1126</td> <td>10-41</td> <td>125-780</td> </tr> </tbody> </table>	Age	Ly CD3 %	Ly CD3 /µL	LT CD4 %	LT CD4 /µL	LT CD8 %	LT CD8 /µL	< 7 jour	28-76	600-5000	17-52	400-3500	10-41	200-1900	7 jours - 3 mois	53-84	2500-500	35-64	1600-4000	12-28	580-1700	3 - 6 mois	51-77	2500-5600	35-56	1800-4000	12-23	590-1600	6 - 12 mois	49-76	1900-5900	31-56	1400-4300	12-24	500-1700	12 - 24 mois	53-75	2100-6200	32-51	1300-3400	14-30	620-2000	2 - 6 ans	56-75	1400-3700	28-47	700-2200	16-30	490-1300	6 - 12 ans	60-76	1200-2600	31-47	650-1500	18-35	370-1100	12- 18 ans	56-84	1000-2200	31-52	530-1300	18-35	330-920	18 - 70 ans (F)	61-83	595-1861	31-63	314-1270	12-37	147-836	18 - 70 ans (H)	62-85	521-1772	33-62	336-1126	10-41	125-780
Age	Ly CD3 %	Ly CD3 /µL	LT CD4 %	LT CD4 /µL	LT CD8 %	LT CD8 /µL																																																																								
< 7 jour	28-76	600-5000	17-52	400-3500	10-41	200-1900																																																																								
7 jours - 3 mois	53-84	2500-500	35-64	1600-4000	12-28	580-1700																																																																								
3 - 6 mois	51-77	2500-5600	35-56	1800-4000	12-23	590-1600																																																																								
6 - 12 mois	49-76	1900-5900	31-56	1400-4300	12-24	500-1700																																																																								
12 - 24 mois	53-75	2100-6200	32-51	1300-3400	14-30	620-2000																																																																								
2 - 6 ans	56-75	1400-3700	28-47	700-2200	16-30	490-1300																																																																								
6 - 12 ans	60-76	1200-2600	31-47	650-1500	18-35	370-1100																																																																								
12- 18 ans	56-84	1000-2200	31-52	530-1300	18-35	330-920																																																																								
18 - 70 ans (F)	61-83	595-1861	31-63	314-1270	12-37	147-836																																																																								
18 - 70 ans (H)	62-85	521-1772	33-62	336-1126	10-41	125-780																																																																								
Marquage CE (Oui/Non)	Oui																																																																													
Codeage C.N.Q. (s'il existe)	Typage lymphocytaire XXTYLX																																																																													
Équipement (instrument, analyseur, etc.)	AQUIOS CL, n° série AY47058 (Beckman Coulter)																																																																													
Référence du réactif	<ul style="list-style-type: none"> - AQUIOS Tetra-1 (ref. B23533, PN B25337-AD) - AQUIOS Lysing Reagent Kit (ref. B23538, PN B29135-AD) - AQUIOS Sheath Solution (Ref: B25697, PN B29160-AB) - AQUIOS Immunotrol Cells (ref B23535, PN B29142-AC) - AQUIOS Immunotrol Low Cells (ref B25700, PN B29141-AC) - AQUIOS Cleaning agent (ref B25698, PN B29145-AC) - AQUIOS Sodium hypochlorite solution (ref B23536, PN B29158-AC) 																																																																													
Matériau d'étalonnage (références)	AQUIOS Rainbow Fluorescent calibrator (ref B39853) AQUIOS Count Calibrator (ref B38390)																																																																													
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs	Ces réactifs sont utilisés lors de l'installation de l'automate et lors des maintenances par le SAV fournisseur Pas d'étalonnage interne																																																																													

LBMMS-CHU DE LYON
GROUPEMENT HOSPITALIER
EDOUARD HERRIOT
SERVICE
D'IMMUNOLOGIE
CELLULAIRE

Fiche type de vérification (portée A) d'une méthode de biologie médicale



Hospices Civils de Lyon

MISE EN ŒUVRE	
Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode :	Morgane GOSSEZ (interne)
Procédure de validation/mode opératoire :	MU-ANA-PG-001 : Procédure générale de validation / vérification des méthodes MU-ANA-PG-002 : Procédure de validation / vérification des méthodes quantitatives
Procédure de gestion de la portée flexible :	MU-ANA-PG-003 : Procédure de gestion de la portée d'accréditation
Période d'étude :	Du : 13/01/16 au 26/01/16
Date de 1 ^{ère} utilisation :	27/01/16

MAITRISE DES RISQUES (le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)			
5M	Points critiques	Echelle de criticité ²	Eléments à maîtriser
	Identité	60	Formation et information du personnel LBMMS-Manuel de prélèvement : MU-PréA-PG-003 Organisation du secteur pré-analytique : HI-PréA-PG-001 Tri/Réception/Enregistrement des examens : HI-PréA-IT-001 Fiche d'habilitation « Réception » : H-RH-DE-002 Utilisation du cytomètre en flux AQUIOS Beckman Coulter : HI-ANA-MT-021 LBMMS – Non-conformité étiquetage prélèvement (absence, discordance, erreur) : MU-SMQ-IT-005 LBMMS – Dérégulation pour une non-conformité d'étiquetage (Identitovigilance) : MU-PréA-DE-001
Matière (échantillons)	Préparation du patient	30	Information des patients et préleveurs
	Type de contenants	6	Formation des préleveurs - Manuel de prélèvement : MU-PréA-PG-003 - Catalogue des analyses HCL : EasyBiobook - Bon de demande d'analyse - e-Learning géré par le service formation

² A préciser par le laboratoire, par exemple 1 non critique – 5 très critique ;



LBMMS-CHU DE LYON
GROUPEMENT HOSPITALIER
EDOUARD HERRIOT
SERVICE
D'IMMUNOLOGIE
CELLULAIRE

Fiche type de vérification (portée A) d'une méthode de biologie médicale

MAITRISE DES RISQUES (le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)			
5M	Points critiques	Echelle de criticité ²	Eléments à maîtriser
	Nature et volume de l'échantillon	6	Contrôle à réception et au moment de l'analyse Fiche d'habilitation « Réception » : HI-RH-DE-002 - Bon de demande d'analyse - Pré-Analytique contrôle des prélèvements : MU-PréA-IT-022 - Organisation du secteur pré-analytique : HI-PréA-PG-001 - Tri/Réception/Enregistrement des examens : HI-PréA-IT-001 - Utilisation du cytomètre en flux AQUIOS Beckman Coulter : HI-ANA-MT-021
	Délai et traitement avant traitement analytique	30	Gestion logistique (navettes, enceintes de transport) Procédure d'achèvement des prélèvements aux RTE : MU-PréA-PG-004 - Procédure de gestion des demandes et des échantillons : MU-PréA-PG-007 - LBMMS-Grille d'audits internes RTE : MU-SMQ-DE-032 - Pré-Analytique contrôle des prélèvements : MU-PréA-IT-022 - Fiche d'évaluation : secteur « Réception, tri et enregistrement » : MU-PréA-DE-027 - LBMMS RTE Fiche de qualification/habilitation Biologiste responsable RTE : MU-RH-DE-051 - LBMMS - RTE Fiche de qualification/habilitation Personnel Réception : MU-RH-DE-052 - Fiche d'habilitation « Réception » : HI-RH-DE-002 - LBMMS : informaticque enregistrement d'une non-conformité dans GLIMS : MU-INFO-IT-019
	Prétraitement : centrifugation, ...		Non concerné.

MAITRISE DES RISQUES (le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)				
5M	Points critiques	Echelle de criticité ²	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
	Interférences	6	Formation des préleveurs Contrôle à réception	<ul style="list-style-type: none"> - Manuel de prélèvement : MU-PréA-PG-003 - Utilisation du cytomètre en flux AQUIOS Beckman Coulter : HI-ANA-MT-021
	Conditions de conservation et d'utilisation des échantillons (T°, ...)	30	Température de la pièce technique entre 18 et 26 °C	<ul style="list-style-type: none"> - Instruction de gestion et de suivi des températures : HI-ACHAT-IT-006, OCEASOFT- Traçabilité du contrôle des températures ; HI-ACHAT-DE-001.
	Conditions de conservation et d'utilisation des réactifs (T°, ...)	9	Température de la pièce technique entre 18 et 26 °C Métrologie/suivi des enceintes	<ul style="list-style-type: none"> - LBMMS-Procédure de gestion et de suivi des températures : MU-ACHAT-PG-001 - LBMMS-Enregistrement de suivi des températures des enceintes thermostatiques : MU-ACHAT-DE-001. - Utilisation du cytomètre en flux AQUIOS Beckman Coulter : HI-ANA-MT-021 - Sonde de température étalonnée par un prestataire de métrologie accrédité COFRAC - Locaux climatisés.
	Exigences environnementales pour le matériel ou l'opérateur	3	Température de la pièce entre 18 et 26 °C, avec recommandation que la température ne fluctue pas de plus de ± 2.8 °C.	<ul style="list-style-type: none"> - Relevés des températures les jours ouvrés. - Instruction de gestion et de suivi des températures : HI-ACHAT-IT-006. - LBMMS-Enregistrement de suivi des températures des enceintes thermostatiques : MU-ACHAT-DE-001. - LBMMS-Procédure de gestion et de suivi des températures : MU-ACHAT-PG-001. - Fiche d'habilitation cytomètre AQUIOS : HI-RH-DE-015 - Sonde de température étalonnée par un prestataire de métrologie accrédité COFRAC
Matériel (équipe)	Qualité de l'eau			Non concerné.

MAITRISE DES RISQUES (le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)				
5M	Points critiques	Echelle de criticité ²	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
	Surveillance des dérives	30	Périodicité des maintenances Maîtrise des équipements (suivi métrologique, raccordement, ...)	<ul style="list-style-type: none"> - Enregistrements des maintenances (gravimétrie) - CIQ/EECQ - Utilisation du cytomètre en flux AQUIOS Beckman Coulter : HI-ANA-MT-021
	Contamination	60	Respect des conditions opératoires du fournisseur	<ul style="list-style-type: none"> - Bibliographie : Gossez et al. 2016 - Essais de contamination sur site : cf Validation de méthode
	Informatique embarquée	18	Paramétrage, étalonnage, connexions, archivage des données, ...	<ul style="list-style-type: none"> - Enregistrements des jeux d'essai - Archivage des résultats - Utilisation du cytomètre en flux AQUIOS Beckman Coulter : HI-ANA-MT-021

MAITRISE DES RISQUES
(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)

5M	Points critiques	Echelle de criticité ²	Eléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
	Conservation et conditions d'utilisation	3	Métriologie des enceintes (cartographie et suivi des températures) Gestion des réactifs par l'automate	<ul style="list-style-type: none"> - Instruction de gestion et de suivi des températures : HI-ACHAT-JT-006 - OCEASOFT - Traçabilité du contrôle des températures : HI-ACHAT-DE-001 - LBMMS-Enregistrement de suivi des températures des enceintes thermostatiques : MU-ACHAT-DE-001-02 - LBMMS-Procédure de gestion et de suivi des températures : MU-ACHAT-PG-001-02 - Utilisation du cytomètre en flux : AQUIOS Beckman Coulter : HI-ANA-MT-021
Matériel (réactifs)	Gestion des stocks	6	Acceptation à réception des réactifs Gestion des stocks	<ul style="list-style-type: none"> - Mode opératoire de la traçabilité des lots de réactifs : HI-ACHAT-JT-004 - Traçabilité des lots de réactifs : HI-ACHAT-DE-002
	Reconstitution des réactifs, étalons, contrôles			Non concerné.
	Limites de la méthode (détection, quantification, linéarité, interférences, ...)	30	Limite de détection, limite de quantification, linéarité, interférences, ... Sensibilité, spécificité	<ul style="list-style-type: none"> - Cf Validation de méthode - Gossez et al. 2016
Méthode	Causes d'incertitude de mesure	30	Incidents aigus sur l'AQUIOS CL (bouchage, mauvais pipetage, ...) Mauvais fenêtrage par l'utilisateur lors de la validation technique	<ul style="list-style-type: none"> - Cf Validation de méthode pour le calcul des incertitudes de mesure - Gossez et al. 2016 - Procédure d'utilisation de l'AQUIOS CL : HI-ANA-MT-021 - Procédure de validation technique et biologique

MAITRISE DES RISQUES
(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)

5M	Points critiques	Echelle de criticité ²	Eléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
Main d'œuvre (Personnel)	Compétence et maintien de compétence du personnel	10	Formation et évaluation des compétences du personnel, plan de formation Disponibilité du personnel pour assurer le respect de la procédure	<ul style="list-style-type: none"> - Fiche habilitation réception : HI-RH-DE-002 - Fiche d'habilitation cytomètre AQUIOS : HI-RH-DE-015 - Organisation générale des postes du personnel non médical du laboratoire : HI-RH-PG-004 - Fiche d'habilitation « Biologiste Immunologie Cellulaire » : HI-RH-DE-009 - Traçabilité de l'occupation des postes de travail (planning)

Echelle de criticité : Calcul en respect des consignes de calcul de la procédure MU-ANA-PG-001-01

Afin d'établir la criticité des risques identifiés, la méthode **AMDEC** peut être utilisée.

Pour chaque risque identifié, il s'agit d'estimer :

- sa **fréquence** (1 = très peu fréquent, 3 = peu fréquent 6 = fréquent 10 = très fréquent),
- sa **gravité** (1 = pas d'impact sur le résultat, 3 = peu d'impact 6 = résultat impossible à donner 10= résultat erroné),
- sa **détectabilité** (1 = toujours détecté, 3 = facilement détecté, 6 = détection possible non infaillible, 10= indétectable).

Le produit de ces trois indices (fréquence x gravité x détectabilité) donne la criticité du risque.

Le seuil de criticité est <= 30 (cf. annexe tableau des criticités pour le choix de cette valeur).

→ Cf Annexe 1 pour le détail des calculs de criticité de chaque paramètre.

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

Echantillons de contrôle : AQUIOS Immunotrol Cells et AQUIOS Immunotrol Low Cells
Ou échantillons de sang total de routine selon les tests de la validation de méthode réalisés.

Echantillons	Paramètre	Nombre de valeurs (N)	REPEATABILITE			
			Moyenne	Ecart-type	CV (%) fournisseur	CV (%) GOSSEZ et al. 2016
AQUIOS Immunotrol Cells lot 6170010	Ly CD3 %	30	73.2	0.86	1.18	0.6
	Ly CD3 /µL		851.2	23.14	2.72	3.3
	LT CD4 %		48.5	0.71	1.47	1.4
	LT CD4 /µL		564.0	16.68	2.96	3.6
	LT CD8 %		23.6	0.72	3.07	2.9
AQUIOS Immunotrol Low Cells lot 6180012	LT CD8 /µL	30	274.0	10.18	3.72	4.4
	Ly CD3 %		57.9	1.43	2.46	2.1
	Ly CD3 /µL		445.6	14.82	3.33	2.6
	LT CD4 %		19.3	0.83	4.32	3.7
	LT CD4 /µL		148.4	7.39	4.98	2.8
6180011	LT CD8 %	31	33.6	1.02	3.03	2.2
	LT CD8 /µL		258.8	9.47	3.66	3.6

La répétabilité a été réalisée sur AQUIOS Immunotrol Cells et Low Cells à cause du volume important d'échantillon que cet essai requiert ; de plus, combiner des échantillons de sang total issus de plusieurs patients différents n'est pas recommandé du fait des incompatibilités ABO et du risque d'aggrégation des cellules sanguines.

Argumentaire de la conclusion :

Les CV tirés des publications de Gossez et al. et de Reimann et al. sont donnés à titre indicatif. Ils nous permettent de comparer les CV obtenus de l'AQUIOS AY47058 avec ceux issus de deux études réalisées sur un AQUIOS d'une part et un cytomètre à technologie différente (EPICS XL, Beckman Coulter) d'autre part. Ils ne sont en aucun cas utilisés comme des seuils d'acceptabilité.

Il en est de même pour les valeurs des CV obtenus lors de la validation de méthode du FC500 (Beckman Coulter), cytomètre précédemment utilisé au laboratoire.

Ne disposant pas de critères d'acceptation spécifiques pour les paramètres CD3 (% et /µL), nous considérons ces résultats conformes puisque les CV de répétabilité sont inférieurs/similaires à ceux des autres paramètres et leurs critères d'acceptation respectifs.

Les résultats sont donc considérés comme conformes à l'état de l'art de la méthodologie de cytométrie et en concordance avec les valeurs observés pour l'automate précédemment utilisé.

Echantillons	Paramètre	Nombre de valeurs (N)	FIDELITE INTERMEDIAIRE :				CV (%) RICOS soustahlable LT CD4+	
			Moyenne	Ecart-type	CV (%) fournisseur	CV (%) Gossez et al. 2016		
AQUIOS Immunotrol Cells lot 617009	Ly CD3 %	30	74.7	0.91	1.23	-	< 12.5	
	Ly CD3 /µL		801.3	25.52	3.19	2.66	< 12.5	
	LT CD4 %		47.7	0.88	1.85	1.76	< 12.5	
	LT CD4 /µL		511.6	16.03	3.13	2.94	3.26	< 12.5
	LT CD8 %		25.5	0.68	2.65	3.11	-	< 12.5
AQUIOS Immunotrol Low Cells lot 6180011	LT CD8 /µL	31	273.2	12.54	4.59	3.93	< 12.5	
	Ly CD3 %		61.7	1.03	1.68	2.07	< 12.5	
	Ly CD3 /µL		400.6	16.51	4.12	3.09	< 12.5	
	LT CD4 %		23.6	0.91	3.86	3.84	< 12.5	
	LT CD4 /µL		154.4	7.92	5.13	4.52	9.20	< 12.5
6180011	LT CD8 %	31	33.2	1.06	3.18	3.06	< 12.5	
	LT CD8 /µL		217.5	10.98	5.05	3.92	< 12.5	

Argumentaire de la conclusion :

Du fait de contraintes d'organisation et de connexion informatique, nous n'avons pu réaliser l'essai de fidélité intermédiaire que sur une période de 13 jours seulement.

Les CV tirés de Gossez et al. et des données fournisseur sont donnés à titre indicatif. Ils nous permettent de comparer les CV obtenus de l'AQUIOS AY47058 avec ceux issus de deux seules études réalisées sur le même cytomètre. Ils ne sont en aucun cas utilisés comme des seuils d'acceptabilité.

Ne disposant de biais limite pour les sous-populations T, le biais limite de RICOS pour la numération des lymphocytes T CD4+ est utilisé, considérant qu'il peut être informatif pour les biais de numération de tout type de sous populations lymphocytaires.

Les résultats sont considérés comme conformes à l'état de l'art de la méthodologie de cytométrie.

Opérateur évalué 1	VARIABILITE INTER-OPERATEURS Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable <input checked="" type="checkbox"/>	NON REALISE
--------------------	--	-------------

**JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés)
Applicable ; non applicable (à justifier)**

Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Valeurs Labo	Cible (groupe de paires)	Biais (%) /groupe de paires	Biais (%) / moyenne générale	Biais (%) RICOS souhaitable Lymphocytes*	Conclusion ³
AQUIOS Immunotrol Cells lot 6170010	Ly CD3 %	74,2				< 9,19	
	Ly CD8 /µL	860				< 9,19	
	LT CD4 %	49,2				< 9,19	
	LT CD4 /µL	570				< 9,19	
	LT CD8 %	23,8				< 9,19	
AQUIOS Immunotrol Low Cells	Ly CD3 %	276				< 9,19	
	Ly CD3 /µL					< 9,19	
	LT CD4 %					< 9,19	
	LT CD4 /µL					< 9,19	
	LT CD8 %					< 9,19	

Remarque : Les valeurs sont données telles que transmises par l'organisme de traitement du CIQ externalisé

Argumentaire de la conclusion : En attente des résultats des CIQ externalisés (ICAP) pour ces premiers lots de CIQ.

(*) Ne disposant de biais limite pour les sous-populations T, le biais limite de RICOS pour la numération des lymphocytes totaux est utilisé, considérant qu'il peut être informatif pour les biais de numération de tout type de sous populations lymphocytaires.

Argumentaire de la conclusion :

L'UK NEQAS utilisé fait partie de l'« Immune Monitoring (Alternative Technologies) Programme », formulé spécialement pour les AQUIOS CL. Il n'y a donc pas de possibilité de comparaison « toutes techniques » mais seulement avec les pairs (n=16), utilisant également l'AQUIOS CL.

Le z-Score doit être compris entre -2 et +2 pour rendre les résultats comme « conformes ».

Les résultats sont considérés comme conformes à l'état de l'art de la méthodologie de cytométrie.

**SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE
(étude expérimentale indispensable en portée B)
Applicable ; non applicable (à justifier)**

Vrais positifs	
Faux positifs	
Faux négatifs	

La spécificité analytique est assurée par la classification internationale des anticorps monoclonaux en Classe de Différentiation leucocytaire (CD) (Human Leucocyte Differentiation Antigen Workshop).

La spécificité analytique est décrite dans le manuel d'utilisation AQUIOS CL (B44245AB, avril 2015) et le document Beckman « performance analytique réactifs cytométrie » AccrediPack (Version 1.1, avril 2012).

**EXACTITUDE (à partir des contrôles externes ponctuels - EEQ/CNQ)
Contrôles quantitatifs ; Contrôles qualitatifs**

Echantillons	Paramètre	Valeur Labo	Cible (groupe de paires)	z Score = Biais / groupe de paires	Conclusion
UK NEQAS 025 30/05/2016	Ly CD3 %	64,4	64,0	0,26	Conforme
	Ly CD3 /µL	567	578,3	-0,90	
	LT CD4 %	26,6	26,0	1,00	
	LT CD4 /µL	235	236,2	-0,13	
	LT CD8 %	34,4	34,7	-0,29	
UK NEQAS 026 30/05/2016	LT CD8 /µL	303	313,7	-0,90	Conforme
	Ly CD3 %	71,8	71,0	0,94	
	Ly CD3 /µL	845	866,8	-0,85	
	LT CD4 %	47,6	47,1	0,57	
	LT CD4 /µL	561	571,9	-0,61	
	LT CD8 %	22,1	21,8	0,26	
	LT CD8 /µL	260	264,9	-0,38	

Remarque : Les valeurs sont données telles que transmises par l'organisme de traitement du CIQ externalisé

**INCERTITUDE DE MESURE (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) :
Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle) ; calcul**


Mode de calcul	Incertitudes calculées	Exigence de performances	
Quantification de l'incertitude : UK NEQAS 025 (Valeur cible de immunotrol Low cells lot 6180011 fournie par le fournisseur)	Formule du SH GTA 14 : $U = 2 * \sqrt{(E / \wedge 3)}$	Ricos	
	Ly CD3 %	59,9 ± 3,5%	
	Ly CD3 /µL	407 ± 8,7%	
	LT CD4 %	22,6 ± 8,6%	
Quantification de l'incertitude : UK NEQAS 026 (Valeur cible de immunotrol cells lot 618009 fournie par le fournisseur)	Ly CD3 %	153 ± 10,4%	
	LT CD8 %	32,9 ± 6,5%	
	Ly CD3 /µL	222 ± 11,4%	
	Ly CD3 /µL	73,3 ± 2,8%	
	Ly CD3 /µL	801 ± 7,1%	
	LT CD4 %	46,3 ± 4,0%	
	LT CD4 /µL	504 ± 6,8%	
	LT CD8 %	25,8 ± 5,4%	
	LT CD8 /µL	280 ± 9,2%	

RICOS de l'erreur totale souhaitable sur le compte des lymphocytes 17,6%^(*)

(*) Ne disposant pas d'erreur totale limite pour les sous-populations T, celles de la numération des lymphocytes totaux selon RICOS sont utilisées considérant qu'elles peuvent être informatives pour tout type de sous populations lymphocytaires.


LBMMS-CHU DE
LYON
GROUPEMENT
HOSPITALIER
EDOUARD HERRIOT
SERVICE
D'IMMUNOLOGIE
SECTEUR IMMUNOLOGIE
CELLULAIRE

**Fiche type de vérification (portée A)
d'une méthode de biologie médicale**


Hospices Civils de Lyon

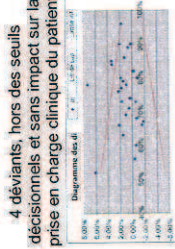

LBMMS-CHU DE
LYON
GROUPEMENT
HOSPITALIER
EDOUARD HERRIOT
SERVICE
D'IMMUNOLOGIE
SECTEUR IMMUNOLOGIE
CELLULAIRE

**Fiche type de vérification (portée A)
d'une méthode de biologie médicale**




Hospices Civils de Lyon


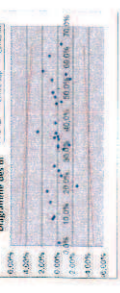
Argumentaire de la conclusion :



L'incertitude de mesure n'engendre aucun impact sur la zone décisionnelle, les résultats sont considérés comme conformes à l'état de l'art de la méthodologie de cytométrie.

COMPARAISON DE METHODES : Ly CD3 (%) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Données bibliographiques	<ul style="list-style-type: none"> - GOSSEZ M. et al. "Evaluation of a novel automated volumetric flow cytometer for absolute CD4+ T lymphocyte quantitation". Cytometry B Clin Cytom. 2016 Jan 25. - Guide du logiciel du système Tetra AQUIOS. (Réf. B44253AB Avril 2015)
Méthode précédente et appareil en miroir	Méthode précédente : FC500 (Beckman Coulter) Automate en miroir : AQUIOS CL, AY39049 (Beckman Coulter)
Nombre de mesures	30
Intervalle de comparaison	45,9 – 94,2% LT CD3+
Méthode d'exploitation des résultats	Régression linéaire (Pearson), Test de Bland Altman
Equation de la droite de régression	AQUIOS AY47058 / FC500: $y = 0,9877x - 0,28$ $R^2 = 0,9645$ AQUIOS AY47058 / AQUIOS AY39049 : $y = 1,0197x - 1,99$ $R^2 = 0,9796$
Diagramme des différences et/ou des rapports	<p>4 déviants, hors des seuils décisionnels et sans impact sur la prise en charge clinique du patient</p>  <p>Aucun déviant.</p> 



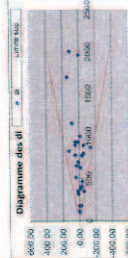
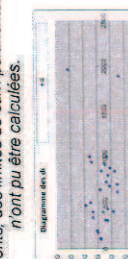
COMPARAISON DE METHODES : LT CD3 (µL) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Données bibliographiques	<ul style="list-style-type: none"> - GOSSEZ M. et al. "Evaluation of a novel automated volumetric flow cytometer for absolute CD4+ T lymphocyte quantitation". Cytometry B Clin Cytom. 2016 Jan 25. - Guide du logiciel du système Tetra AQUIOS. (Réf. B44253AB Avril 2015)
Méthode précédente et appareil en miroir	Méthode précédente : FC500 (Beckman Coulter) Automate en miroir : AQUIOS CL, AY47058 (Beckman Coulter)
Nombre de mesures	30
Intervalle de comparaison	168 – 5173 LT CD3+ /µL
Méthode d'exploitation des résultats	Régression linéaire (Pearson), Test de Bland Altman

Equation de la droite de régression	AQUIOS AY47058 / FC500: $y = 0,927x + 83,31$ $R^2 = 0,9826$	AQUIOS AY47058 / AQUIOS AY39049: $y = 0,9996x + 59,39$ $R^2 = 0,9864$	
Diagramme des différences et/ou des rapports			2 déviants au niveau de la limite de suivi : aucun impact sur la prise en charge clinique du patient
			5 déviants, hors des seuils décisionnels et sans impact sur la prise en charge clinique du patient

COMPARAISON DE METHODES : LT CD4 (%) Applicable ☒ ; non applicable (à justifier) ☐			
Données bibliographiques	- GOSSEZ M. et al. "Evaluation of a novel automated volumetric flow cytometer for absolute CD4+ T lymphocyte quantitation". Cytometry B Clin Cytom. 2016 Jan 25. - Guide du logiciel du système Tetra AQUIOS, (Réf. B44253AB Avril 2015)		
Méthode précédente et appareil en miroir	Méthode précédente : FC500 (Beckman Coulter) Automate en miroir : AQUIOS CL, AY47058 (Beckman Coulter)		
Nombre de mesures	30		
Intervalle de comparaison	0,9 – 64,2 % LT CD4+		
Méthode d'exploitation des résultats	Régression linéaire (Pearson), Test de Bland Altman		
Equation de la droite de régression	AQUIOS AY47058 / FC500: $y = 0,9654x + 0,43$ $R^2 = 0,9926$		
Diagramme des différences et/ou des rapports	 		
	2 déviants, hors des seuils décisionnels et sans impact sur la prise en charge clinique du patient		
	Aucun déviant.		

COMPARAISON DE METHODES : LT CD4 (µL) Applicable ☒ ; non applicable (à justifier) ☐			
Données bibliographiques	- GOSSEZ M. et al. "Evaluation of a novel automated volumetric flow cytometer for absolute CD4+ T lymphocyte quantitation". Cytometry B Clin Cytom. 2016 Jan 25. - Guide du logiciel du système Tetra AQUIOS, (Réf. B44253AB Avril 2015)		
Méthode précédente et appareil en miroir	Méthode précédente : FC500 (Beckman Coulter) Automate en miroir : AQUIOS CL, AY47058 (Beckman Coulter)		
Nombre de mesures	30		
Intervalle de comparaison	12 – 3267 LT CD4+ /µL		
Méthode d'exploitation des résultats	Régression linéaire (Pearson), Test de Bland Altman		
Equation de la droite de régression	AQUIOS AY47058 / FC500: $y = 0,9233x + 38,61$ $R^2 = 0,985$		
Diagramme des différences et/ou des rapports	 		
	1 déviant, hors des seuils décisionnels et sans impact sur la prise en charge clinique du patient		
	4 déviants, hors des seuils décisionnels et sans impact sur la prise en charge clinique du patient		

COMPARAISON DE METHODES : LT CD8 (%) Applicable ☒ ; non applicable (à justifier) ☐			
Données bibliographiques	- GOSSEZ M. et al. "Evaluation of a novel automated volumetric flow cytometer for absolute CD4+ T lymphocyte quantitation". Cytometry B Clin Cytom. 2016 Jan 25. - Guide du logiciel du système Tetra AQUIOS, (Réf. B44253AB Avril 2015)		
Méthode précédente et appareil en miroir	Méthode précédente : FC500 (Beckman Coulter) Automate en miroir : AQUIOS CL, AY47058 (Beckman Coulter)		
Nombre de mesures	30		
Intervalle de comparaison	10,7 – 64,1% LT CD8+		
Méthode d'exploitation des résultats	Régression linéaire (Pearson), Test de Bland Altman		

Equation de la droite de régression	AQIUOS AY47058 / FC500: $y = 0,9552x + 0,74$ $R^2 = 0,9863$	AQIUOS AY47058 / AQIUOS AY39049: $y = 0,9991x - 0,2$ $R^2 = 0,9896$	
Diagramme des différences et/ou des rapports			1 déviant, au niveau de la limite de suivi; aucun impact sur la prise en charge clinique du patient
Données bibliographiques	<p>COMPARAISON DE METHODES : LT CD8 (µL) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/></p> <p>- GOSSEZ M. et al. "Evaluation of a novel automated volumetric flow cytometer for absolute CD4+ T lymphocyte quantitation". Cytometry B Clin Cytom. 2016 Jan 25. - Guide du logiciel du système Tetra AQIUOS. (Réf. B44253AB Avril 2015)</p>		
Méthode précédente et appareil en miroir	Méthode précédente : FC500 (Beckman Coulter) Automate en miroir : AQIUOS CL, AY47058 (Beckman Coulter)		
Nombre de mesurés	30		
Intervalle de comparaison	100 – 1963 LT CD8+ /µL		
Méthode d'exploitation des résultats	Régression linéaire (Pearson), Test de Bland Altman		
Equation de la droite de régression	AQIUOS AY47058 / FC500: $y = 0,9488x + 24,69$ $R^2 = 0,988$	AQIUOS AY47058 / AQIUOS AY39049: $y = 1,0279x + 7,39$ $R^2 = 0,986$	
Diagramme des différences et/ou des rapports			Les niveaux hauts et bas de LT CD8 étant très proches, ainsi que les écart-types de reproductibilité du niveau haut étant très différents, des limites de suivi pertinentes n'ont pu être calculées.

Argumentaire de la conclusion :
Les limites de suivi ont été calculées sur la base de la fidélité intermédiaire de chaque méthode comparée et des niveaux de chaque COI utilisés.

Chaque déviant a été étudié : COI acceptables au moment des analyses, bons fenêtrages des différentes régions sur les graphes, pas de marquage non spécifique...
Les déviants sont tous hors des seuils décisionnels et sont sans impact sur la prise en charge clinique du patient

Les méthodes de numération des sous-populations lymphocytaires T par l'AQUIOS AY47058 et le FC500 sont considérées comme interchangeables, et les deux AQUIOS AY47058 et AY39049 considérés comme des automates en miroir.

ETENDUE DE MESURE (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH, ...) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>		
Limite de détection	Portée A : facultative En théorie, 1 cellule.	
Limite de quantification	<p>Résultats expérimentaux Pour un CV limite de 10% : 40 cellules/µL Pour un CV limite de 15% : 30 cellules/µL</p>	
Limite supérieure de linéarité	<p>- GOSSEZ M. et al. "Evaluation of a novel automated volumetric flow cytometer for absolute CD4+ T lymphocyte quantitation". Cytometry B Clin Cytom. 2016 Jan 25. LT CD4: 20-20000 /µL</p> <p>- Guide du logiciel du système Tetra AQIUOS. (Réf. B44253AB Avril 2015) LT CD4 : 35-5000 /µL</p>	<p>Résultats expérimentaux : Lymphocytes totaux: 25 000 /µL LT CD3 : 20 000 /µL LT CD4 : 10 000 /µL LT CD8 : 10 000 /µL</p>


Argumentaire de la conclusion :

Cf Annexe 2 pour les protocoles des essais de limite de quantification et limite supérieure de linéarité

Les résultats sont considérés comme conformes à l'état de l'art. Ils ont été pris en compte dans l'analyse et le rendu des résultats.

**Fiche type de vérification (portée A)
d'une méthode de biologie médicale**


LBMMS-CHU DE LYON
GROUPEMENT HOSPITALIER
EDOUARD HERRIOT
SERVICE D'IMMUNOLOGIE CELLULAIRE


Hospices Civils de Lyon

Hémolyse	<p>INTERFERENCES (étude expérimentale indispensable en portée B) réactifs cytométrie » AccrédiPack (Version 1.1 avril 2012). Les interférences et les limites analytiques de la technique sont également décrites dans le manuel d'utilisation AQUIOS CL (B44245AB, avril 2015 ; Chap.1 : « utilisation et fonctionnement – Limites »).</p> <ul style="list-style-type: none"> - Présence d'hématies non lysées. Une lyse incomplète est observée dans les cas suivants : pathologies telles que l'insuffisance rénale grave, précurseurs érythrocytaires nucléés, hémoglobinopathies, concentration protéique anormale. → L'utilisation des CD45 comme condition de contour pour les lymphocytes garantit que ni les GR ni les événements négatifs en CD45 ne figureront dans le contour d'intérêt des lymphocytes. - Patients traités par OKT3 - Utilisation de fluorescène lors d'exams d'angiographie en fluorescence (fonds d'œil) - Certains médicaments, anticoagulants, particules de graisses <p>Elles sont détectables lors de l'analyse cytométrique (stratégie de fenêtrage). Elles n'ont donc été pas vérifiées.</p>
Turbidité	
Bilirubine, ictere	

**Fiche type de vérification (portée A)
d'une méthode de biologie médicale**

LBMMS-CHU DE LYON
GROUPEMENT HOSPITALIER
EDOUARD HERRIOT
SERVICE D'IMMUNOLOGIE CELLULAIRE



Hospices Civils de Lyon

CONTAMINATION Ly CD3 (µL) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Inter échantillon	Les valeurs de LT CD3+ étaient similaires dans les deux échantillons, empêchant d'étudier la contamination inter-échantillon de ce paramètre. <i>Cf résultat pour les LT CD4+</i>
Inter réactif	10 tests Tétra-1 puis 10 tests Tétra Combo, comparaison des moyennes de LT CD3 issues des deux séries. P = 0,529 ; pas de différence significative.

CONTAMINATION Ly CD3 (%) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Inter échantillon	Les % de LT CD3+ étaient similaires dans les deux échantillons, empêchant d'étudier la contamination inter-échantillon de ce paramètre. <i>Cf résultat pour les LT CD4+</i>
Inter réactif	10 tests Tétra-1 puis 10 tests Tétra Combo, comparaison des moyennes de Ly CD3 issues des deux séries. P = 0,241 ; pas de différence significative.

CONTAMINATION LT CD4 (%) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Inter échantillon	Essai de surcharge : contamination d'un échantillon de 3% LT CD4 par un échantillon de 77% LT CD4. Taux de contamination = -0,1% Critère de conformité selon Student respecté.
Inter réactif	10 tests Tétra-1 puis 10 tests Tétra Combo, comparaison des moyennes de LT CD4 issues des deux séries. P = 0,149 ; pas de différence significative.

CONTAMINATION LT CD4 (µL) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Inter échantillon	Essai de surcharge : contamination d'un échantillon de 1492 LT CD4/µL par un échantillon de 52 LT CD4/µL. Taux de contamination = -0,5% Critère de conformité selon Student respecté.
Inter réactif	10 tests Tétra-1 puis 10 tests Tétra Combo, comparaison des moyennes de LT CD4+ issues des deux séries. P = 0,069 ; pas de différence significative


 Hospices Civils de Lyon	Fiche type de vérification (portée A) d'une méthode de biologie médicale	LBMMS-CHU DE LYON GROUPEMENT HOSPITALIER EDOUARD HERRIOT SERVICE D'IMMUNOLOGIE CELLULAIRE
--	---	---

CONTAMINATION LT CD8 (%) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	Essai de surcharge : contamination d'un échantillon de 18% LT CD8 par un échantillon de 72% LT CD8. Taux de contamination = 1,2% Critère de conformité selon Student respecté.
Inter échantillon	10 tests Tétra-1 puis 10 tests Tétra Combo, comparaison des moyennes de LT CD8 issues des deux séries. P = 0,684 ; pas de différence significative.
Inter réactif	
CONTAMINATION LT CD8 (µL) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	Essai de surcharge : contamination d'un échantillon de 347 LT CD8/µL par un échantillon de 1203 LT CD8/µL. Taux de contamination = 1,8% Critère de conformité selon Student respecté.
Inter échantillon	
Inter réactif	10 tests Tétra-1 puis 10 tests Tétra Combo, comparaison des moyennes de LT CD8 issues des deux séries. P = 0,545 ; pas de différence significative.

Argumentaire de la conclusion :

Les résultats de contamination pour la numération des sous-populations lymphocytaires T sont considérés comme conformes à l'état de l'art.

ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	La robustesse et fiabilité des réactifs n'ont pas été vérifiées car les réactifs utilisés sont du fournisseur, marquée CE IVD, utilisés très rapidement et selon ses recommandations. Chevauchement des nouveaux lots de CQI avec les anciens avant de les utiliser, afin de pouvoir détecter toute instabilité des réactifs utilisés si un CQI est mauvais. Les nouveaux réactifs sont mis à bord des automatés avant la fin des anciens afin de les tester et de pouvoir en commander de nouveau dans le cas où un problème serait décelé.
Paramètres sensibles testés (t°, pH, position sur un support, ...)	
Stabilité des réactifs après ouverture, embarqués, ...	

 Hospices Civils de Lyon	Fiche type de vérification (portée A) d'une méthode de biologie médicale	LBMMS-CHU DE LYON GROUPEMENT HOSPITALIER EDOUARD HERRIOT SERVICE D'IMMUNOLOGIE CELLULAIRE
---	---	---

INTERVALLES de REFERENCE Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	Valeurs pédiatriques : Comans-Bitters et al. 1997 et Shearer et al. 2003 ; Valeurs adultes : Bisset et al. 2004
Valeurs de référence	Lors de la validation de méthode du FC500, les valeurs de références adultes ont été vérifiées sur 22 individus du laboratoire et des donneurs de l'EFS. Les résultats étaient les suivants : CD3 % : 75 ± 5 ; aucune valeur n'est hors de l'intervalle de référence choisi. CD3 /µL : 1216 ± 413 ; 2 valeurs sont hors de l'intervalle de référence choisi (2125 /µL et 1957 /µL). CD4 % : 46 ± 4 ; aucune valeur n'est hors de l'intervalle de référence choisi. CD4 /µL : 742 ± 251 ; 1 valeur est hors de l'intervalle de référence choisi (1360 /µL). CD8 % : 27 ± 4 ; aucune valeur n'est hors de l'intervalle de référence choisi. CD8 /µL : 437 ± 157 ; aucune valeur n'est hors de l'intervalle de référence choisi. Ayant montré que la méthode de numération des différentes sous-populations lymphocytaires T par le cytomètre FC500 est interchangeable et équivalente en terme de performance analytique à celle de l'AQUIOS CL AY39049, nous considérons que les valeurs de référence sont applicables aux résultats de cette nouvelle méthode.

DECLARATION d'APTITUDE

Conclusion : méthode conforme utilisée à partir du 27/01/2016

Autorisée par : Ch. MALCOUS

Signature



ANNEXE 1: CALCUL DE L'ECHELLE DE CRITICITE POUR LA MAITRISE DES RISQUES, EN RESPECT DES CONSIGNES DE CALCUL DE LA PROCEDURE MU-ANA-PG-001-01

ECHANTILLON	Fréquence	Gravité	Déteçtabilité	TOTAL
IDENTITE				
Identité	1	10	6	60
Préparation du patient	1	3	10	30
Type de contenants	1	6	1	6
Nature et volume de l'échantillon	1	6	1	6
Délai et température avant traitement analytique	3	10	1	30
Interférence: caillots	1	6	1	6
MILIEU				
Conditions de conservation des échantillons	1	10	3	30
Conditions de conservation et d'utilisation des réactifs	1	3	3	9
Exigences environnementales pour le matériel ou l'opérateur	1	3	1	3
MATERIEL (Equipement)				
Surveillance des dérives	1	10	3	30
Contamination	1	10	6	60
Informatique embarquée	1	3	6	18
MATERIEL (Réactifs)				
Conservation et conditions d'utilisation	1	3	1	3
Gestion des stocks	1	6	1	6
METHODE				
Limite de la méthode	3	10	1	30
Cause d'incertitude de mesure	1	10	3	30
MAIN D'ŒUVRE				
Compétence et maintien de compétence du personnel	1	10	1	10

Fréquence (1 = très peu fréquent, 3 = peu fréquent, 6 = fréquent, 10 = très fréquent),

Gravité (1 = pas d'impact sur le résultat, 3 = peu d'impact, 6 = résultat impossible à donner, 10 = résultat erroné),

Déteçtabilité (1 = toujours détecté, 3 = facilement détecté, 6 = détection possible non infallible, 10 = indétectable).

ANNEXE 2: PROTOCOLES DES ESSAIS DE LIMITE DE QUANTIFICATION ET LIMITE SUPERIEURE DE LINEARITE

Limite de quantification

A partir d'un échantillon patient (0160238177) présentant une faible numération de LT CD4 (68/μL), dilution en série :

- Tube 1 = 68 CD4/μL
- Tube 2 = 45 CD4/μL (dilution au 2/3 du tube 1)
- Tube 3 = 34 CD4/μL (dilution au 1/2 du tube 1)
- Tube 4 = 23 CD4/μL (dilution au 1/2 du tube 2)
- Tube 5 = 17 CD4/μL (dilution au 1/2 du tube 3)
- Tube 6 = 11.5 CD4/μL (dilution au 1/2 du tube 4)

Numération 10 fois de chaque concentration pour pouvoir calculer un CV et une moyenne à chaque fois.

La limite de quantification correspond à la plus petite concentration associée à un CV < 10% (Tracer la courbe d'Honwitz).

Limite supérieure de linéarité

Centrifugation (3min à 300g) de 24 échantillons de patients puis élimination du plasma.

Pool des culots et dilution au 1/2 par une solution de Hanks 1X.

Dépôts sur Ficoll pour séparer les cellules et récupérer seulement les PBMCs

Dilution dans 1 volume de Hanks 1X puis centrifugation 10min à 2000rpm.

Élimination du surnageant puis étape précédente répétée 2 fois.

Reprise du culot dans 2mL de SAB (Tube 1).

Dilutions successives et analyse de chaque concentration en double sur l'AQUIOS CL.

- Tube 1 = pur
- Tube 2 = dilution au 5/6
- Tube 3 = dilution au 2/3
- Tube 4 = dilution au 5/8
- Tube 5 = dilution au 1/2
- Tube 6 = dilution au 5/12
- Tube 7 = dilution au 1/3
- Tube 8 = dilution au 1/6
- Tube 9 = dilution au 1/12
- Tube 10 = dilution au 1/24

Un bleach est réalisé entre chaque passage des fortes concentrations en PBMCs.

Un graphique des dilutions en fonction du résultat moyen de la numération de lymphocytes sert à déterminer la limite de linéarité.

ANNEXE 2 : NUMERATION DES LYMPHOCYTES T EN VALEUR
ABSOLUE PAR LE CYTOMETRE EN FLUX AQUIOS CL
(Beckman Coulter)

NUMERATION DES LYMPHOCYTES T EN VALEUR ABSOLUE PAR LE CYTOMETRE EN FLUX AQUIOS CL (Beckman Coulter)

1 Objet

Ce document décrit les principes d'utilisation de l'AQUIOS CL (Beckman Coulter) pour la numération des lymphocytes T en valeur absolue.

2 Champs d'application

Cette procédure s'applique à l'analyse des lymphocytes T par les AQUIOS CL AY47058 (Aquios 1) et AY39049 (Aquios 2) par le personnel du secteur d'Immunologie cellulaire utilisant ce système.

3 Responsabilités

La gestion de cette analyse est sous la responsabilité des Dr F. Poitevin-Later et C. Malcus, ainsi que des techniciens et internes habilités.

4 Définitions et abréviations

CQI = Contrôle de Qualité Interne

ECD = Electron Coupled Dye (= PE-Texas Red)

EV = Volume Electronique

FITC = IsoThioCyanate de Fluorescéine

FS = Diffusion axiale

GR = Globules Rouges

LIS = Laboratory Informatic System (= LPM, Laboratory Production Manager)

PC5 = Phycoérythrine couplé à la Cyanine 5

PE = Phycoérythrine

PMT = Tube photomultiplicateur

RD1 = Phycoérythrine

SS = Diffusion Latérale

5 Contenu

5.1 Présentation de l'AQUIOS CL

L'AQUIOS CL permet l'identification et la mesure simultanées des pourcentages et des valeurs absolues des populations de lymphocytes totaux, de lymphocytes T CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+ et du rapport CD4/CD8+.

Il indique également la numération des leucocytes, les populations CD3+CD4-CD8-, CD3+CD4+CD8+ et la différence entre les CD3+ et la somme des CD4+ et CD8+.

5.1.1 Principaux composants de l'AQUIOS CL

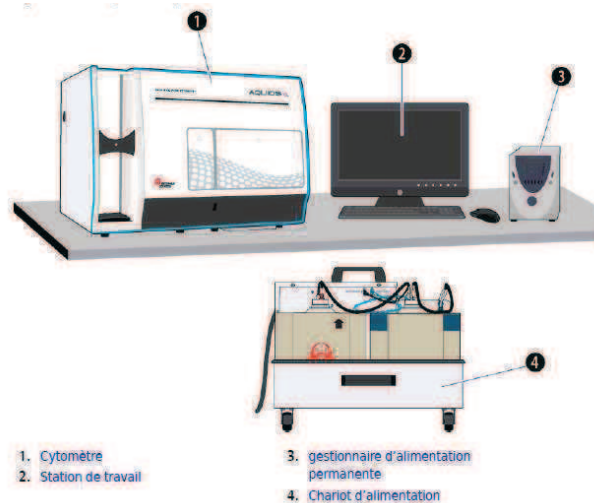


Figure 1. Composants de l'AQUIOS CL

Maintenir la **température de la pièce entre 18 °C et 26 °C**. Pour tirer profit de performances optimales, la température ambiante **ne doit pas fluctuer plus de $\pm 2,8$ °C** lorsque le cytomètre est utilisé.

5.1.2 Principe de mesure

Le cytomètre en flux AQUIOS CL est un système simple plateforme totalement automatisé qui permet une numération des lymphocytes T par analyse volumétrique, sans utilisation de billes calibrées. L'AQUIOS CL peut effectuer des analyses multiparamétriques en utilisant un **laser solide 488 nm**, **quatre canaux de fluorescence** (Fig.2), une détection de diffusion axiale (**FS**) et de diffusion orthogonale (**SS**), ainsi que des mesures **d'amplitudes volumétriques** (EV = volume électronique). Le panel d'anticorps monoclonaux Tetra-1 est composé de CD45-FITC / CD4-PE / CD8-ECD / CD3-PC5.

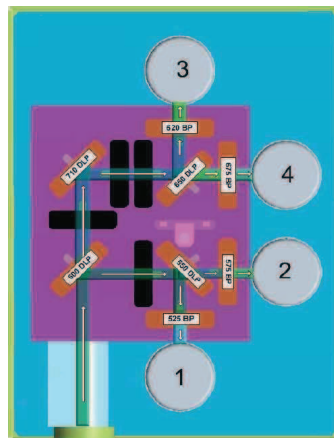


Figure 2. Filtrage optique

Le détecteur de volume électronique mesure l'impédance électrique de la cellule. La cellule de mesure est remplie de liquide de gaine conducteur et contient deux électrodes qui créent un léger courant à travers l'ouverture de la cellule de mesure. Lorsqu'une cellule est aspirée dans le canal de la cellule de mesure, le volume de la cellule déplace une quantité équivalente de solution électrolyte. Ce volume est mesuré sous forme d'impulsions de tension et est appelé volume électronique. Les mesures de volume électronique sont basées sur le principe Coulter.

5.1.3 Réactifs


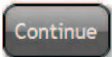
Réactifs	Volume
AQUIOS Tetra-1 panel	50 tests par flacon
Liquide de gainage AQUIOS, IVD	Cubitainer de 10 L
Agent de nettoyage AQUIOS, IVD	Flacon de 500 mL
Solution d'hypochlorite de sodium AQUIOS, IVD	4 flacons de 50 mL
Coffret de réactifs de lyse AQUIOS, IVD	Réactif de lyse A : 1 flacon de 38 mL Réactif de lyse B : 1 flacon de 15 mL
Cellules IMMUNOTROL AQUIOS, IVD	2 flacons de 3 mL
Cellules IMMUNOTROL AQUIOS Low, IVD	2 flacons de 3 mL
Plateau de puits profonds AQUIOS, IVD	Carton de 50 (plaque de 96 puits)

Tableau 1. Consommables de l'AQUIOS CL

Les réactifs AQUIOS utilisent une identité unique de flashcode pour le suivi de la date de péremption, de la date de validité après ouverture, des numéros de lot et de contenant. La consommation de réactifs et l'utilisation du plateau sont surveillées par le système pendant le traitement des échantillons. Les **misés à jour** de nouveaux réactifs, de l'utilisation du plateau, de la disponibilité du réactif et de son emplacement sont affichées **après l'ouverture et la fermeture de la porte des réactifs**.

ATTENTION : Le suivi de la date de péremption et du délai d'utilisation des réactifs de gaine et des flacons d'agent de nettoyage AQUIOS est manuel.

5.2 Mise en route de l'AQUIOS CL

- Allumer le cytomètre.
- Mettre en route le chariot d'alimentation.
- Allumer la station de travail ; Se connecter à la session Windows en tant **qu'AqUser (mdp = aquser)**.
- Ouvrir le logiciel de l'Aquios et s'identifier en tant qu'utilisateur.
- Ouvrir la porte des réactifs en appuyant une fois fermement sur la partie supérieure médiane de la porte.
!!! Attention a ne pas inverser les réactifs des 2 Aquios.
- Sortir le carrousel dédié aux **flacons d'anticorps du panel Tétra 1 AQUIOS** du réfrigérateur. Avant d'y placer un nouveau flacon d'anticorps, **remplacer les bouchons** d'expédition (solides et non perforables) par les bouchons Septa fournis dans l'emballage du réactif. Les bouchons Septa doivent être manipulés avec soin pour éviter toute contamination. Replacer le carrousel sur la plate-forme du compartiment des réactifs en faisant coïncider les deux encoches.
- **Enlever les bouchons** des flacons de **réactif de lyse A et B AQUIOS** (ne pas les jeter) et les placer sur le support de plateau dédié du compartiment des réactifs. Vérifiez que les **étiquettes flashcode** soient bien tournées vers l'extérieur.
- Ajouter **2 mL de solution d'hypochlorite de sodium AQUIOS** à un tube de 12 x 75 mm et le placer dans la position désignée sur le support de plateau.
- Insérer un **plateau de 96 puits** profonds; veiller à ce que le **puits A1** du plateau se trouve à proximité de **l'emplacement A1** du support de plateau et que l'étiquette flashcode soit tournée vers l'extérieur.
- Fermer la porte des réactifs.
- Sélectionner  dans la barre d'état.
- Le message "*Please ensure the non-piercable reagent caps have been removed or replaced as instructed*" s'affiche; cliquer sur  ; le cycle de démarrage s'exécute.

- La boîte de dialogue *Reagent Levels* (Niveaux des réactifs) s'affiche (Fig 3):
 - S'assurer que les niveaux de réactif correspondent au nombre d'échantillons à traiter. Si nécessaire, des flacons supplémentaires de réactifs doivent être ajoutés avant le début du traitement de la charge de travail.
 - **Flacon d'anticorps Tétra 1 AQUIOS : 50 tests**
 - **Réactif de lyse : 100 tests**

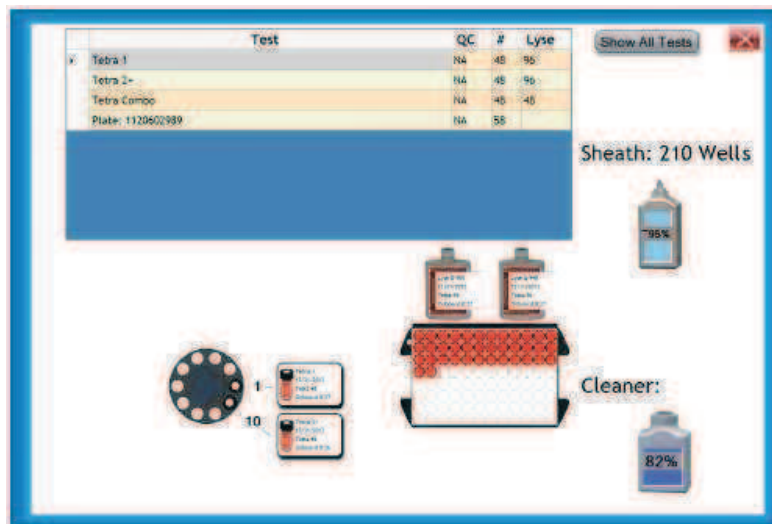


Figure 3. Écran de résumé des tests de niveaux des réactifs

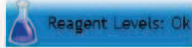
5.3 Changement des réactifs


ATTENTION ! Les deux automates AQUIOS CL ne sont pas en réseau +++

→ Les réactifs ne peuvent pas être déplacés d'un appareil à l'autre

Ex : Si un flacon d'anticorps monoclonal a encore 10 tests restants sur l'Aquios 1 et qu'il est déplacé vers l'Aquios 2, ce dernier pensera que le flacon est plein (50 tests restants dans le flacon) car il est inconnu dans la base de données de cet automate, et continuera à aspirer dans ce flacon, même s'il est vide.

- Veiller à placer le carrousel d'anticorps monoclonaux sur son automate dédié ; se conférer à **l'étiquette du carrousel**.
- A l'ouverture des réactifs de lyse, **noter sur le flacon** l'automate sur lequel il va être disposé.

Pour vérifier la disponibilité des réactifs, sélectionnez  dans la barre d'état. L'écran de résumé des tests de niveaux des réactifs s'affiche (Fig.3).

- Les réactifs suivants sont **automatiquement lus** une fois chargés sur l'automate :
 - Panels d'anticorps monoclonaux AQUIOS
 - Réactifs de lyse AQUIOS A et B
 - Plateau de puits profonds AQUIOS
- **Lire le flashcode** lors du changement des réactifs suivants en appuyant sur 
 - Liquide de gaine AQUIOS
 - Agent de nettoyage AQUIOS
- Le tube d'hypochlorite de sodium ne nécessite pas de code-barres.
- Puis, **pour tous les réactifs y compris liquide de gaine et agent de nettoyage, cliquer sur « Open Reagent Door »** (Ouvrir la porte des réactifs) dans la barre d'état et ouvrir la porte des réactifs.
- Remplacer les réactifs.
- Fermez la porte des réactifs : les réactifs et plateau sont lus, les nouveaux flashcodes scannés sont pris en compte dans la base de données de l'AQUIOS CL.

- L'écran « *Reagent levels* » apparaît ; fermer et retourner à l'écran principal.

5.4 Contrôles de qualité internes (CQI)

Se conformer aux documents :

- HI-ANA-DE-008
- HI-ANA-DE-009
- HI-ANA-DE-010
- HI-ANA-DE-011
- HI-ANA-DE-023
- HI-ANA-DE-025

Il existe deux niveaux de CQI

- **AQUIOS IMMUNO-TROL Cells** (ref B23535)
- **AQUIOS IMMUNO-TROL Low Cells** (ref B25700)

Les CQI sont à passer 2 fois par jour : 1 niveau le matin avant de lancer la série d'échantillons patient et **le deuxième niveau à la fin de la journée**, avant d'éteindre l'automate.

- L'ordre de passage des CQI change chaque semaine
- Cf Planning de passage des CQI : **HI-ANA-MT-025**

Chaque flacon peut être utilisé **15 fois (Tétra-1) avec le bouchon ; au-delà, il faut retirer le bouchon** et passer le CQI en manuel (**5 fois de plus**) sous peine de boucher l'aiguille d'aspiration par des petits débris de caoutchouc provenant du bouchon.

→ **Bien noter la date d'ouverture sur le tube+++**

Avant d'utiliser un nouveau lot de CQI, les informations reliée à ce numéro de lot doivent être enregistrées dans le système : **scanner la feuille de résultat de contrôle** en appuyant sur



Passer un CQI :

- **Amener le CQI à température ambiante, en l'agitant continuellement pendant 15 min environ**
- Cliquer sur l'onglet « *Requests* »
- La fenêtre « *Add request* » s'ouvre ; cliquer sur le +
- Sélectionner le test à réaliser dans *Test*
- Cliquer sur l'icône du code-barres dans *Sample ID* ; scanner le tube de CQI.
 - Le niveau de CQI et son lot s'affichent automatiquement.
- Cliquer sur OK puis charger la cassette sur l'automate
- Ranger les cassettes contenant les CQI au réfrigérateur

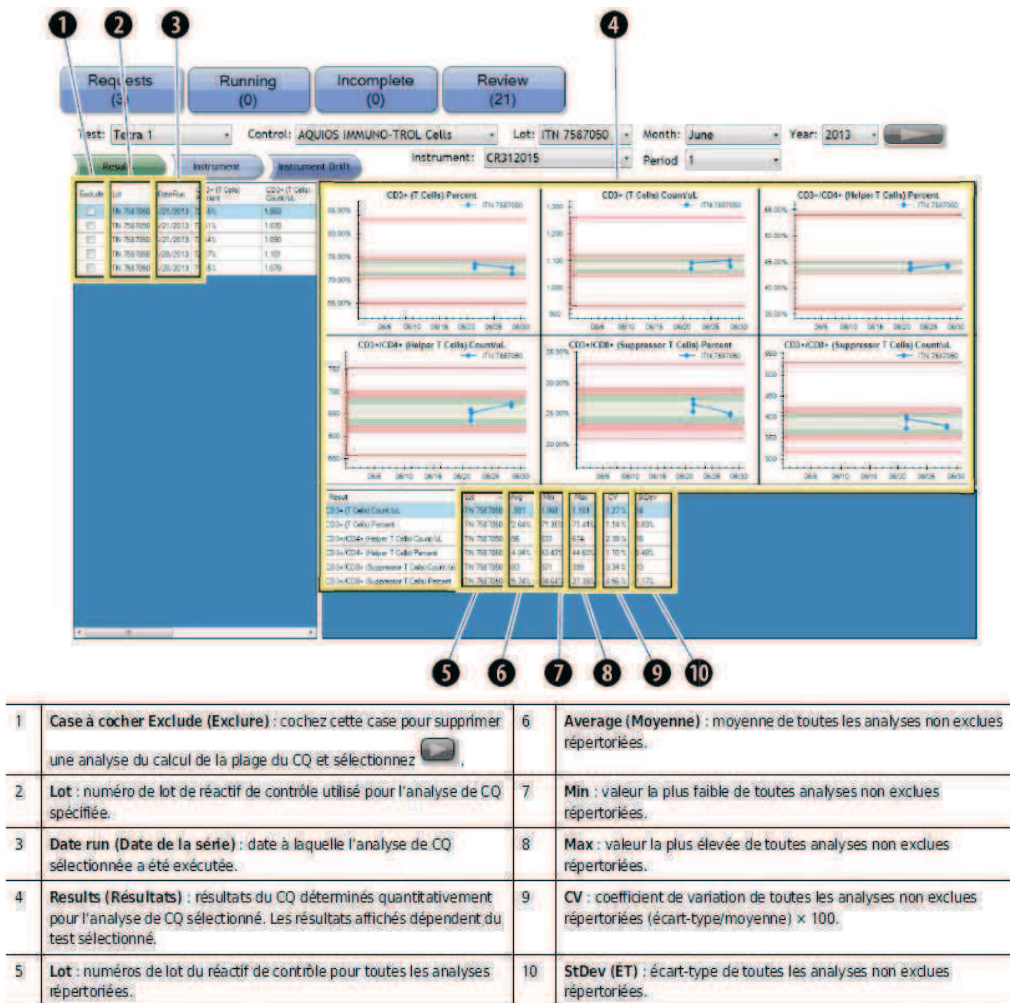
Le système vérifie automatiquement la stabilité électronique, fluide et optique de l'instrument.

Les données de contrôle du réactif sont ajoutées aux graphes de Levey-Jennings des écrans CQ : *Résultats, instrument* et *dérive de l'instrument drift*.

Un contrôle de compensation est effectué automatiquement lors de l'analyse des réactifs de contrôle. Les messages **Compensation Passed** (Succès de la compensation) ou **Compensation Failed** (Échec de la compensation) s'affichent alors dans le champ *Status* (État) des résultats d'analyse de contrôle.

5.4.1 Onglet Results

Permet le suivi des modifications au fil du temps pour les valeurs absolues (cellules/ μ L) et les pourcentages de cellules AQUIOS IMMUNO-TROL Cells et AQUIOS IMMUNO-TROL Low Cells. Ces données reflètent la précision et la stabilité de l'instrument au cours de la période spécifiée. Ces résultats correspondent à ceux des valeurs rendues pour les patients.



NOTE Les statistiques sommaires sont répertoriées en bas des graphes. Utiliser la barre de défilement verticale pour accéder à toutes les statistiques.

Figure 4. Onglet Résultats de l'écran CQ

5.4.2 Onglet Instrument

Les graphes Levey-Jennings de l'écran Instrument conservent le suivi au fil du temps du quotient de séparation des pics positifs et négatifs pour les résultats de CQI.

Le quotient de séparation (SQ) est un indicateur de la sensibilité relative et de la résolution. Il peut être utilisé comme un indice permettant de connaître le niveau de séparation de deux populations différentes

- échantillons vs débris
- lymphocytes vs monocytes
- population CD3+ vs CD3-
- etc...

Plus le quotient de séparation est élevé, meilleure est la séparation.

Plage numérique	Signification
3 à 10	Séparation excellente de sorte que plus de 99 % des points de données des populations sont distincts.
0 à 3	Bonne séparation supérieure à 2 ET ; en d'autres termes, environ 95 % des points de données des populations sont distincts.
0	Point auquel les populations des 2 ET se touchent ; environ 5 % des points de données des populations se chevauchent.
-3 à 0	Séparation modérée pour laquelle plus de 5 % des points de données des populations se chevauchent.
<-3	Séparation médiocre qui s'aggrave en fonction de la diminution des nombres.

Figure 3.10 Quotient de séparation = 4,7 (excellente séparation)

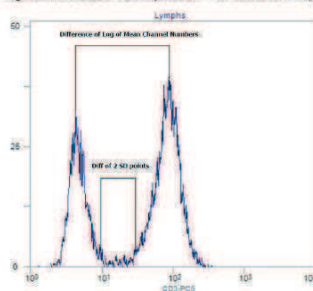


Figure 3.12 Quotient de séparation = -0,79 (séparation modérée)

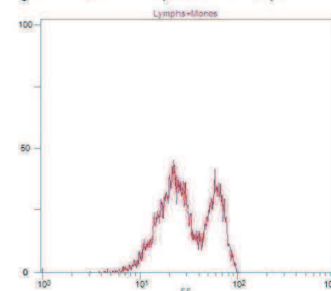


Figure 3.13 Quotient de séparation = -4,7 (séparation médiocre)

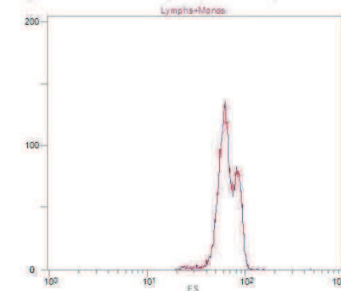


Figure 5. Signification et illustration de différents quotients de séparation

Seuils d'acceptation du SQ :

- CD3 separation : **> 3**
- CD4 separation : **> 3**
- CD8 separation : **> 3**
- CD45 Lymph/High SS Cells separation : Cf bornes définies pour chaque lot de CQI
- SS Lymph/High SS Cells separation : Cf bornes définies pour chaque lot de CQI
- FS Lymph/High SS Cells separation : Cf bornes définies pour chaque lot de CQI

5.4.3 Onglet Instrument drift

La dérive de l'instrument représente l'évolution de l'intensité de la fluorescence sur une période donnée. Elle est mesurée par la fluctuation de moyenne d'intensité de fluorescence (MFI, position du pic sur l'axe) du pic positif de la population étudiée.

5.4.4 Validation des CQI

Cf Procédure de validation des CQI : **HI-ANA-MT-023**

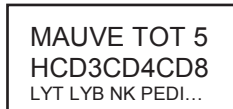
RQ : on peut imprimer, créer un pdf ou exporter en format csv les résultats de CQI.

5.5 Analyse des échantillons

5.5.1 Avant chargement des échantillons

- Conserver les échantillons dans les tubes de prélèvement sanguin à température ambiante, soit entre 18 °C et 26 °C. **Ne pas réfrigérer les échantillons.**

- S'assurer que chaque échantillon de sang total soit **analysé dans les 24 heures** suivant le prélèvement. Si l'échantillon a été prélevé depuis plus de 24 heures, le rejeter.
- Après enregistrement de la demande d'analyse, coller sur le tube de prélèvement sanguin une **étiquette à code-barres**:
 - **Vérifier la concordance de l'identité patient entre l'étiquette PASTEL et l'étiquette d'analyse +++**
 - Choisir l'étiquette à code-barres sur laquelle figure la liste des analyses à effectuer :



- S'assurer que chaque tube d'échantillon de patient à charger soit conforme au **volume minimum d'exécution**.

Taille du tube d'échantillon	Volume minimum
13 x 75 mm	650 µL
13 x 100 mm	650 µL
16 x 100 mm	1000 µL
10,25 x 50 mm	650 µL
Sarstedt 1,7 mL	650 µL

Tableau 2. Volume sanguin minimum requis par tube d'échantillon

- Avant de lancer une analyse et donc de charger les tubes sur l'AQUIOS CL, **les résultats des CQI** doivent avoir été **vérifiées et validés**.


5.5.2 Chargement des tubes

Les tubes d'échantillons peuvent être chargés dans des cassettes qui sont prises en charge par l'autochargeur ou dans le chargeur à tube unique.

- Le chargeur à tube unique fonctionne comme un chargeur d'échantillons urgents. L'échantillon chargé sur le chargeur à tube unique est traité avant les tubes d'échantillon chargés dans la cassette de l'autochargeur.

Les microtubes pédiatriques sont à charger sur le chargeur à tube unique.

Les CQI au-delà de 15 passages sont à charger sur le chargeur à tube unique.

- **Bien agiter le tube** de prélèvement avant chargement.
 - Appuyer sur l'onglet 
 - Le message « *Please press on the single tube door, and then wait for the system to release it* » apparaît ; Appuyer sur la porte du chargeur à tube unique et attendre que l'automate la libère.
 - La fenêtre « *Sample Information* » apparaît
 - Si l'échantillon n'a pas de code-barres, il peut être identifier manuellement par « *Sample ID* » ; sinon, scanner le code-barres.
 - Sélectionner Tétra-1 dans *Test*
 - Les tubes peuvent être chargés avec le bouchon si celui-ci est **perforable**, **sinon penser à enlever le bouchon+++**
- Les échantillons chargés dans une cassette sur l'autochargeur nécessitent un **code-barres**. L'autochargeur a une capacité de chargement en continu pouvant atteindre 40 échantillons à la fois, soit 8 cassettes. Les échantillons sont traités automatiquement selon la position de la cassette, de bas en haut, et selon la position de l'échantillon dans la cassette, de 1 à 5.



Charger la cassette en mettant le flashcode vers le fond et le bouchon du tube vers soi.

5.5.3 Processus analytique

PRÉPARATION	INCUBATION	LYSE	ANALYSE
<ol style="list-style-type: none"> 1. L'utilisateur charge l'échantillon^a. 2. Le SANG est mélangé et aspiré du tube de prélèvement. 3. Le SANG est distribué dans un puits de plateau de microtitration. 4. L'ANTICORPS est ajouté dans le puits. 5. La solution est mélangée. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Quinze minutes environ. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Le RÉACTIF DE LYSE A est ajouté dans le puits. 2. La solution est mélangée. 3. Le RÉACTIF DE LYSE B est ajouté dans le puits. 4. La solution est mélangée. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. La solution est mélangée. 2. L'échantillon est aspiré. 3. L'échantillon est analysé.

Tableau 3. Processus analytique

Les demandes d'analyse sont consultables dans l'**onglet Requests de l'écran d'analyse** (Fig.6) ; à cette étape, les demandes peuvent être modifiées, dupliquées ou supprimées.

Après chargement de l'échantillon :

- **140µL** de sang du tube de prélèvement sont aspirés.
- Puis, **43 µL** de sang total sont déposés dans un puit de la plaque et colorés avec **13 µL** de réactif d'anticorps monoclonaux du panel Tetra-1.
- Incubation de 15 min.
- Le sang est lysé à l'aide de **335 µL** de réactif de lyse A, mélangé, puis de **100 µL** de réactif de lyse B
- Incubation de 2 min avec la lyse
- Analyse de l'échantillon

Le temps entre le chargement d'un échantillon de sang et le résultat pour le premier échantillon est d'environ **20 minutes**. Les résultats d'échantillon suivants sont rapportés **toutes les deux minutes** environ.

L'**onglet Running de l'écran d'analyse** (Fig. 6) suit les échantillons en cours de traitement par le cytomètre. Le processus analytique de l'échantillon s'affiche à l'écran (*Run Status*) alors que l'échantillon passe d'une étape à l'autre. La partie *Details* de l'écran permet de visualiser les spécificités de chaque étape, notamment le minutage.



Figure 6. Ecran d'analyse

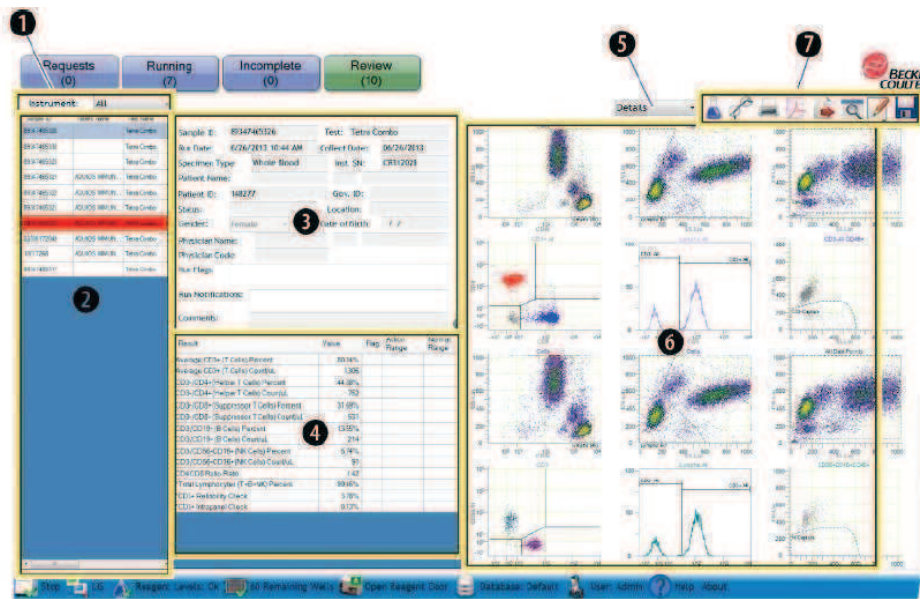
5.5.4 Analyses incomplètes

Dans l'onglet **Incomplete** de l'écran d'analyse (Fig. 6) apparaissent les échantillons ayant rencontré des problèmes :

- *User interruption* (Interruption par l'utilisateur) : un échantillon a été annulé par un utilisateur sur l'écran d'analyse
- *No barcode* (Aucun code-barres) : détection d'un tube/cassette dont le code-barres est manquant, mal placé ou endommagé
- *No request* (Aucune demande) : un tube avec code-barres n'ayant pas fait l'objet d'une demande d'analyse a été détecté dans une cassette tandis que le paramètre de Test par défaut est désactivé
- *Insufficient reagents* (Quantité insuffisante de réactifs) : impossible d'effectuer l'analyse d'un échantillon, car la quantité de réactifs requis est insuffisante
- *System Stopped* (Système à l'arrêt) : le système s'est arrêté en raison d'une erreur.
- *Duplicate Sample ID* (ID d'échantillon en double) : une demande de test LIS avec un ID d'échantillon identique (mais des informations sur le patient différentes) est reçue.
- *Panne de courant* : les tubes en cours de traitement peuvent également apparaître sur l'écran des analyses incomplètes.

5.5.5 Révisions des données

L'écran **Review** de l'écran d'analyse (Fig. 7) affiche les analyses d'échantillons déjà effectuées et en attente d'examen ou de transmission.



1. Désignation de l'instrument
2. Liste des analyses déjà effectuées
3. Zone d'informations relatives aux ID échantillon et aux analyses
4. Zone du tableau de résultats
5. Choix des options de graphiques (liste déroulante)
6. Affichage des graphiques sélectionné
7. Boîte à outils

Figure 7. Ecran de révisions des données

Quatre options de graphiques prédéfinies sont disponibles: **histogrammes**, **graphes biparamétriques**, **détails** ou **résultats**. Ces écrans permettent d'examiner ou de modifier les régions, les contours d'intérêt et les informations relatives à la compensation ou aux patients et d'enregistrer les modifications avant la transmission des résultats au SIL.

Alarmes et notifications :

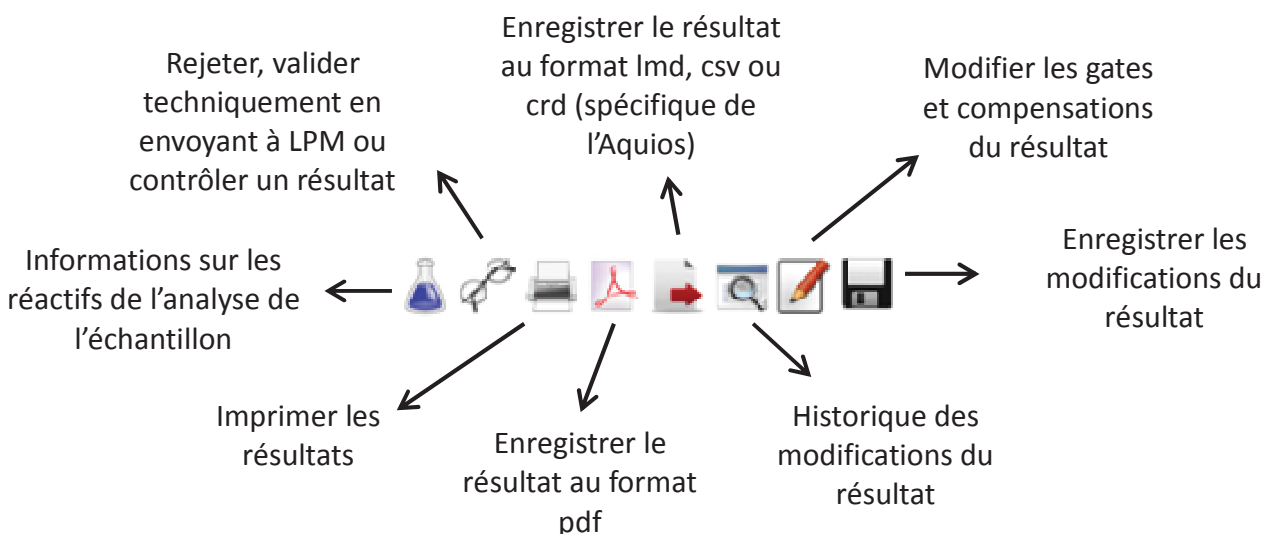
Tout test qui a généré une ou plusieurs **notifications** ou a été examiné et **modifié** au préalable, mais pas publié, est surligné en **orange**.

Tout test qui a généré une ou plusieurs **alarmes** est surligné en **rouge**.

Les échantillons non surlignés ne comportent ni alarme ni notification.

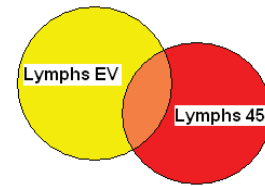
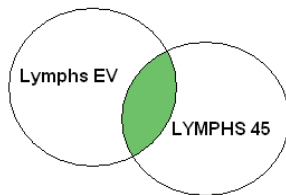
Cf Annexe 1 « *Prise en charge des résultats avec Alarme* » et Annexe 2 « *Prise en charge des résultats avec Notification* ».

La boîte à outils



Stratégie de gating

- Un graphe biparamétrique FS/SS définit la région « **Cells** » (Fig.8A) : exclusion des débris cellulaires ; ce sont tous les éléments dont le signal en FS est supérieur au discriminant et/ou le signal de CD45 est supérieur au discriminant.
- A partir de Cells :
 - o Région « **Lymphs EV** » sur le graphe biparamétrique EV/SS (Fig. 8B)
 - o Région « **Lymphs 45** » sur le graphe biparamétrique SS/CD45 (Fig. 8C)
 - La **pureté** des lymphocytes est définie par la région **Lymphs** :
Lymphs EV **ET** Lymphs 45
 - Le **recouvrement** des lymphocytes est défini par la région **Lymphs all** :
Lymphs EV **OU** Lymphs 45



En vert : les cellules sont considérées comme des lymphocytes si elles **appartiennent à la fois** aux 2 régions Lymphs EV et Lymphs 45

- ⇒ **Pureté +++** car les monocytes seront **exclus par une des deux régions**
- ⇒ Par contre, on perd des lymphocytes qui ne seraient que dans une seule des deux régions = **mauvais recouvrement**

Les cellules sont considérées comme des lymphocytes si elles sont présentes **dans au moins une des régions** Lymphs EV ou Lymphs 45

- ⇒ **Recouvrement +++** car on ne perd **aucun lymphocyte**
- ⇒ Par contre, la **pureté est beaucoup moins bonne** car des monocytes par exemple peuvent avoir été inclus dans l'un ou l'autre des régions et seront comptés comme lymphocytes

- A partir de la région Lymphs all (recouvrement), on définit les lymphocytes CD3+ (graphe monoparamétrique CD3, Fig 8D) appelée **CD3+ all**
- A partir des Lymphocytes CD3+ all, un graphe biparamétrique CD4/CD8 sert à définir les **LT CD4+** et **LT CD8+** (Fig 8E)

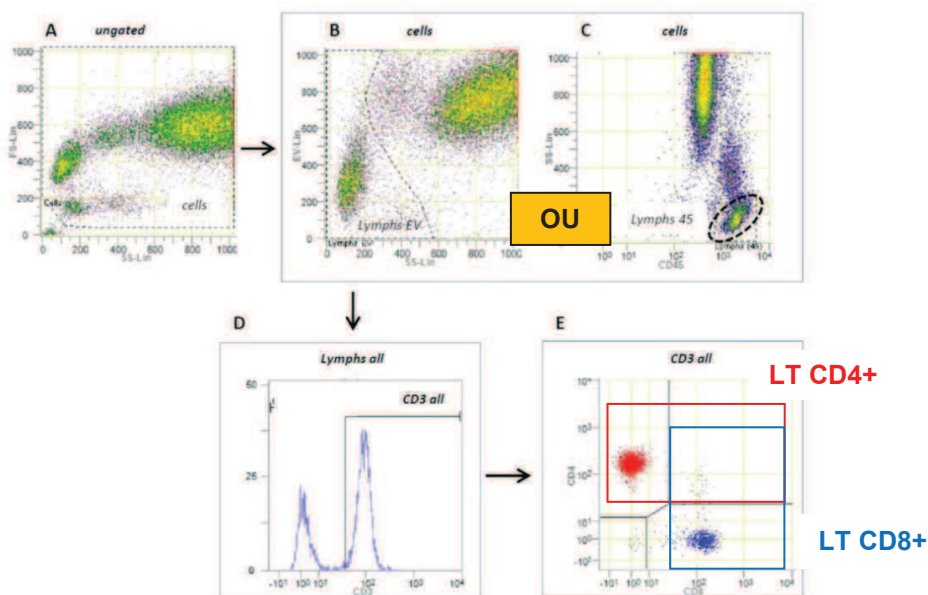
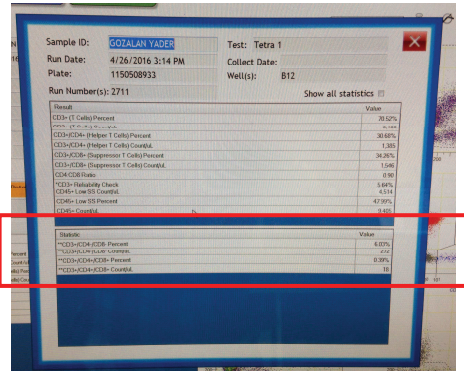
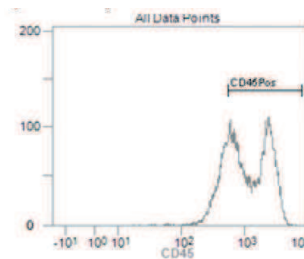


Figure 8. Stratégie de gating

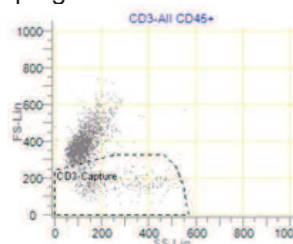
- Les **lymphocytes T double positifs CD4+CD8+** sont visibles dans le quadrant en haut à droite du graphe biparamétrique CD4/CD8
- Les **lymphocytes T double négatifs CD4-CD8-** sont visibles dans le quadrant en bas à gauche du graphe biparamétrique CD4/CD8
 - o Le pourcentage et la numération de ces deux sous-populations lymphocytaires T sont consultables dans l'écran Review :
 - Cliquer sur le **i** à droite de « Commentaires »



- Les cellules CD45+ sont définies dans l'histogramme CD45 monoparamétrique : **CD45Pos**
 - o Ceci permet d'exclure les globules rouges mal lysés qui sont CD45 négatifs
 - o *! Peut entraîner l'exclusion d'éléments CD45 faibles du compte de leucocytes et de lymphocytes : LLC, blastes, etc...*



- Le compte de lymphocytes totaux est une valeur reconstituée :
 - o A partir de CD3+ All : TOUS les LT CD3+ (car issus de Lymphs all)
 - o A partir de CD3- : les LB et NK issus de Lymphs
 - o Pour récupérer les LB et NK qui n'aurait pas été compté dans CD3- :
 - A partir de **CD3- all ET CD45Pos**, un graphe SS/FS est réalisé
 - ⇒ La région CD45Pos (issue de all data points) contient: Lymphocytes + Monocytes + quelques Polynucléaires
 - ⇒ La région CD3- all (issue de Lymphs all) contient: LB, NK et quelques monocytes
 - ➔ Les PNN sont exclus par la condition **ET** car ils ne sont pas présents dans CD3- all
 - ➔ Dans la nouvelle fenêtre **CD3- Capture**, les monocytes sont exclus par critère de taille (FS plus élevé). Cette fenêtre permet de réintégrer des lymphocytes CD3- qui ont été exclus du comptage brut



- Au final, **Lymphocytes Totaux = CD3+All OU CD3- OU CD3-Capture**
- Le compte des leucocytes
 - Sur le graphe biparamétrique SS/CD45, issu de la région Cells (Fig 9)
 - = **L45/HSS OU M45/HSS OU M45/MSS OU H45/LSS OU L45/LSS**

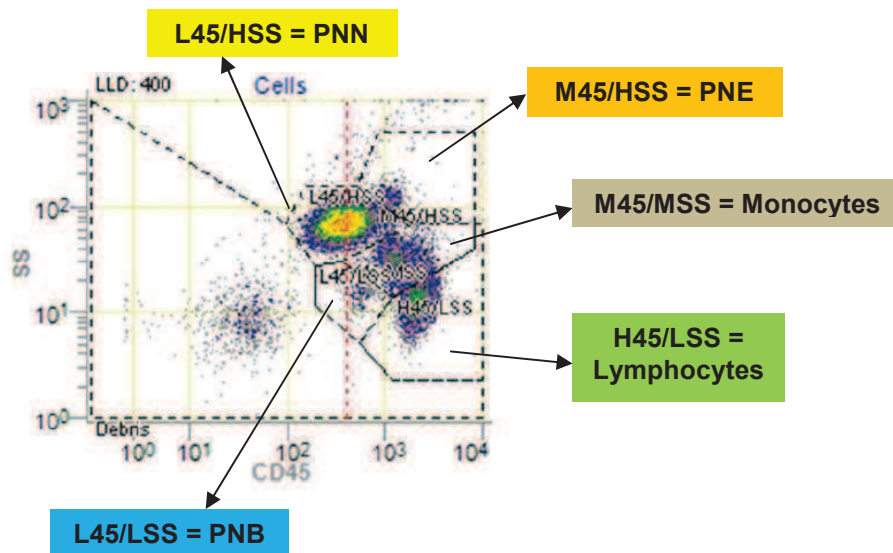





Figure 9. Total des CD45+

RQ : Tous **les résultats en pourcentage sont issus de calculs** par rapport aux Lymphocytes Totaux ; seuls les valeurs absolues (VA) des différentes populations sont mesurées par le cytomètre.

- % Lymphocytes CD3+ = $(VA\ CD3+ / VA\ Lymphs\ Total) \times 100$
- % LT CD4+ = $(VA\ LT\ CD4+ / Lymphs\ Total) \times 100$
- % LT CD8+ = $(VA\ LT\ CD8+ / Lymphs\ Total) \times 100$

Validation technique des résultats :


Se conformer à procédure de validation **HI-PostA-IT-002**



- Les régions peuvent être modifiées si besoin en appuyant sur le bouton 
- On peut ajouter un commentaire dans « *Comments* »
- Après avoir modifié les régions, accepter les modifications puis les enregistrer en appuyant sur 
- Imprimer si besoin les rapports de résultats (Annexe 3)
- Envoyer les résultats par LIS en cliquant sur l'onglet 

Compte tenu des éléments de conditionnement décrits ci-dessus, dès que la valeur des lymphocytes totaux comporte la moindre incertitude, il conviendra de refaire l'analyse avec une autre technique (cas des très mauvaises lyses, ou des populations de CD45 faibles importantes)

Exporter des résultats sous forme de tableau Excel :

Dans l'onglet Result :

- Search
 - Rechercher le résultat par Sample ID ou Patient name (**Fig. 10A**)
 - Dans Test, sélectionner « Tétr 1 »
- Cliquer sur l'icône  pour voir tous les résultats

- Supprimer les lignes non désirées en surlignant la ligne et en cliquant sur 
- Choisir les paramètres d'intérêt à exporter (**fig. 10B**)
 - o Fields → cocher les paramètres désirés → OK
- Sélectionner toutes les lignes par le clavier **Ctrl + A** et les copier **Ctrl + C**
- Retourner sous Windows en appuyant sur la touche 
- Ouvrir Excel
- Coller les résultats **Ctrl + V**

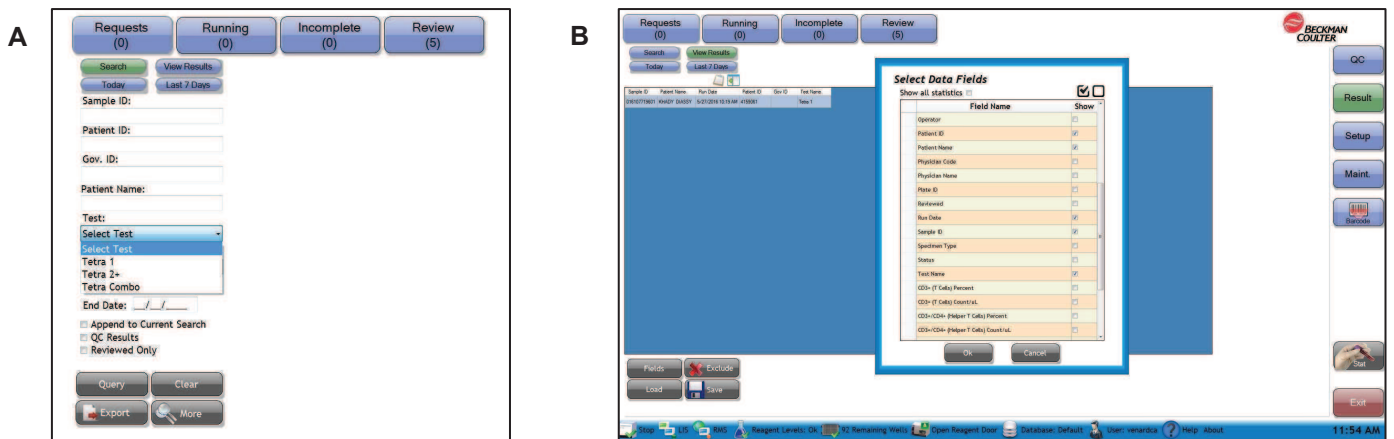



Figure 10. Menu Search dans onglet Result
(A) Identification du résultat à consulter; (B) Sélection des paramètres d'intérêt

5.6 Maintenances

5.6.1 Onglet Maint.

C'est le journal de l'AQUIOS CL.

On peut y ajouter des commentaires en cliquant sur 

A chaque incident, mentionner un commentaire résumant l'incident et les mesures prises +++

5.6.2 Procédures de nettoyage

Station de nettoyage (1 fois par jour)

- Ouvrir la porte de chargement des réactifs.
- Humidifier un coton-tige de solution d'hypochlorite de sodium AQUIOS.
- Essuyez la partie ouverte en acier inoxydable de la station de nettoyage, y compris le puits et le bord.
- Utilisez un coton-tige propre pour enlever tout excès de solution d'hypochlorite de sodium AQUIOS.
- Fermez la porte des réactifs.

Lecteurs de code-barres (1 fois par semaine)

- Essuyez délicatement les fenêtres des lecteurs de codes-barres avec un tissu doux et non pelucheux.
 - o Lecteur de code-barres extérieur et intérieur +++

ATTENTION : Ne pas utiliser d'autres produits de nettoyage, notamment eau de Javel, pouvant être trop abrasifs ou corrosifs et risquer d'endommager la fenêtre du lecteur de codes-barres.

Appareil AQUIOS CL

- **1 fois par jour**, vérifiez qu'il n'y a pas de déversements au niveau du plateau de débordement de la station de nettoyage pendant l'entretien de routine.

- **1 fois par semaine**, à l'aide d'un chiffon humide, nettoyez les surfaces extérieures de l'instrument.

5.6.3 Maintenance semestrielle

Analyse gravimétrique

BUT : Vérifier la performance de l'analyseur et des préparations en seringue.

Matériel nécessaire :

- Support de 40 tubes
- Flacon d'analyse gravimétrique vide
- Eau désionisée
- Balance



- Sélectionner  situé sur le côté droit de l'écran principal.
- Sélectionner  : un message s'affiche «*The software will need to be restarted once the Gravimetrics screen is available. Are you sure you want to continue Gravimetrics? (Le logiciel doit être redémarré dès que l'écran Analyses gravimétriques est disponible. Êtes-vous sûr(e) de vouloir poursuivre l'analyse gravimétrique ?)*» ; Sélectionner **Yes**.

Figure 11. Ecran « Analyse gravimétrique des seringues »

- Se procurer **16 tubes de 12 x 55 mm** et les marquer de la mention **A1-A8, B1-B8** à l'aide d'un marqueur permanent, avant de les placer dans un support de 40 tubes prévu à cet effet
 - 2 lignes de 8 tubes chacune, 1 pour la seringue préparatrice et 1 pour la seringue d'analyse
- Peser les 16 tubes **vides**.
- Saisir le poids du tube A-1 vide sur l'écran *Syringe Gravimetrics*, dans la colonne **Before**, à côté du numéro de tube respectif (Fig. 11). Faire de même pour les 15 autres tubes.
- Ouvrir la porte des réactifs. Si un plateau de 96 puits est installé, retirer le plateau et insérer celui de 40 tubes. Retirer et reboucher tous les tubes de réactifs présents sur le système.
- Remplir un **flacon gravimétrique vide d'eau désionisée** et placer le flacon à l'emplacement réservé au réactif, **à côté du tube A1**, comme indiqué sur la Fig.12
- Placer les tubes préalablement pesés dans un support de 40 tubes installé sur le chargeur de plateau qui se trouve à l'intérieur de l'instrument (Fig. 12) et fermer la porte de chargement des réactifs.

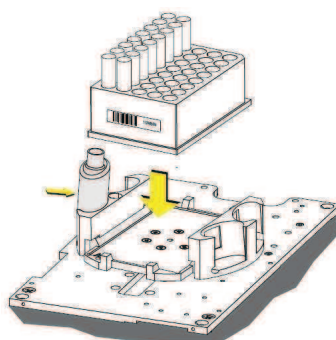
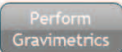
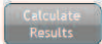
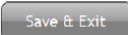


Figure 12. Disposition des tubes et du flacon d'eau désionisée pour l'analyse gravimétrique des seringues

- Sélectionner  le système exécutera le cycle gravimétrique, en aspirant et distribuant de l'eau désionisée dans les tubes correspondants. Cette étape dure environ 12min.
- Lorsque le cycle est terminé, le système en avertit l'utilisateur à l'aide du message suivant : « *Gravimetrics complete. Please weigh for after values. Record the values and calculate results. (Analyse gravimétrique terminée. Veuillez peser les tubes pour obtenir les valeurs résultantes. Enregistrer les valeurs, puis calculer les résultats.)* » Sélectionner **OK**.
- Récupérer le support contenant les 40 tubes de l'automate.
- Peser chacun des tubes contenant de l'eau désionisée, puis enregistrer son poids sur l'écran *Syringe gravimetrics* (Fig.11), dans la colonne **After** située à côté du numéro de tube correspondant.
- Sélectionner 
 - Le système calculera les résultats et indiquera si la procédure a réussi ou échoué.
 - Faire un print écran des résultats.
 - Si la procédure a échoué, **réitérer le test gravimétrique**. Si le problème persiste, contactez le représentant Beckman Coulter.
 - Si les résultats ont satisfait aux critères, sélectionner  pour enregistrer les résultats dans le registre de maintenance du système.
- Le système fermera alors le logiciel ; Ouvrir une nouvelle session pour continuer à travailler sur l'AQUIOS CL.

5.6.4 Maintenance annuelle

Elle est réalisée par Beckman Coulter dans le cadre du contrat de maintenance à l'issue de la garantie.

Cas particulier du remplacement du filtre à déchets en ligne (fig. 13)

Il est à changer sans attendre la maintenance annuelle si nécessaire en cas de bouchage.

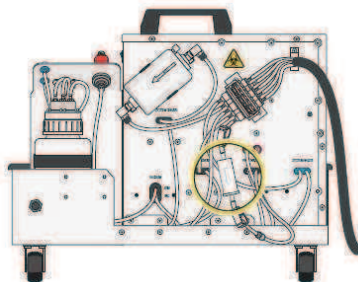





Figure 13. Filtre à déchets en ligne

5.7 Arrêt de l'AQUIOS CL

- Assurez-vous qu'il y ait au moins **2 mL de solution d'hypochlorite de sodium** dans le tube de 12 x 75 mm et **un puit disponible** avant d'effectuer un arrêt.
- Sélectionnez  dans la barre d'état.
- Si des échantillons sont en cours d'analyse, le message « *Samples are running. Do you want to shut down when they are finished? (Les échantillons sont en cours d'analyse. Souhaitez-vous arrêter le système une fois l'analyse terminée ?)* » apparaît. Sinon, le message « *Do you want to shut the system down? (Voulez-vous arrêter le système?)* » apparaît. Dans les deux cas, sélectionner **YES**.
- Lorsque le cycle de pause/arrêt est terminé, le message « *Please remove all reagents from the system and store as per labeling instructions (Veuillez supprimer tous les réactifs du système, conformément aux instructions d'étiquetage)* » s'affiche. Retirer les réactifs.
- Retirer le carrousel avec les réactifs du panel d'anticorps et conserver le à la verticale dans le réfrigérateur.
- Enlever les flacons de réactifs de lyse de l'appareil et remettre les bouchons respectifs sur chaque réactif. **Ne pas mélanger les bouchons de réactifs de lyse A et de lyse B.**
- Jeter le tube de solution d'hypochlorite de sodium.
- Jeter le plateau de puits profonds s'il ne reste plus de puits disponibles pour le lendemain, ou systématiquement le samedi midi.
- Sélectionner  pour fermer le logiciel et retourner à l'écran principal de Windows. Le message « *Exit, are you sure* »  s'affiche. Sélectionner **Exit**.
- Couper le courant du chariot d'alimentation.
- Mettre le cytomètre hors tension.
- Eteindre la station de travail.
- Changer le réservoir à déchets sur le chariot d'alimentation ; ajoutez de **l'eau de Javel (80 mL de solution de 2,6 % d'hypochlorite de sodium – chlore disponible par litre de déchet)** au bidon plein et laisser agir **une nuit** avant de vider les effluents dans l'évier.
- Nettoyer la station de lavage et les lecteurs de code-barres (Cf 5.6.2)

RQ : il existe une **procédure d'arrêt prolongé** chaque fois que le cytomètre n'est pas utilisé pendant plus de 7j.

Cf Chapitre 7 du Manuel d'utilisation de l'AQUIOS CL (Référence B44245AB)

5.8 Procédures de dépannage

Cf Chapitre 9 du Manuel d'utilisation de l'AQUIOS CL (Référence B44245AB)

Pour appeler le **Service client Hotline Beckman Coulter** :

0825 950 950

hematoflowservice@beckman.com

N° instance

- AQUIOS CL AY47058 (n°1) : 18397226
- AQUIOS CL AY39049 (n°2) : 16573213

6 Classement et archivage

Les **résultats papier** (« Prints ») et **sauvegardes informatiques** sont archivés selon les consignes du document MU-INFO-DE-005 et HI-INFO-DE-001

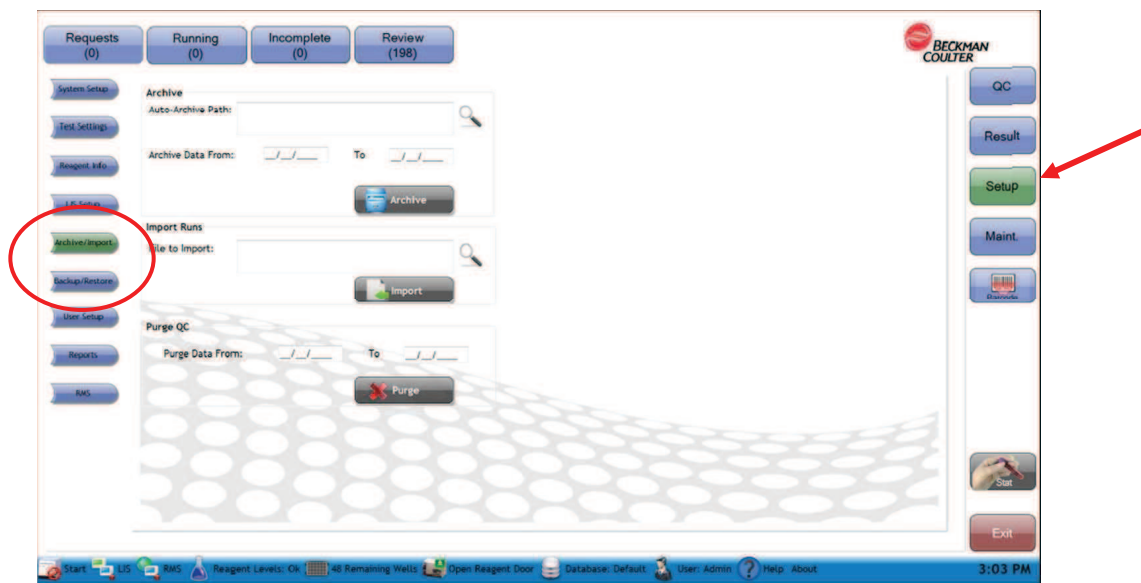
L'organisation et la fréquence des back-up et des archivages est consignée dans le document **HI-INFO-DE-007-01** « Organisation des sauvegardes et archives des données des AQUIOS CL ».

- Le **back-up** est une copie des données disponibles sur l'AQUIOS CL
- L'**archivage** supprime les données sur l'AQUIOS CL et les copie dans un dossier prévu à cet effet

Les données sont enregistrées en **format CRD** spécifique de l'AQUIOS CL.

Pour procéder à l'archivage et au back-up, il faut :

- Sélectionner l'**onglet Setup** de l'écran principal
- Puis l'écran **Archive/Import** ou **Backup/Restore**



Archive/Import :

- Spécifier le réseau ou dossier où archiver les données en cliquant sur la loupe de « *Auto-archive path* (Chemin d'accès à l'autoarchivage) »
- Saisir la période à archiver dans « *Archive Data From... To...* (Archiver les données de... à...) »
- Puis cliquer sur le bouton « *Archive* »

- Pour importer des fichiers ultérieurement archivés dans la base de données de l'AQUIOS CL, cliquer sur la loupe de « *File to Import* » pour sélectionner le fichier CDR

Backup/restore :

- Spécifier le réseau ou dossier où copier les données en cliquant sur la loupe de « *Backup Path* (Chemin d'accès à la sauvegarde) »
 - ATTENTION Le nom du fichier de sauvegarde ne peut être modifié. Si vous modifiez son nom, le système ne pourra plus restaurer le fichier de sauvegarde.
- Puis cliquer sur le bouton « *Backup now* »

7 Documents de références

- Guide d'utilisation du cytomètre en flux AQUIOS CL : ref B44245AB
- Guide du logiciel du système AQUIOS Tétra : ref B44253AB

Annexe 1. Prise en charge des résultats avec Alarme

Alarme	Définition	Action recommandée pour l'utilisateur
Insuffisant Lysing (Lyse insuffisante)	Trop de globules rouges mesurés dans l'échantillon.	<ol style="list-style-type: none">1. Assurez-vous que le volume de réactif de lyse est suffisant.2. Rejetez et refaites une demande dans le menu Review Options (Options de révision).3. Si le problème persiste, changez le coffret de réactif de lyse.4. Si le problème persiste, contactez votre représentant Beckman Coulter local.
Insuffisant Lymphs (Lymphocytes insuffisants)	Nombre de lymphocytes mesuré trop faible.	<ol style="list-style-type: none">1. Contrôlez les résultats de l'échantillon sur l'écran Review (Révision). Cette alarme peut être liée à un donneur ou réglée en réajustant manuellement le fenêtrage.2. Si la condition affecte les résultats, sélectionnez Reject, Re-Request (Rejeter, refaire une demande) à partir du menu Review Options (Options de révision).3. Si le problème persiste sur différents échantillons, contactez votre représentant Beckman Coulter local.
No Events (Aucun événement)	Nombre de points de données dans l'échantillon insuffisant.	<ol style="list-style-type: none">1. Exécutez un cycle de nettoyage à l'eau de Javel.2. Rejetez et refaites une demande dans le menu Review Options (Options de révision).3. Si le problème persiste, contactez votre représentant Beckman Coulter local.

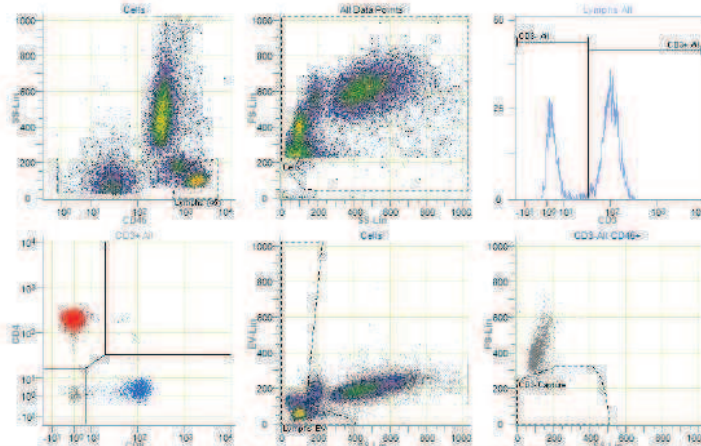
Annexe 2. Prise en charge des résultats avec Notification

Alarme	Définition	Action recommandée pour l'utilisateur
Under Lysed (Sous-lyse)	Nombre important de globules rouges mesuré dans l'échantillon.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tous les globules rouges peuvent ne pas être lysés dans les conditions suivantes : présence de globules rouges nucléés, concentration protéique anormale ou hémoglobinopathies. Une sous-lyse plus importante est également observée pour des contrôles ou des échantillons analysés à la limite inférieure de la plage de température ambiante. L'utilisation de CD45 en tant que condition de contour d'intérêt des lymphocytes permet de s'assurer que les RBC (globules rouges), en tant qu'événements négatifs CD45, ne sont pas inclus dans le contour d'intérêt des lymphocytes (voir les Figure 5.19 et Figure 5.20). 2. Assurez-vous que l'intégrité du contour d'intérêt des lymphocytes sur l'affichage EV est préservée. 3. Si la condition excède la performance attendue ou affecte l'intégrité du contour d'intérêt des lymphocytes sur l'affichage EV, sélectionnez alors Reject, Re-Request (Rejeter, refaire une demande) à partir du menu Review Options (Options de révision). 4. Si le problème persiste sur différents échantillons, contactez votre représentant Beckman Coulter local.
Potential sample or gating issue (Problème éventuel d'échantillon ou de fenêtrage)	Possibilité de mauvais placement de la porte ou d'anomalie d'échantillon pouvant avoir une incidence sur les résultats.	<p>Cette notification peut être déclenchée par plusieurs conditions :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Examinez la diffraction lumineuse et les schémas de l'EV. Si la diffraction lumineuse ou les schémas de l'EV sont perturbés, rejetez l'échantillon et refaites une demande. Voir les Figure 5.21, Figure 5.22 et Figure 5.23. 2. Revoyez les limites des contours d'intérêt et des régions ; pour ajuster les régions, voir Modification des régions d'un échantillon à examiner. 3. Revoyez les contrôles de fiabilité du CQ ; pour vérifier les contrôles de fiabilité, voir Contrôles analytiques de la fiabilité. 4. Revoyez la compensation de l'échantillon pour vérifier la compensation. Réglage manuel de la compensation seulement si le problème apparaît sur différents échantillons. 5. Si le problème persiste sur différents échantillons, contactez votre représentant Beckman Coulter local.
Low CD8 Positives (CD8 positifs bas)	La région des CD8 positifs comporte peu d'événements.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Contrôlez les résultats de l'échantillon sur l'écran Review (Révision). Cette notification peut être liée à un donneur ou réglée en réajustant manuellement le fenêtrage. 2. Si l'étape 1 ne résout pas la condition, sélectionnez alors Reject, Re-Request (Rejeter, refaire une demande) à partir du menu Review Options (Options de révision). 3. Si le problème persiste sur différents échantillons, contactez votre représentant Beckman Coulter local.
Low CD3 Positives (CD3 positifs bas)	La région des CD3 positifs comporte peu d'événements.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Contrôlez les résultats de l'échantillon sur l'écran Review (Révision). Cette notification peut être liée à un donneur ou réglée en réajustant manuellement le fenêtrage. 2. Si l'étape 1 ne résout pas la condition, sélectionnez alors Reject, Re-Request (Rejeter, refaire une demande) à partir du menu Review Options (Options de révision). 3. Si le problème persiste sur différents échantillons, contactez votre représentant Beckman Coulter local.
Low CD3 Negatives (CD3 négatifs bas)	La région des CD3 négatifs comporte peu d'événements.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Contrôlez les résultats de l'échantillon sur l'écran Review (Révision). Cette notification peut être liée à un donneur ou réglée en réajustant manuellement le fenêtrage. 2. Si l'étape 1 ne résout pas la condition, sélectionnez alors Reject, Re-Request (Rejeter, refaire une demande) à partir du menu Review Options (Options de révision). 3. Si le problème persiste sur différents échantillons, contactez votre représentant Beckman Coulter local.

Annexe 3. Rapports des résultats

A) En mode « Détails »

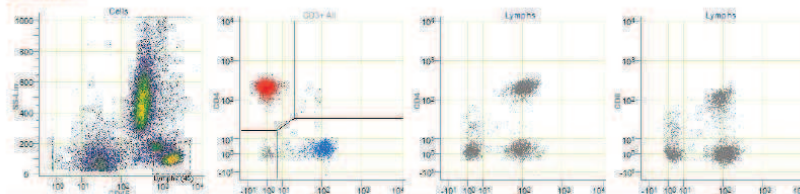
Sample ID: 89338172071 Test: Tetra 1 v0.16
 Run Date: 02 Oct 2013 14:16:07 Analysis Date: 02 Oct 2013 14:16:07
 User: Admin Collect Date:
 Specimen Type: Blood Control Patient Name: AQUIOS IMMUNO-TROL Cells
 Patient ID: Lot: 7587052 Gov. ID:
 Status: Compensation Passed Location:
 Gender: Date Of Birth:
 Physician: Physician Code:
 Instrument Serial #: CR312015
 Run Flags:
 Run Notifications:
 Comments:



Result	Value	Flag	Normal Range	Action Range
CD3+ (T Cells) Percent	71.29%			64.00%-82.00%
CD3+ (T Cells) Count/uL	791			628-1,148
CD3+/CD4+ (Helper T Cells) Percent	46.65%			37.00%-55.00%
CD3+/CD4+ (Helper T Cells) Count/uL	507			389-719
CD3+/CD8+ (Suppressor T Cells) Percent	22.74%			18.00%-30.00%
CD3+/CD8+ (Suppressor T Cells) Count/uL	252			177-413
CD4:CD8 Ratio	2.01			
*CD3+ Reliability Check	2.92%			

B) En mode « Graphes biparamétriques »

Sample ID: 89338172071 Test: Tetra 1 v0.16
 Run Date: 02 Oct 2013 14:16:07 Analysis Date: 02 Oct 2013 14:16:07
 User: Admin Collect Date:
 Specimen Type: Blood Control Patient Name: AQUIOS IMMUNO-TROL Cells
 Patient ID: Lot: 7587052 Gov. ID:
 Status: Compensation Passed Location:
 Gender: Date Of Birth:
 Physician: Physician Code:
 Instrument Serial #: CR312015
 Run Flags:
 Run Notifications:
 Comments:



Result	Value	Flag	Normal Range	Action Range
CD3+ (T Cells) Percent	71.29%			64.00%-82.00%
CD3+ (T Cells) Count/uL	791			628-1,148
CD3+/CD4+ (Helper T Cells) Percent	46.65%			37.00%-55.00%
CD3+/CD4+ (Helper T Cells) Count/uL	507			389-719
CD3+/CD8+ (Suppressor T Cells) Percent	22.74%			18.00%-30.00%
CD3+/CD8+ (Suppressor T Cells) Count/uL	252			177-413
CD4:CD8 Ratio	2.01			
*CD3+ Reliability Check	2.92%			

ANNEXE 3 : PROCEDURE DE GESTION DES CONTROLES DE QUALITE
DE L'IMMUNOLOGIE CELLULAIRE

CONTROLE DE QUALITE DE L'IMMUNOCELLULAIRE

1 Objet

Décrire toutes les dispositions qui concernent la gestion des contrôles de qualité au laboratoire d'immunologie de l'hôpital Edouard Herriot dans le secteur d'Immunologie Cellulaire.

Une liste des analyses suivies par CIQ et/ou EEQ est disponible dans le document HI-ANA-DE-008

2 Champs d'application

Les techniciens, les biologistes responsables et les biologistes valideurs, les internes.

3 Responsabilités

Conformément au document MU-ANA-PG-005 et 006, CIQ et EEQ sont sous la responsabilité de FPL et CM

4 Définitions et abréviations

4.1 Définitions

4.2 Abréviations

DS : déviation standard ou écart type

CQ : contrôle de qualité

BR : biologiste responsable

CMF : Cytométrie en flux

CV : Coefficient de variation

HST : Histogramme

LPM : Laboratory Production Manager (connexion entre les appareils et le SIL)

5 Contenu

5.1	CONTROLE DE QUALITE INTERNE (CIQ).....	3
5.1.1	<i>Intérêts et objectifs</i>	3
5.1.2	<i>Choix des CIQ</i>	3
5.1.2.1	Contrôle de l'appareillage	3
5.1.2.2	Contrôle de l'analyse	3
5.1.3	<i>Planification</i>	4
5.1.4	<i>Exploitation des résultats</i>	4
5.1.5	<i>En pratique</i>	4
5.1.5.1	Nature des spécimens de contrôle et fréquence des dosages	4
5.1.5.2	Conditions de préparation, de stockage et de stabilité.....	5
5.1.5.3	Passage des contrôles.....	5
5.1.5.3.1	Contrôle Flow Set	5
5.1.5.3.2	Contrôle Flow Check	5
5.1.5.3.3	Contrôle de sang stabilisé.....	5
5.1.5.4	Suivi des contrôles.....	6
5.1.5.4.1	Contrôle Flow Set	6
5.1.5.4.2	Contrôle Flow Check	7
5.1.5.4.3	Contrôle de sang stabilisé.....	8
5.1.5.4.4	Les valeurs cibles et limites d'acceptabilité des contrôles.....	10
5.1.5.4.5	Externalisation des résultats : IQAP	10
5.1.5.4.6	Archivage	11
5.2	CONTROLE DE QUALITE EXTERNE (EEQ).....	12
5.2.1	<i>Intérêts et objectifs</i>	12
5.2.2	<i>Choix des EEQ</i>	12
5.2.3	<i>Planification</i>	12
5.2.4	<i>Enregistrement</i>	14
5.2.5	<i>Exploitation des résultats et interprétation</i>	14
5.2.6	<i>Archivage</i>	15

5.1 Contrôle DE QUALITE INTERNE (CIQ)

5.1.1 Intérêts et objectifs

Le CIQ en Immunologie cellulaire ne concerne que la cytométrie en flux (CMF), dans la mesure où de nombreux examens de ce secteur sont très spécialisés et ne peuvent être surveillés d'une part par des spécimens de contrôle du commerce (non disponibles) et d'autre part par des échantillons élaborés localement (travail sur cellules fraîches qu'il n'est pas possible de conserver pour une utilisation quotidienne).

Les CIQ utilisés en CMF ont, de manière générale, pour intérêt et objectifs ceux du **MU-ANA-PG-005** (suivi des performances : fidélité et justesse, validation journalière et validation de méthodes). Tenant compte des spécificités des cytomètres, certains des CIQ ont des objectifs limités au contrôle de l'appareillage et non de l'ensemble de l'analyse. L'utilisation des contrôles est décrite dans les procédures **HI-ANA-MT-021** (AQUIOS CL) et **HI-ANA-MT-022** (NAVIOS).

5.1.2 Choix des CIQ

5.1.2.1 Contrôle de l'appareillage

La CMF nécessite un contrôle journalier de son système optique et de son système fluïdique. Ce contrôle est assuré par 2 CIQ différents :

- **Contrôle de la stabilité optique** et des niveaux d'amplification et détection par des billes fluorescentes d'intensité connue calibrée et très stable : journalier pour vérifier qu'il n'y a pas de perte de sensibilité du dispositif (**Flow Set**)

- **Contrôle de la stabilité optique et fluïdique** par des billes fluorescentes de taille et de fluorescence très homogènes permettant de tester l'évolution des CV de mesure des paramètres de taille et de fluorescences ainsi que le débit de l'appareil (**Flow Check et Flow Check 770**)

Ces deux contrôles étant très liés au système optique de la machine, ils sont fournis par Beckman Coulter également fournisseur de l'appareillage.

Ces contrôles sont indispensables pour le Navios mais ne sont pas utilisés pour l'AQUIOS CL qui prépare les échantillons et les analyse ensuite, avec une analyse quantitative volumétrique ne nécessitant pas d'étalon interne.

5.1.2.2 Contrôle de l'analyse

La préparation des échantillons avant analyse (technique Optilyse+Navios ou AQUIOS CL) ainsi que l'analyse cytométrique des cellules (AQUIOS CL et Navios) sont surveillées par un contrôle de sang stabilisé (Immunotrol Cells et Immunotrol Low Cells) à deux niveaux de concentration : l'un proche des valeurs de référence et l'autre choisi dans la zone critique basse des lymphocytes T CD4+. Ils sont utilisés quotidiennement, l'un le matin et l'autre le soir, en permutant à la fin de chaque semaine conformément aux instructions de **HI-ANA-**

MT-024. Il s'agit d'un contrôle répondant à tous les critères souhaités (**MU-ANA-PG-005**) qui est également fourni par Beckman Coulter (Non indépendant par rapport à la machine).

Sur l'AQUIOS CL, ces contrôles permettent également la surveillance de la stabilité de l'appareillage grâce aux paramètres « Instrument » = pouvoir séparatif de l'appareil et « Instrument drift » = niveau des signaux optiques.

5.1.3 Planification

Planification quotidienne :

- Flow Set : vérification appareillage recommandée par le fournisseur (NAVIOS)
- Flow Check et Flow Check 770 : vérification appareillage recommandée par le fournisseur (NAVIOS)
- Immunotrol Cells et Immunotrol Low Cells : validation de la série (entre 2 CIQ)
- Immunotrol Low Cells: validation des séries pour des valeurs basses

Cette planification tient compte des recommandations du fournisseur pour la CMF, du nombre de demandes quotidiennes (entre 50 et 100), de la péremption des échantillons de sang stabilisé et du volume de ceux-ci (environ 3 mois maximum), des calibrations bimestrielles et maintenances annuelles ou en cas de panne, des coûts des réactifs de cytométrie.

5.1.4 Exploitation des résultats

Les résultats des CIQ sont suivis grâce aux cartes de Levey Jennings avec deux objectifs :

- Validation d'une série

Les critères d'acceptabilité des CIQ Immunotrol Cells et Immunotrol Low Cells sont ceux des règles de Westgard. Dans certaines circonstances, un CIQ Immunotrol Cells ne répondant pas complètement aux règles de Westgard pourra être accepté, eu égard aux autres éléments de contrôle disponibles sur les résultats de patients (concordance avec les résultats de NFP). Il est à noter que la cytométrie permet notamment le contrôle individuel de la qualité analytique par les images cytométriques.

- Suivi des performances de la méthode

Suivi des SDI et CVI lors de l'externalisation à l'IQAP (Interlaboratory Quality Assurance Program) : l'externalisation des résultats par lot entier ou groupe de résultats auprès de l'IQAP, service proposé par Beckman Coulter à tous les utilisateurs de contrôles Immunotrol Cells et Immunotrol Low Cells permet une approche de la justesse.

- Suivi de l'appareillage (Flow Check et Flow Set)

5.1.5 En pratique

5.1.5.1 Nature des spécimens de contrôle et fréquence des dosages

- *Billes Flow Set Beckman Coulter* - Réf 6605359 - kit de 3 flacons de 10 mL
Passées chaque jour lors du démarrage du NAVIOS
- *Billes Flow Check Beckman Coulter* - Réf 6605359 - kit de 3 flacons de 10 mL
Passées chaque jour lors du démarrage du NAVIOS

- *Immunotrol Cells Beckman Coulter* - Réf 6607077 et B23535 - kits de 2 tubes de 3 mL pour Navios et AQUIOS CL respectivement.

Passé chaque jour le matin les semaines paires et le soir les semaines impaires sur les 2 cytomètres AQUIOS CL (**HI-ANA-MT-021**) et sur le Navios (**HI-ANA-MT-022**).

- *Immunotrol Low Cells Beckman Coulter* - Réf 6607098 et B25700 - kit de 2 tubes de 3 mL pour Navios et AQUIOS CL respectivement

Passé chaque jour le matin les semaines impaires et le soir les semaines paires sur les 2 cytomètres AQUIOS CL (**HI-ANA-MT-021**) et sur le Navios (**HI-ANA-MT-022**).

5.1.5.2 Conditions de préparation, de stockage et de stabilité

Le contrôle Flow Check est une suspension de billes fluorescentes prête à l'emploi, à conserver à 4°C à l'abri de la lumière. Il ne nécessite aucune préparation préalable et doit être agité délicatement par retournement (ne jamais vortexer) avant analyse. Il est transvasé dans un tube de cytométrie pour son analyse. Il en est de même pour le contrôle Flow Set.

Les contrôles Immunotrol sont des échantillons de sang stabilisé prêts à l'emploi. Ils doivent être conservés à 4°C jusqu'à leur date de péremption. Après ouverture, un tube peut être utilisé pendant 90 jours au maximum. Pour l'AQUIOS CL, s'il est passé en mode automatique, un maximum de 15 perçages du bouchon est toléré. Au-delà, il faut le passer en position manuelle. Pour préserver toutes les propriétés de ces contrôles, ils doivent être sortis du réfrigérateur juste avant utilisation, agiter 15 minutes sur l'agitateur à bascule et replacer au réfrigérateur tout de suite après le prélèvement. Ils sont préparés manuellement pour le Navios, comme les patients.

5.1.5.3 Passage des contrôles

5.1.5.3.1 Contrôle Flow Set (Navios uniquement)

Le contrôle Flow Set est paramétré et reconnu comme un contrôle par le Navios grâce au protocole **QC FLOW SET PRO.pro** appelé par le **panel QC FlowSet Pro.pnl**. Il n'est pas géré dans LPM, mais par le Report Generator du cytomètre, il doit être passé le matin avant tout échantillon. Ses résultats sont automatiquement reportés dans la Template et peuvent être visualisés sous forme de graphe de Levey-Jennings. Se référer à HI-ANA-MT-022 pour l'analyse sur le cytomètre Navios

5.1.5.3.2 Contrôle Flow Check (Navios uniquement)

Le contrôle Flow Check est paramétré et reconnu comme un contrôle par le Navios grâce au protocole **ALIGN.Pro** appelé par le **panel Alignement Blue Red 8c_C**. Il ne contrôle pas l'étape de marquage mais permet de valider le fonctionnement du cytomètre. Il n'est pas géré dans LPM, mais par le Report Generator du cytomètre, il doit être passé le matin avant tout échantillon. Ses résultats sont automatiquement reportés dans la Template et peuvent être visualisés sous forme de graphe de Levey-Jennings. Se référer à **HI-ANA-MT-022** pour l'analyse sur le cytomètre Navios.

5.1.5.3.3 Contrôle de sang stabilisé

Sur le Navios, les deux niveaux des contrôles Immunotrol Cells sont paramétrés comme des patients avec un code à barres du type 11110 ou 22220 suivi du numéro de lot à 7 chiffres pour respectivement Immunotrol Cells et Immunotrol Low. (**HI-ANA-MT-022**, passer le contrôle Immunotrol). Sur l'AQUIOS CL, ils sont reconnus par leur code à barre au moment de leur introduction et de leur programmation dans l'appareil. Ils permettent de contrôler l'ensemble de la procédure (marquage et analyse cytométrique) (HI-ANA-MT-021). Pour les AQUIOS CL et le Navios, ils sont gérés dans LPM avec des cartes de Levey-Jennings et l'application des règles de Westgard. Les résultats des contrôles sont automatiquement reportés dans les courbes après identification positive du contrôle sur LPM.

Les résultats étudiés sont les suivants :

- sur le Navios : Lymphocytes CD19+ et lymphocytes CD3-CD16+CD56+(NK) en %
- sur l'AQUIOS CL : Leucocytes en valeur absolue, lymphocytes totaux, CD3+, CD4+ et CD8+ en valeurs absolues et %.


Il existe une valeur cible et des limites acceptables de contrôle sauf pour les lymphocytes NK (il n'y a pas de valeur fournisseur puisque le contrôle n'est pas préconisé avec ces échantillons). Les règles définies dans **MU-ANA-PG-006** sont appliquées. Les paramètres « instrument » et « Instrument Drift » sont collectés sur les AQUIOS CL (mais pas sur LPM) et permettent de suivre les performances de l'appareillage.

5.1.5.4 Suivi des contrôles

5.1.5.4.1 Contrôle Flow Set

Il permet de suivre les performances des photomultiplicateurs et des détecteurs et est surveillé dans le temps, davantage comme un appui des Flow Check et des standardisations. Les histogrammes de suivi rapportent pour chaque canal de taille et de fluorescence, le % de billes dans la fenêtre d'analyse, le mode du signal, avec pour caractéristiques la moyenne mobile et une fourchette à +/-2 écart-types

Conduite à tenir :

- Vérifier que les **pics de fluorescence** tombent bien dans les fenêtres placées sur les HST.
 - o Si aucun pic n'apparaît, déboucher le cytomètre en appuyant sur 
- Acquérir jusqu'à **5000 billes** à la vitesse LOW
- Vérifier les valeurs du tableau suivant :

Color	Name	% Gated
	FL8	99.77
	FL7	99.72
	FL6	99.86
	FL5	99.68
	FL4	99.91
	FL3	99.91
	FL2	99.77
	FL1	99.77

Interprétation :

> **95%** : parfait

Entre 90 et 95% : surveiller si le problème persiste le lendemain

< **90%** :

- 1-vérifier que la vitesse est bien low,
- 2-repositionner les curseurs pour prendre la totalité du pic au ras du pic pour le curseur inférieur puis « *save protocol* »
- 3-surveiller pendant une semaine
- 4-si l'anomalie persiste, appeler BC
- 5-recalibration

Si tous les paramètres d'un laser sont touchés → pb sur laser et non sur PMT

- Vérifier les résultats du passage des billes sur le **graphique LEVEY JENNINGS** :
 - o Cliquer sur « Template »
 - o Choisir « Select Template »
 - o Sélectionner *QC Flow Set Pro* et cliquer sur « Open »
 - o Parcourir l'ensemble des graphes de Levey-Jennings
 - Moyenne de fluorescence pour FL1, FL2, FL3, FL4, FL5 et FL6
 - Médiane de fluorescence pour FL7 et FL8
 - Voltage pour FL1, FL2, FL3 et FL4

Cf Annexe 1.

5.1.5.4.2 Contrôle Flow Check

Il permet le suivi de l'appareillage sur le plan optique et fluïdique. Les histogrammes de suivi rapportent pour chaque canal de taille et fluorescence le mode du signal, ainsi que le CV à mi-hauteur du pic (HPCV) avec pour caractéristiques la moyenne mobile et une fourchette à +/-2 écart-types. Un histogramme rapporte le débit des billes, avec les mêmes caractéristiques.

Conduite à tenir :

- Acquérir pendant 30 secondes à la vitesse LOW
- Vérifier **le débit** pendant le passage du tube de Flow-check : il ne doit pas être trop bas, mais compris entre **150 et 200 billes / seconde**, puis sur le graphe de Levey-Jennings : environ **4000 billes** sur la totalité de l'acquisition.
 - o Problème de bouchage ? de fluïdique ?
- Vérifier que les pics de fluorescence tombent dans leurs fenêtres respectives repérées par [FL1@2.0](#), [FL2@2.0](#), [FL3@2.0](#), [FL4@2.0](#), [FL5@2.5](#), [FL6@3.0](#), [FL7@3.0](#) et [FL8@3.0](#). Les chiffres après @ indiquent les seuils maximums tolérés des HPCV des pics de fluorescence. Si les pics des Flow-Check tombent en dehors des fenêtres mais que les autres paramètres sont corrects, vérifier la sensibilité du cytomètre et revoir le contrôle Flow-Set

- Vérifier **les HPCV** de FS et des fluorescences des Flow-Check qui doivent être **inférieurs à 1,50** (avec une tolérance jusqu'à 2,0, voire 2.5 pour FL5) et celui des Flow-Check 770 **inférieur à 3**.
 - o S'ils sont supérieurs, il y a un problème de bouchage, de fluidique, d'alignement.
- Vérifier **les modes** qui doivent restés dans la fourchette moyenne +/- 2Sd présentée sur les **graphes de Levey Jennings**.
 - o Si un des résultats des billes n'est pas bon :
 - Le supprimer de la template en cliquant dessus et en choisissant « Removed ».
 - Il est possible de saisir un commentaire et de faire « Save Comment ».
 - Le point effacé devient de couleur verte après l'annulation.
 - Repasser les billes
 - o Si les paramètres restent mauvais, déboucher et re-rincer le cytomètre
 - Repasser les billes
 - o Si les CV et les modes des signaux restent hors limite ou dérivent, appeler le BR et/ou le SAV BC.

RQ: Quand ces anomalies sont constatées de *manière ponctuelle*, il est possible d'utiliser le cytomètre malgré ces contrôles hors limite ; en effet, il existe pour les techniques de marquage et d'analyse utilisées pour rendre les résultats de patient des indicateurs qui permettent de valider le bon déroulement des mesures : intensités de fluorescence, FS et SS connues et élevées (si les modes sont bas ou hauts), mesures d'évènements fréquents (contrairement aux techniques qui recherchent des évènements rares) même si les CV sont hauts. Si ces anomalies sont observées plusieurs jours de suite ou en cas de dérive, une intervention Beckman Coulter est demandée.

Cf Annexe 2.

5.1.5.4.3 Contrôle de sang stabilisé

Les CIQ Immunotrol sont utilisés conformément à la procédure **MU-ANA-PG-006**.

NAVIOS :

Consulter les résultats dans le module Contrôle Qualité de LPM, vérifier les résultats du passage des contrôles sur les graphiques LEVEY JENNINGS et le résultat de l'application des règles de Westgard. Si une des règles de Westgard apparait pour un des 2 résultats du contrôle :

- Rejouer le LMD :
 - ✓ Si aucune alarme, OK
 - ✓ Si le(s) résultat(s) du contrôle est (sont) dans **les règles d'alerte (4 1s, 10x)** voire **d'alarme (1 2s)**: Saisir un commentaire sur le passage et expliciter le constat et la décision prise
 - ✓ Si le(s) résultat(s) du contrôle est (sont) dans **les règles de rejet (1 3s, 2 2s, R4s)** :
 - Repasser le contrôle et rejouer la LMD.
 - Informer le BR

- Saisir un commentaire sur le passage et expliciter le constat et la décision prise
- S'aider des Flow Check
- Vérifier les réactifs, le matériel de contrôle (lots, date, ouverture, aspect...)
- Refaire une calibration
- En l'absence d'amélioration, appeler le SAV Beckman. Eventuellement, accepter le contrôle selon les échanges avec BC et suivre sur les contrôles suivants.

AQUIOS CL :

Consulter les résultats dans le module Contrôle Qualité de LPM, vérifier les résultats du passage des contrôles sur les graphiques LEVEY JENNINGS et le résultat de l'application des règles de Westgard. Si une des règles de Westgard apparaît pour un des 9 résultats du contrôle :

- Rejouer le LMD
 - ✓ Si aucune alarme, OK
 - ✓ Si le(s) résultat(s) du contrôle est(sont) dans **les règles d'alerte (4 1s, 10x)** voire **d'alarme (1 2s)**: Saisir un commentaire sur le passage et expliciter le constat et la décision prise
 - ✓ Si le(s) résultat(s) du contrôle est(sont) dans les **règles de rejet (1 3s, 2 2s, R4s)** :
 - Repasser le contrôle et rejouer le LMD.
 - Informer le BR
 - Saisir un commentaire sur le passage et expliciter le constat et la décision prise
 - Vérifier les réactifs, le matériel de contrôle (lots, date, ouverture, aspect...)
 - Recibler si une dérive est observée dans les jours précédents, si cela ne résout pas le problème
 - Appeler Beckman et travailler sur l'autre appareil dans l'attente de la résolution du problème.

Sur le programme QC de l'AQUIOS CL,

- Les paramètres « **Instrument** », sont suivis sur des graphes de Levey-Jennings ; *pour la séparation CD3, CD4, et CD8, la valeur doit être >3 pour attester de la bonne séparation des pics négatifs et positifs.*
- Les paramètres « **Instrument Drift** » sont suivis sur des graphes de Levey-Jennings et donnent l'évolution des signaux collectés dans les différents canaux de l'appareillage. Les dérives ou défaillances brutales de l'appareil peuvent ainsi être visualisées. Un décalage des valeurs peut être observé en cas d'intervention SAV ou de changement de lot de réactif, sans conséquence sur les résultats des patients.

Pour ces deux groupes de paramètres, une valeur isolément en dehors des limites de contrôle nécessite une simple surveillance. Si une dégradation progressive est observée dans le temps (**plus de 10 points consécutifs en baisse continue**), demander une intervention SAV. Dans la mesure où les résultats des % et valeurs absolues sont

acceptables, ces baisses de performance n'ont pas de conséquence sur les résultats des patients.

Les commentaires sur les CIQ sont saisis soit par le BR, soit par le technicien avec l'aval du BR.

RQ : Dans certains cas, malgré un ou plusieurs paramètres dans les règles de rejet, il est possible de valider les résultats de patient, en raison des spécificités de la cytométrie (voir ci-dessus pour les Flow Check) et de la possibilité de vérifier la cohérence des résultats avec le résultat de la NFP d'hématologie des patients le même jour à la même heure, et l'immunosomme quand elle est disponible.

5.1.5.4.4 Les valeurs cibles et limites d'acceptabilité des contrôles

Ce sont celles de la procédure **MU-ANA-PG-005**.

- **Billes** : une période probatoire n'est pas indispensable pour les contrôles de billes ; les changements de lots sont gérés en passant le nouveau lot **une fois** avant l'arrêt du précédent pour visualiser les niveaux des signaux. Si ces niveaux sont différents, les fenêtres des cibles seront réajustées et le protocole sauvegardé.
- **CIQ** : pour les lots de contrôle de sang stabilisé du fait de leur faible durée et des coûts, les changements de lots sont gérés en passant le nouveau lot **5 fois** avant la fin du précédent pour avoir une estimation de la valeur cible lors de la mise en route du nouveau lot et au cas où d'autres nouveaux lots de réactifs seraient débutés simultanément. Les limites de surveillance et de contrôle sont temporairement reconduites à partir de celles du lot précédent.
 - o Avant tout changement de lot de CIQ, un chevauchement de 5 jours des lots de CIQ (ancien et nouveau) est réalisé sur le Navios et sur chacun des AQUIOS CL. *L'écart-type de fidélité intermédiaire du lot précédent est utilisé sous forme de CV% pendant les 20 premiers jours d'utilisation du lot.*
 - o Pour le Navios, une étude est refaite dans LPM après 20 passages.
 - o Pour les AQUIOS CL, la nouvelle moyenne et le nouveau CV sont calculés par extraction des résultats de l'AQUIOS CL à partir de 2*20 valeurs obtenues. La nouvelle moyenne et le nouveau CV sont appliqués dans LPM avec des valeurs identiques pour les 2 AQUIOS CL.
 - o En cas de de règle d'alerte Westgard 10X avant les 20 valeurs, l'étude pourra être anticipée.

Remplir le document **MU-ANA-DE-005** et l'archiver dans le classeur de l'appareil.

5.1.5.4.5 Externalisation des résultats : IQAP

Beckman Coulter propose une évaluation des performances (justesse, fidélité) au travers de l'utilisation des résultats d'Immunotrol et d'Immunotrol Low Cells.

Tous les résultats obtenus au quotidien sont colligés et comparés à ceux obtenus par les autres **utilisateurs du même contrôle du même lot** de par le monde. Chaque utilisateur se voit attribuer une appréciation de la fidélité et de la justesse de sa méthode par rapport à l'ensemble des utilisateurs.

Les résultats sont déposés sur le site internet de Beckman par le BR et les calculs sont rendus disponibles dans la journée. Si le nombre de participants est faible lors de la saisie, il est à tout moment possible de redemander les calculs sur la totalité du groupe de participants pour avoir une confrontation aux pairs statistiquement plus pertinente.

Pour la saisie ou la consultation :

<https://www.beckmancoulter.com/qap/>

Choisir Cytometry IQAP

Choisir « go to cytometry IQAP »

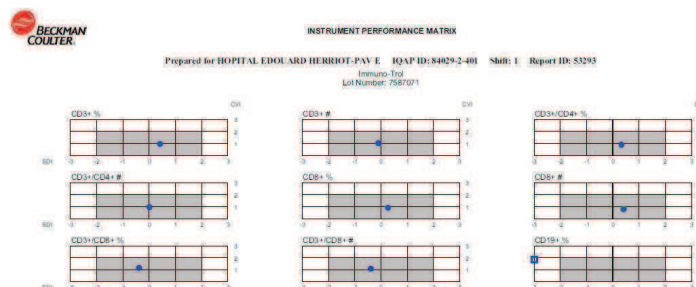
S'identifier : poitevinfr MP = j-327853

Choisir le cytomètre

puis Data Collection pour la saisie ou Reports pour les résultats

L'IQAP est donc utilisé pour suivre chaque lot de chacun des niveaux de contrôle Immunotrol et apprécier les performances du laboratoire dans le temps par rapport à nos pairs. Les rapports indiquent moyenne et écart type du lot pour notre laboratoire et l'ensemble des participants, l'historique de nos CV ainsi que $Sdi = (m - m \text{ pool})/Sd \text{ pool}$ (Z Score) et $CVi = CV/CV \text{ Pool}$

INTERLABORATORY QUALITY ASSURANCE PROGRAM DATA EVALUATION <small>Prepared for HOPITAL EDOUARD HERRIOT-PAV E IQAP ID: 84029-2-401 Shift: 1 Report ID: 53293</small>															
Parameter (US Units)	Assay 7597071	Means and SDs				Current and History CVs					Counts*		SDI and CVI**		
		Your Mean	Pool Mean	Your SD	Pool SD	Your CV	History CV (1)	History CV (2)	History CV (3)	Pool CV	Your Count	Pool Size	SDI	CVI	
CD2+ %	83.0	83.6	83.6	0.07					0.88		72	82	0.46	1.01	
CD3+ %	76.0	76.0	75.7	0.68	0.58	0.87	0.87	1.00	0.71	0.86	72	28	-0.08	1.05	
CD3+ #	1021.0	1043.3	1046.8	54.56	41.94	5.23	5.23	4.15	4.31	5.09	72	28			
CD4+ %	50.0	49.2	49.2								72	86	0.36	0.95	
CD4+ #	665.0	680.2	680.2								72	36	0.04	1.02	
CD3+CD4+ %	50.0	49.6	49.2	0.76	0.64	1.07	1.07	1.40	1.04	1.66	72	86	0.36	0.95	
CD3+CD4+ #	665.0	680.4	679.6	37.42	25.39	5.50	5.50	4.19	3.93	5.39	72	36	0.04	1.02	
CD8+ %	27.0	27.4	26.9	0.92	1.47	3.39	3.39	2.92	5.17	3.88	72	31	0.31	0.91	
CD8+ #	366.0	376.7	368.3	42.04	16.51	6.00	6.00	5.48	7.28	7.51	72	31	0.46	0.89	
CD3+CD8+ %	25.0	26.8	26.1	0.77	0.67	3.10	3.10	2.76	3.44	2.59	72	86	-0.36	1.29	
CD3+CD8+ #	329.0	340.7	346.0	20.40	14.75	6.01	6.01	6.13	6.07	6.40	72	27	-0.36	1.11	
CD19+ %	12.0	11.6	12.6	0.77	0.42	6.63	6.63				3.57	10	41	-0.88	1.86
CD19+ #	167.0	177.6	177.6		6.52					6.53	12				
CD19+Kappa+ %	58.0	61.1	61.1												
CD19+Lambda+ %	37.0	35.3	35.3												
CD3+CD56+ %	8.0	8.2	8.60							6.32		37			
CD3+CD56+ #	108.0	126.3	126.3		5.20					5.79		12			



Les résultats sont rapides, mais s'agissant d'un contrôle externalisé à la fin d'utilisation du lot de contrôle, de mauvaises performances n'entraînent pas d'intervention immédiate mais plutôt une remise en cause de chaque étape et chaque réactif ainsi qu'une surveillance étroite de l'évolution.

Les performances sont suivies au fil du temps avec le document **MU-ANA-DE-024**.

5.1.5.4.6 Archivage

A la fin de la période d'utilisation du lot, le tableau des valeurs est extrait de LPM ou des AQUIOS CL et est imprimé puis archivé avec tous les prints dans la boîte réservée à chaque contrôle pour chaque cytomètre dans le placard Assurance Qualité et conservés 3 ans.

5.2 Contrôle DE QUALITE EXTERNE (EEQ)

5.2.1 Intérêts et objectifs

L'EEQ en Immunologie cellulaire ne concerne que quelques paramètres de la cytométrie en flux (CMF), dans la mesure où de nombreux examens de ce secteur sont très spécialisés. Pour l'étude fonctionnelle des lymphocytes (test de transformation lymphoblastique), des échanges de cellules congelées sont en cours d'essai entre les laboratoires français du réseau des déficits immunitaires (standardisation des résultats et de l'offre analytique), en l'absence de programme commercial dans le domaine.

Le contrôle national propose moins d'une consultation de deux échantillons par an environ pour les paramètres suivants : **Lymphocytes CD3, CD4, CD8, CD19, cellules NK, en % et en valeur absolue.**

Le laboratoire est également abonné pour les mêmes paramètres au contrôle « Immune monitoring » proposé par UK EQALS (organisme de contrôle de qualité anglais), dans la mesure où la fréquence des EEQ du contrôle national est totalement insuffisante.

Ces EEQ permettent d'évaluer l'exactitude de nos techniques et l'évolution des techniques (voir **MU-ANA-PG-005**).

5.2.2 Choix des EEQ

Le contrôle national est obligatoire mais insuffisant compte tenu de sa fréquence (moins d'un par an) et du nombre de laboratoires concernés (environ 70 laboratoires dont seulement 20 parmi les pairs).

Le programme d'assurance qualité NEQAS propose l'évaluation externe de la qualité dans de nombreux domaines, dont le phénotypage lymphocytaire. Il s'agit d'un programme anglais diffusé dans le monde entier qui permet la confrontation des résultats de plusieurs centaines de laboratoires réalisant du phénotypages lymphocytaires. Il propose deux programmes auxquels nous participons : United Kingdom National External Quality Assurance Service (UK NEQAS) et fournit 6 consultations annuelles de 2 échantillons de sang stabilisé avec un nombre de participants d'environ 450 dont plus de 150 dans notre groupe de pairs (NAVIOS). Pour l'AQUIOS CL, technologie nouvelle, nous n'avons pas d'information.

5.2.3 Planification

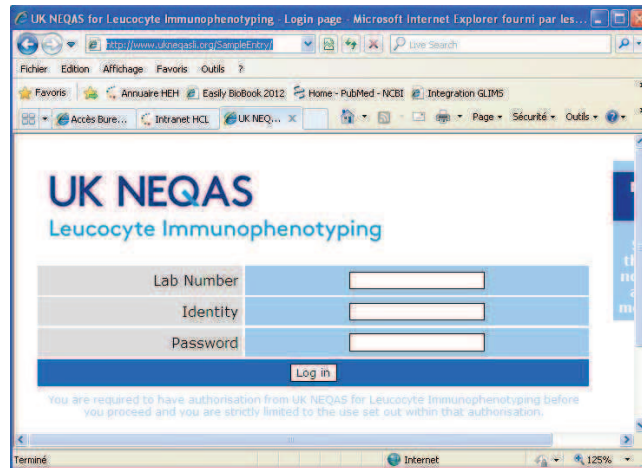
La planification du contrôle national est consultable sur le site de l'ANSM :

[http://ansm.sante.fr/Activites/Controle-national-de-qualite-des-analyses-de-biologie-medicale-CNQ/Calendrier-des-operations/\(offset\)/4](http://ansm.sante.fr/Activites/Controle-national-de-qualite-des-analyses-de-biologie-medicale-CNQ/Calendrier-des-operations/(offset)/4)

Pour le NEQAS, la première consultation a lieu en Mai puis tous les deux mois environ. Chaque consultation est précédée de l'envoi d'un message électronique au responsable du CQ indiquant l'envoi de l'échantillon, mais les dates précises ne sont pas connues à l'avance.

Deux abonnements sont nécessaires auprès de NEQAS :

- Le premier pour le Navios : <http://www.ukneqasli.org/SampleEntry/>

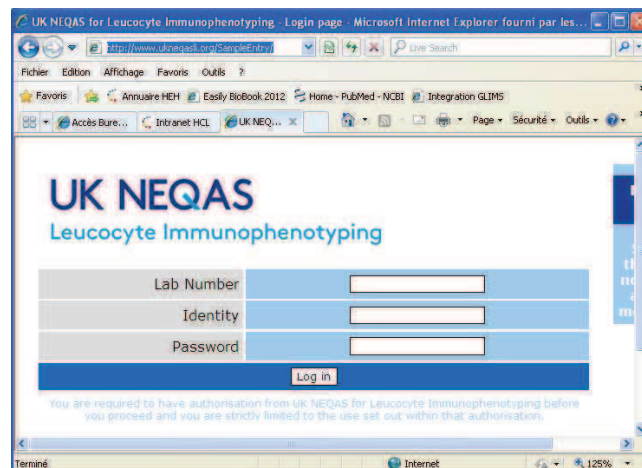


Lab Number 40375

Identity 6545

PW : Iku3sa

- Le second pour les AQUIOS CL : <http://www.ukneqasli.org/SampleEntry/>



Lab Number 46216

Identity 6545

PW : Iku3sa

A chaque consultation, les 2 échantillons seront passés sur les deux AQUIOS CL et les résultats de l'échantillon impair sera rendu sur l'AQUIOS CL AY 39049 et l'échantillon pair sur l'AQUIOS CL AY47058. Ainsi, chacun des automates en miroir aura 6 EEQ par an.

A réception, une fiche de suivi est complétée :

[MU-ANA-DE-006-XX](#)

LBMMS - EEQ : FORMULAIRE DE SUIVI

Ces échantillons sont enregistrés en double, analysés comme des patients, selon les modalités indiquées par l'organisateur de la consultation.

5.2.4 Enregistrement

Se référer à la procédure d'enregistrement des examens d'Immunologie dans GLIMS : **HI-INFO-IT-003** pour les généralités.

- Pour le contrôle ANSM :

Le patient est ZZZ_QC_ANSM_PHENOLYMPH.

Noter le N° de la consultation et de l'échantillon en Info CR.

La date de prélèvement est la date d'expédition

Enregistrer HLT HCD19 et HNK

- Pour les contrôles NEQAS :

Le patient est ZZZ_QC_NEQAS_IMMUNOMONITORING.

Noter le N° de la consultation et de l'échantillon en Info CR.

La date de prélèvement et l'heure de prélèvement sont celles du message électronique d'envoi des échantillons.

Enregistrer HLT HCD19 et HNK

5.2.5 Exploitation des résultats et interprétation

Les résultats des EEQ sont suivis :

- Valeur du laboratoire / valeur cible (toutes techniques) écart-type du groupe
- Calcul du biais en %
- Z score

Une note est attribuée en rapport avec nos performances :

- **ANSM** : communication de la moyenne et du CV en % pour l'ensemble des participants et le groupe de pairs

Attribution d'une note : A, B,...selon si la valeur est entre 0 et 1 écartype ou entre 1 et 2 ; + ou – selon si la valeur est > ou < à la valeur

Cette note est donnée en toutes techniques et par groupe de pairs.

- **NEQAS** : communication de la moyenne et de l'écartype pour l'ensemble des participants, ainsi que de la répartition des valeurs des participants (histogrammes) ; Communication des moyennes et Sd par appareil, réactif, fluorochrome et technologie.

Attribution d'une note : 0 si valeur au-delà de la valeur cible +/- 2 Sd, 1 entre 1 et 2 Sd et 2 entre 0 et 1 Sd

Suivi de la note cumulée sur 6 échantillons consécutifs

Suivi du Z score dans le temps

Suivi du cumul de 3 Z-scores

L'interprétation se fait conformément à **MU-ANA-PG-006**.

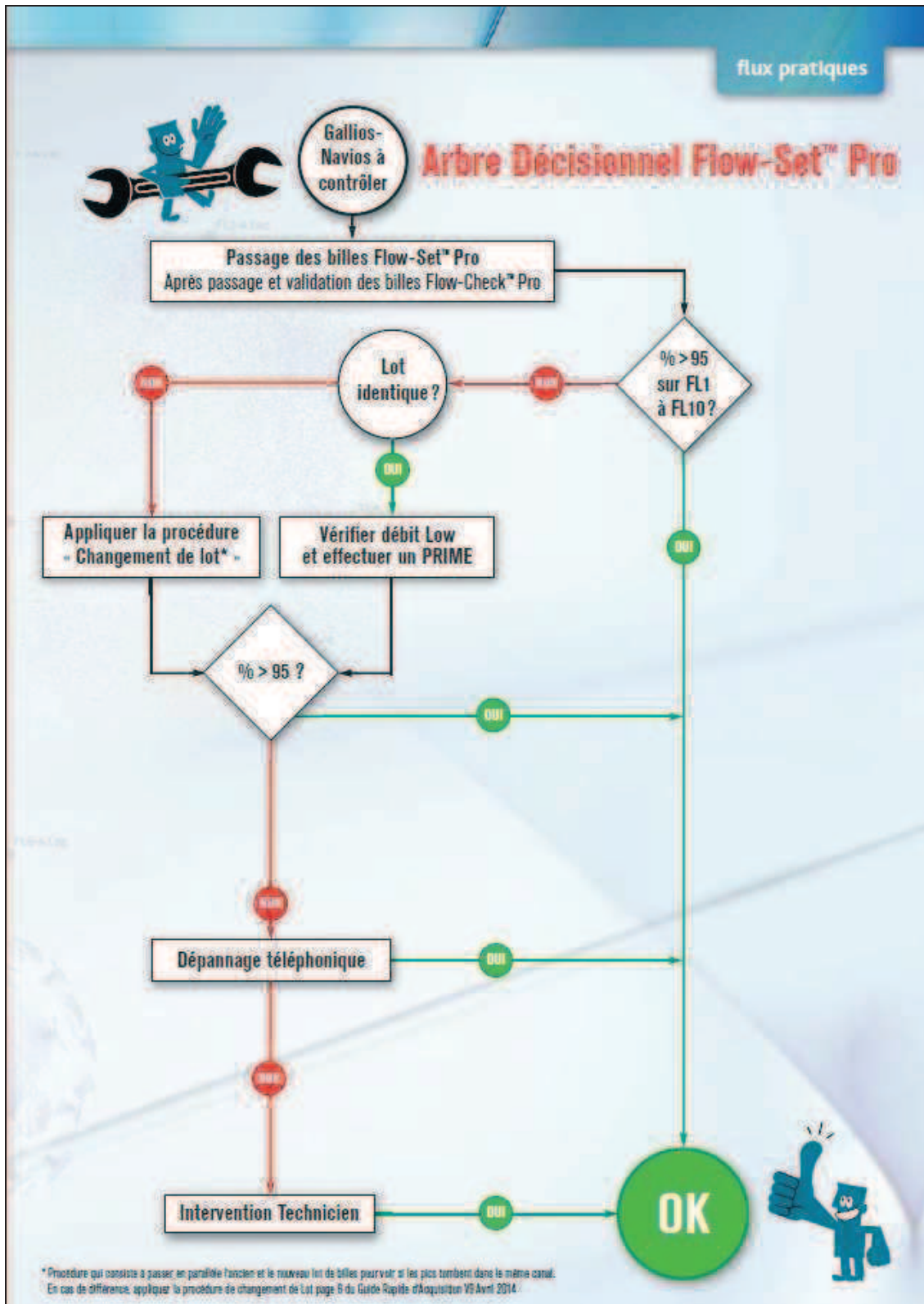
Les performances sont suivies au fil du temps avec le document **MU-ANA-DE-024**.

5.2.6 Archivage

L'ensemble des données est conservé dans un classeur réservé à chaque programme de contrôle dans le bureau de FPL et archivé ensuite dans le placard AQ.

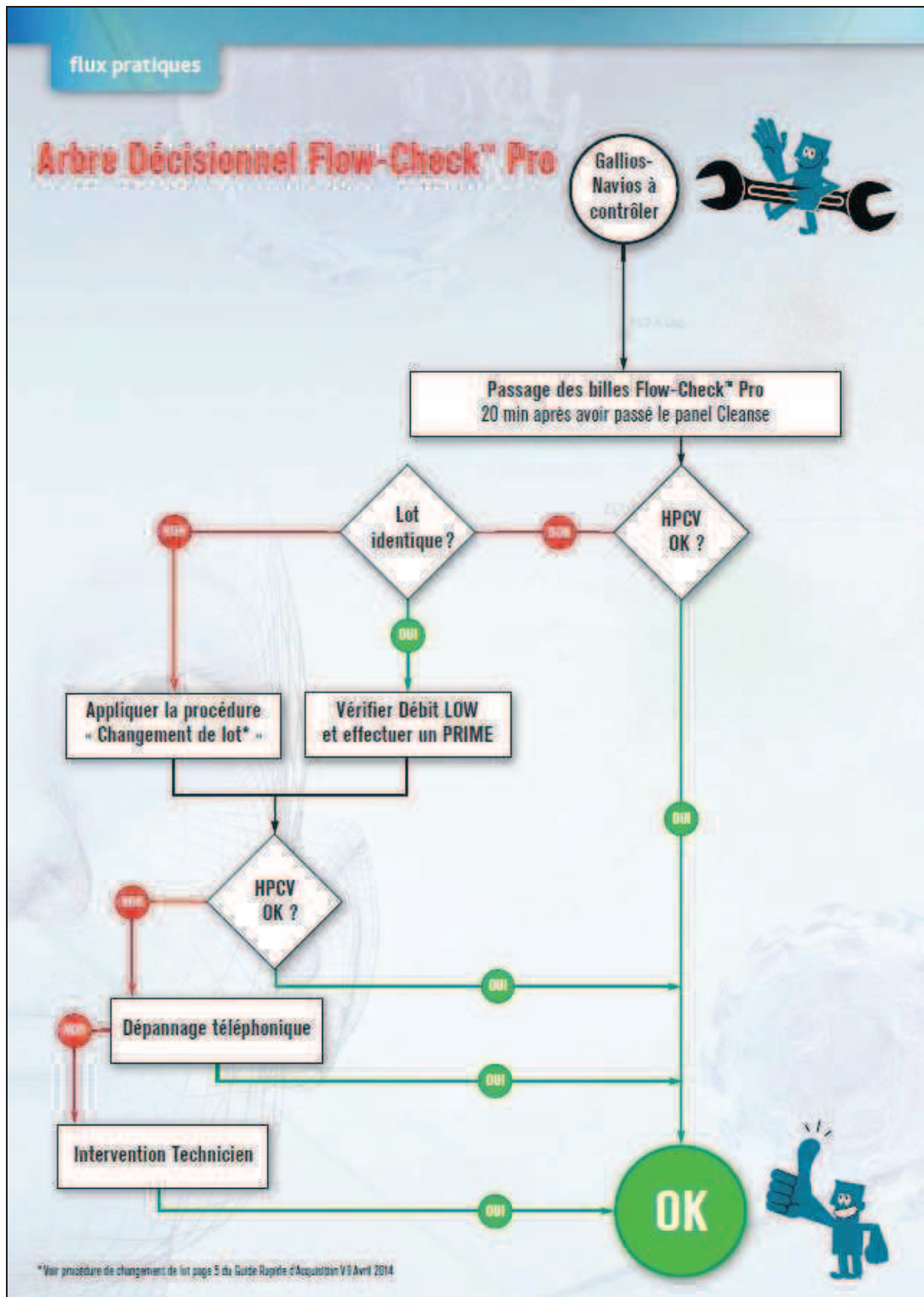
ANNEXE 1 : PROCEDURE QUALITE BECKMAN COULTER - ARBRE DECISIONNEL FLOW-SET

Informations données à titre indicatif. Les protocoles ont été adaptés en fonction des besoins du laboratoire



ANNEXE 2 : PROCÉDURE QUALITÉ BECKMAN COULTER - ARBRE DECISIONNEL FLOW-CHECK

Informations données à titre indicatif. Les protocoles ont été adaptés en fonction des besoins du laboratoire



**ANNEXE 4 : PROCEDURE DE VALIDATION TECHNIQUE ET
BIOLOGIQUE DES NUMERATIONS DE LYMPHOCYTES T CD3+, CD4+
et CD8+ (TETRA 1) SUR LE CYTOMETRE AQUIOS CL**

VALIDATION TECHNIQUE ET BIOLOGIQUE DES NUMERATIONS DE LYMPHOCYTES T CD3+, CD4+ et CD8+ (TETRA 1) SUR LE CYTOMETRE AQUIOS CL

1 Objet

Décrire la manière de valider techniquement et biologiquement les résultats produits par le cytomètre AQUIOS CL.

2 Champs d'application

Postes d'immunologie cellulaire : techniciens, biologistes, internes, personnels en formation.

3 Responsabilités

F. Poitevin / C. Malcus / G. Monneret

4 Définitions et abréviations

NFP : Numération Formule Plaquette

5 Contenu

1	Objet	1
2	Champs d'application	1
3	Responsabilités	1
4	Définitions et abréviations	1
5	Contenu	1
5.1	Validation technique	1
5.1.1	Eléments à vérifier au préalable dans l'onglet Résultats	1
5.1.2	Analyse qualitative des graphes de cytométrie	4
5.1.3	Cas d'une mauvaise lyse ou de la présence d'une population inhabituelle	5
5.2	Validation biologique	8

5.1 Validation technique

Les résultats sont exprimés en pourcentage de lymphocytes portant un antigène donné et en valeur absolue (éléments/ μ l).

Vérifier les valeurs des contrôles IMMUNOTROL pour valider les marquages du jour.

5.1.1 Eléments à vérifier au préalable dans l'onglet Résultats

L'onglet **Résultat, présentation « Details »**, utilisé pour la validation technique se présente de la façon suivante :

Trois points sont à vérifier systématiquement :

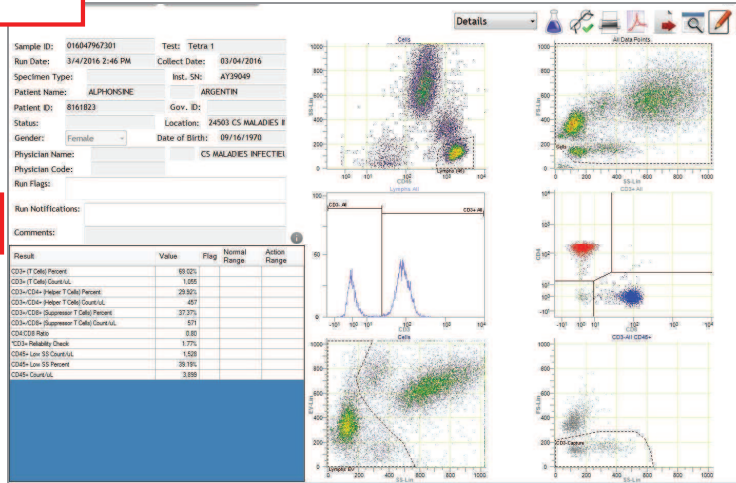
A/ Identification de l'échantillon : le « Sample ID » (numéro de travail GLIMS à 12 chiffres), le nom, prénom, date de naissance ainsi que le service prescripteur doivent figurer sur l'écran Résultat de l'AQUIOS CL.

B/ Absence d'alarme de l'automate sur l'échantillon. En cas d'alarme, le motif apparaît sur **fond rouge** dans la case « Run flag ». Il faut se référer au tableau ci-dessous (Tableau 5.7 du manuel technique AQUIOS) pour la conduite à tenir.

C/ Présence d'une notification, le motif apparaît dans la fenêtre « Run notifications » sur **fond orange**. Une notification n'entraîne, dans la majorité des cas, pas de repasse de l'échantillon. Il faut se référer au tableau ci-dessous (Tableau 5.8 du manuel technique Aquios) pour connaître la signification et la conduite à tenir suite à l'une de ces notifications.

Démographie : nom, prénom, DDD, service prescripteur, n° de travail GLIMS

Absence d'alarme
Absence de notification



Les alarmes recensées par Beckman Coulter sont les suivantes :

Alarme	Definition	Action recommandée pour l'utilisateur
Insuffisant Lysing (Lyse insuffisante)	Trop de globules rouges mesurés dans l'échantillon.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Assurez-vous que le volume de réactif de lyse est suffisant. 2. Rejetez et refaites une demande dans le menu Review Options (Options de révision). 3. Si le problème persiste, changez le coffret de réactif de lyse. 4. Si le problème persiste, contactez votre représentant Beckman Coulter local.
Insuffisant Lymphs (Lymphocytes insuffisants)	Nombre de lymphocytes mesuré trop faible.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Contrôlez les résultats de l'échantillon sur l'écran Review (Révision). Cette alarme peut être liée à un donneur ou réglée en ré-ajustant manuellement le fenêtrage. 2. Si la condition affecte les résultats, sélectionnez Reject, Re-Request (Rejeter, refaire une demande) à partir du menu Review Options (Options de révision). 3. Si le problème persiste sur différents échantillons, contactez votre représentant Beckman Coulter local.
No Events (Aucun événement)	Nombre de points de données dans l'échantillon insuffisant.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Exécutez un cycle de nettoyage à l'eau de Javel. 2. Rejetez et refaites une demande dans le menu Review Options (Options de révision). 3. Si le problème persiste, contactez votre représentant Beckman Coulter local.
Compensation Flag (Alarme de compensation) (Contrôle seulement)	Les populations ne s'alignent pas comme attendu.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Examinez les résultats pour confirmer l'échec de la compensation. 2. Répétez le contrôle de qualité. Voir la section Analyse des échantillons de CQ dans le CHAPITRE 3, Contrôle de qualité. 3. Répétez le contrôle de qualité avec de nouveaux flacons de cellules de contrôle et de nouveaux réactifs monoclonaux. 4. Réglez la compensation. Voir Réglage manuel de la compensation. 5. Si le problème persiste, contactez votre représentant Beckman Coulter local.
Inter Panel Count Error (Erreur de valeurs interpanels)	Les numérations Tetra-1 à Tetra-2+ des CD3+ et CD45+ SS faible sont incohérentes.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Exécutez un cycle de nettoyage à l'eau de Javel. 2. Rejetez et refaites une demande dans le menu Review Options (Options de révision). 3. Si le problème persiste, contactez votre représentant Beckman Coulter local.

Remarque : Cette liste d'alarme n'est pas exhaustive, il existe d'autres types d'alarmes :

« Clog or Bubble » : le système a détecté une bulle ou un microcaillot.

« Short draw » : le système a un doute sur prise d'essai (volume insuffisant, prélèvement dilué,...)

➔ Dans ces cas, prévenir le biologiste pour connaître la conduite à tenir.

Si le message d'erreur est suivi de « Rerun », l'AQUIOS a réalisé de lui-même une seconde prise d'essai dans la cupule. Analyser avec attention l'aspect des graphes de ce nouveau passage et s'ils sont satisfaisants, le résultat peut être validé malgré la présence d'une alarme.

Les **notifications** recensées par Beckman Coulter sont les suivantes :

Alarme	Définition	Action recommandée pour l'utilisateur
Under lysed (Sous-lysé)	Nombre important de globules rouges mesuré dans l'échantillon.	<ol style="list-style-type: none"> Tous les globules rouges peuvent ne pas être lysés dans les conditions suivantes : présence de globules rouges nucléés, concentration protéique anormale ou hémoglobinopathies. Une sous-lyse plus importante est également observée pour des contrôles ou des échantillons analysés à la limite inférieure de la plage de température ambiante. L'utilisation de CD45 en tant que condition de contour d'intérêt des lymphocytes permet de s'assurer que les RBC (globules rouges), en tant qu'événements négatifs CD45, ne sont pas inclus dans le contour d'intérêt des lymphocytes (voir les Figure 5.19 et Figure 5.20). Assurez-vous que l'intégrité du contour d'intérêt des lymphocytes sur l'affichage EV est préservée. Si la condition excède la performance attendue ou affecte l'intégrité du contour d'intérêt des lymphocytes sur l'affichage EV, sélectionnez alors Reject, Re-Request (Rejeter, refaire une demande) à partir du menu Review Options (Options de révision). Si le problème persiste sur différents échantillons, contactez votre représentant Beckman Coulter local.
Potential sample or gating issue (Problème éventuel d'échantillon ou de fenêtrage)	Possibilité de mauvais placement de la porte ou d'anomalie d'échantillon pouvant avoir une incidence sur les résultats.	<p>Cette notification peut être déclenchée par plusieurs conditions</p> <ol style="list-style-type: none"> Examinez la diffraction lumineuse et les schémas de l'EV. Si la diffraction lumineuse ou les schémas de l'EV sont perturbés, rejetez l'échantillon et refaites une demande. Voir les Figure 5.21, Figure 5.22 et Figure 5.23. Revoyez les limites des contours d'intérêt et des régions ; pour ajuster les régions, voir la section Modification des régions d'un échantillon à examiner. Revoyez les contrôles de fiabilité du CQ ; pour vérifier les contrôles de fiabilité, voir Contrôles analytiques de la fiabilité. Revoyez la compensation de l'échantillon pour vérifier la compensation. Réglage manuel de la compensation seulement si le problème apparaît sur différents échantillons. Si le problème persiste sur différents échantillons, contactez votre représentant Beckman Coulter local.
Low CD8 Positives (CD8 positifs bas)	La région des CD8 positifs comporte peu d'événements.	<ol style="list-style-type: none"> Contrôlez les résultats de l'échantillon sur l'écran Review (Révision). Cette notification peut être liée à un donneur ou réglée en réajustant manuellement le fenêtrage. Si l'étape 1 ne résout pas la condition, sélectionnez alors Reject, Re-Request (Rejeter, refaire une demande) à partir du menu Review Options (Options de révision). Si le problème persiste sur différents échantillons, contactez votre représentant Beckman Coulter local.
Low CD3 Positives (CD3 positifs bas)	La région des CD3 positifs comporte peu d'événements.	<ol style="list-style-type: none"> Contrôlez les résultats de l'échantillon sur l'écran Review (Révision). Cette notification peut être liée à un donneur ou réglée en réajustant manuellement le fenêtrage. Si l'étape 1 ne résout pas la condition, sélectionnez alors Reject, Re-Request (Rejeter, refaire une demande) à partir du menu Review Options (Options de révision). Vérifiez les niveaux des réactifs. Si le problème persiste sur différents échantillons, contactez votre représentant Beckman Coulter local.
Low CD3 Negatives (CD3 négatifs bas)	La région des CD3 négatifs comporte peu d'événements.	<ol style="list-style-type: none"> Contrôlez les résultats de l'échantillon sur l'écran Review (Révision). Cette notification peut être liée à un donneur ou réglée en réajustant manuellement le fenêtrage. Si l'étape 1 ne résout pas la condition, sélectionnez alors Reject, Re-Request (Rejeter, refaire une demande) à partir du menu Review Options (Options de révision). Vérifiez les niveaux des réactifs. Si le problème persiste sur différents échantillons, contactez votre représentant Beckman Coulter local.

Remarque :

Notre population d'étude inclut des patients très lymphopéniques en lymphocytes TCD4+ et CD8+ (suivi de l'infection par le VIH). La survenue des 3 dernières notifications du tableau ci-dessus n'est donc pas exceptionnelle. Elles ne doivent pas systématiquement conduire à une ré-analyse.

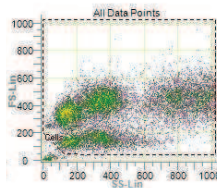
L'absence d'alarme et/ou de notification n'est pas suffisante pour valider techniquement un dossier. Il faut également analyser avec attention les graphes rendus.

5.1.2 Analyse qualitative des graphes de cytométrie

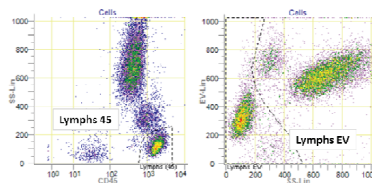
5.1.2.1 Cas des graphiques standards, sans problème de lyse ni population particulière

Se placer sur l'écran « Details »

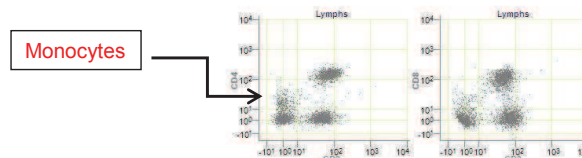
- Vérifier le fenêtrage « **Cells** », qui exclut les débris de faible taille (FS)



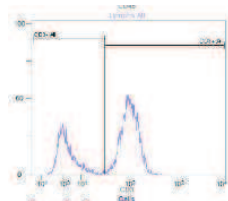
- Vérifier l'aspect des **graphes SS/CD45 et EV/SS** issus de la fenêtre « Cells » et s'assurer de la bonne séparation des populations leucocytaires.



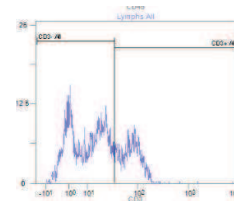
- Vérifier que le nuage des lymphocytes n'est pas tronqué du côté des CD45 faibles sur le graphe SS/CD45, traduisant le discriminant CD45 trop serré sur les leucocytes (fenêtre CD45Pos de AllData Points)
- Vérifier le fenêtrage des lymphocytes **Lymphs45** et **Lymphs EV**.
 - o Si nécessaire, modifier les fenêtres afin d'isoler au mieux la population lymphocytaire et d'obtenir un recouvrement et une pureté satisfaisante
 - S'aider de l'onglet « Dot plot » pour fenêtrer Lymphs45 : la contamination par les monocytes CD4^{faibles} est visible sur l'histogramme biparamétrique CD3/CD4.



- Sur l'**histogramme monoparamétrique CD3** fenêtré sur Lymphs All, s'assurer de la bonne séparation des pics CD3-All et CD3+All et en particulier de l'absence de population CD3^{faible} entre les 2 pics (correspondant à des monocytes).
 - o Si nécessaire, décaler la barre de gating pour être certain d'exclure les cellules CD3-

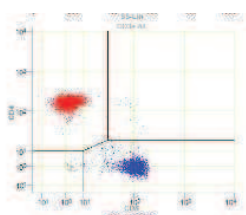


Bonne séparation des populations CD3- et CD3+

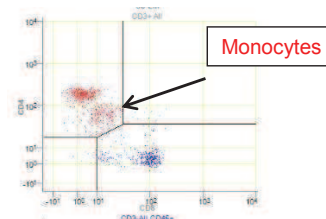


Population CD3^{faible} correspondant à des monocytes

- Sur la fenêtre **bi-paramétrique CD4/CD8** fenêtré sur CD3+All,
 - o S'assurer de l'absence de contamination des CD4+ par des monocytes (population CD4 faible apparaissant sous le nuage des LTCD4+).

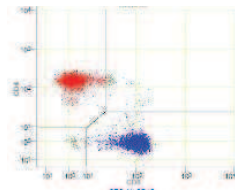


Bonne séparation des populations CD3- et CD3+

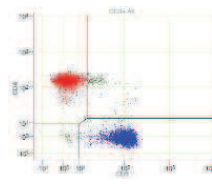


Population CD3 faible correspondant à des monocytes

- o Vérifier également l'absence (<2%) de lymphocytes doublement marqués (CD4+CD8+) et modifier si nécessaire les barres de gating pour numérer la population des doubles positifs.

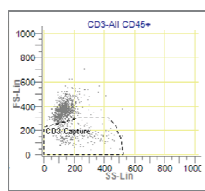


Doubles positifs (CD4+/CD8faibles) mal fenêtrés



Fenêtrage correct

- Sur le **graphe CD3-All/CD45+**, s'assurer du bon fenêtrage de la zone « **CD3- Capture** »
 - o Ne pas y inclure les cellules de plus grande taille (FS) et exclure les monocytes. Si des monocytes sont présents dans ce graphe, ils ont été inclus dans la fenêtre Lymphs CD45 et/ou dans LymphsEV et ont franchi le seuil de discriminant CD45 (histogramme AllDataPoints). Les cellules directement au-dessus de CD3-capture sont des lymphocytes non CD3 (B et NK).
 - o Si nécessaire, étirer cette fenêtre pour inclure les lymphocytes CD3- fortement granulieux.



Validation du résultat

Enregistrer les modifications en cliquant sur

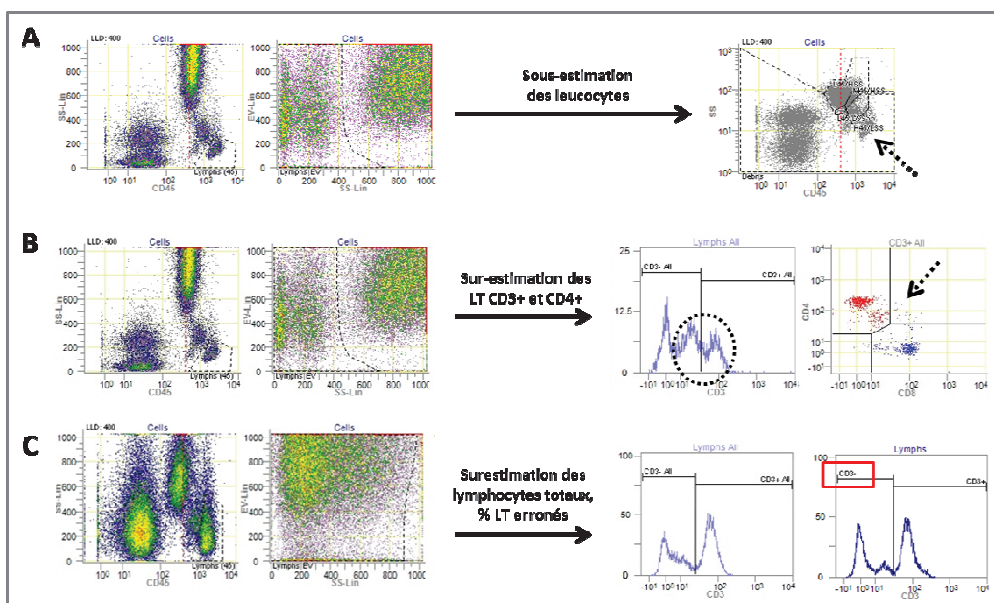
Si tous les critères ci-dessus sont satisfaits, valider techniquement le passage : « *Reviewed, sent to LIS* »
 Imprimer le LMD sous forme « Dots Plots » pour les échantillons sur lesquels un marquage en optilyse est également demandé.

Remarque : le résultat envoyé de l'AQUIOS CL au LPM est toujours le dernier passage enregistré, quel que soit le résultat affiché à l'écran (résultat initial ou rejoué).

5.1.3 Cas d'une mauvaise lyse ou de la présence d'une population inhabituelle

5.1.3.1 Mauvaise lyse

Elle peut être signalée par l'Aquios comme une alarme ou une notification (« Insufficient Lysing / Underlysed/ Potential error or gating issue »)
 La mauvaise lyse a plusieurs conséquences sur l'analyse et le résultat :

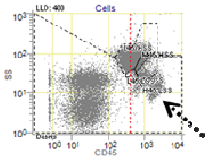


- Une perturbation du fenêtrage des sous-populations leucocytaires entraînant une numération des leucocytes erronée (A)
- Une perturbation de l'histogramme SS/EV empêchant d'éliminer les monocytes du fenêtrage Lymphs EV.
 - o Si la contamination ne touche que le pic CD3-All (pic CD3+All correct et pic CD3- correct +++): aucune conséquence sur les valeurs absolues et pourcentages des lymphocytes totaux et LT CD3, CD4 et CD8.
 - o Si la contamination touche le pic CD3+All: surestimation des valeurs absolues de lymphocytes totaux, LT CD3, LT CD4 et CD8 (B)
 - o Si la contamination touche le pic CD3-: surestimation des valeurs absolues de lymphocytes totaux, et % de LT CD3, LT CD4 et CD8 incorrects (C)
 - Ceci est le cas dans lorsque les graphes SS/EV ET SS/CD45 sont perturbés (ex: cas extrême de mauvaise lyse), entraînant une discrimination impossible des lymphocytes et monocytes sur le graphe SS/CD45,

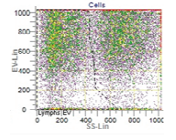
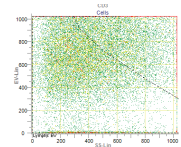
En effet, **Lymphocytes totaux = CD3+All + CD3-capture + CD3-**

Ainsi, la conduite à tenir en cas de mauvaise lyse :

- Sur le graphe SS/CD45 de l'onglet « compensation » : vérifier le fenêtrage des leucocytes totaux
 - o les érythrocytes/débris ne doivent contaminer aucune des sous-populations leucocytaires
 - o les 5 populations de leucocytes doivent être incluses dans le fenêtrage



- Sur le graphe SS/EV : repositionner le fenêtrage
 - o En englobant la totalité des cellules si le graphe présente un aspect de « rideau »
 - o En excluant au moins les PNN si la discrimination avec les monocytes/lymphocytes est toujours possible



- Sur le graphe SS/CD45 : repositionner la fenêtre Lymphs45 pour englober tous les lymphocytes en limitant le nombre de monocytes, avec l'aide de l'onglet « dot plot ».

Valider la démarche avec le biologiste de validation.

5.1.3.2 Hyperlymphocytose hors limite de linéarité des AQUIOS CL

La limite de linéarité des AQUIOS CL est de 25 000 lymphocytes totaux/ μ L et 10 000 LT CD4/ μ L selon les résultats de la validation de méthode.

En cas de d'hyperlymphocytose dépassant ces limites :

- Diluer l'échantillon au 10^{ème} dans du SAB et le repasser sur l'AQUIOS CL
- Si après dilution,
 - o Les leucocytes sont bien fenêtrés sur le graphe SS/CD45 de l'onglet « compensation »
 - o Lymphs45 et LymphsEV sont bien fenêtrés
 - o **Aucune population CD45 faible n'est visible**
 - o Aucune contamination par les monocytes n'est visible sur les CD3+All

→ On peut valider les résultats de l'AQUIOS en multipliant les valeurs absolues par le facteur de dilution +++

Si un de ces critères n'est pas respecté : **ré-analyser l'échantillon sur le Navios** (Tétra optilyse sans bille).

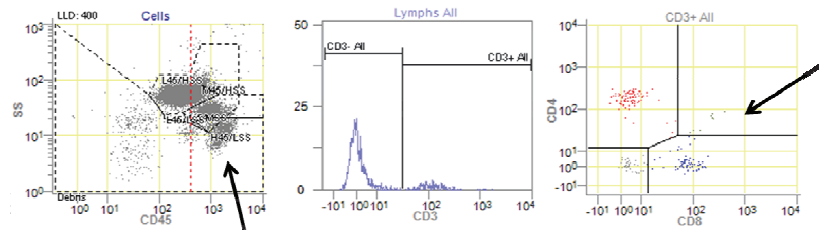
Dans tous les cas, prévenir le biologiste de validation.

5.1.3.3 Lymphopénie

Les échantillons lymphopéniques sont à traiter comme décrits ci-dessus dans le paragraphe 5.1.2.1

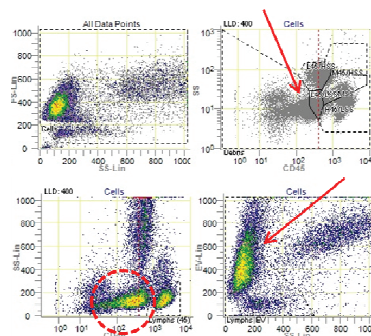
Etre attentif :

- Au graphe CD45LOG/SSLOG des leucocytes qui est souvent perturbé dans ces échantillons → demander au biologiste de validation de comparer les résultats à ceux de la NFP
- Privilégier le recouvrement lors du fenêtrage de LymphsEV et Lymphs45
- Histogramme monoparamétrique CD3All : le pic CD3+All est souvent difficile à distinguer, engendrant fréquemment l'apparition de cellules doublement marquées CD4+CD8+.
 - o Après avis du biologiste, repasser l'échantillon en Optilyse sans bille sur le Navios

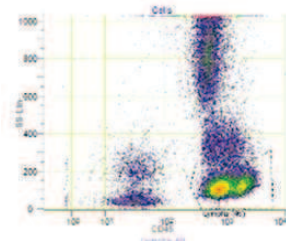


5.1.3.4 Présence d'une population CD45 faible

Dans le cas de certaines hémopathies malignes (leucémies lymphoïdes chroniques, leucémies aigües), on observe la présence d'une population lymphoïde exprimant faiblement le CD45.



Exemple d'une leucémie aigüe présentant une importante population CD45faible



Exemple de leucémie lymphoïde chronique présentant une population CD45faible

Les conséquences sur ce genre de bilan sont généralement les suivantes :

- Les leucocytes sont sous-estimés puisque l'histogramme en haut à droite est perturbé et exclut la population CD45faible du compte des leucocytes.
- Le nombre de lymphocytes est généralement incorrect car le discriminant CD45 (barre pointillée rouge) exclut une partie de cette population CD45faible de l'algorithme de numération
- Il n'est pas possible d'estimer le pourcentage de la population CD45faible avec les outils de l'AQUIOS CL.
- La population CD45faible sera, en partie ou complètement, incluse dans le compte de lymphocytes totaux car ces cellules sont indissociables des lymphocytes normaux sur le graphe SS/EV.
- Analyser le contenu de la cupule Aquios rapidement sur le Navios, avec le panel TETRA
- Si l'image reste ininterprétable, faire un marquage Tétré Optilyse.

Prévenir le biologiste de validation **et se référer aux algorithmes en ANNEXE 1 et 2** pour connaître la démarche à suivre..

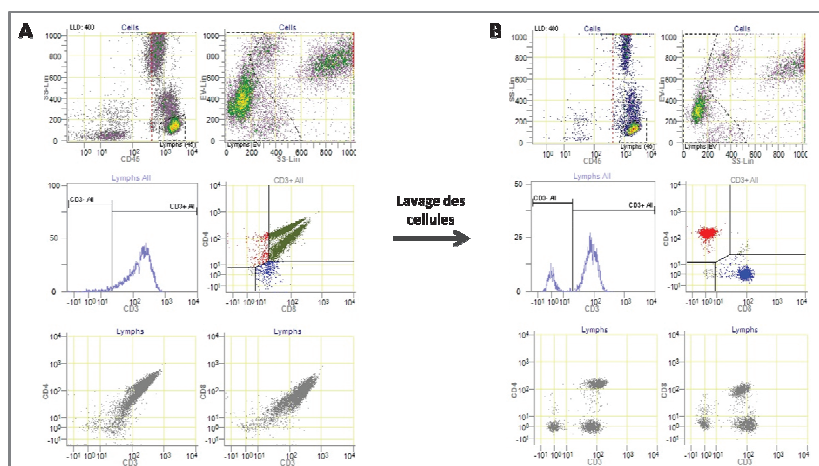
5.1.3.5 Marquage non spécifique

Un marquage non spécifique est visible sur l'onglet « dot plot » sur les graphes biparamétriques CD3/CD4 et CD3/CD8, ainsi que sur l'onglet « details » sur l'histogramme biparamétrique CD4/CD8.

Dans ce cas, **ré-analyser l'échantillon à partir de cellules « lavées »**

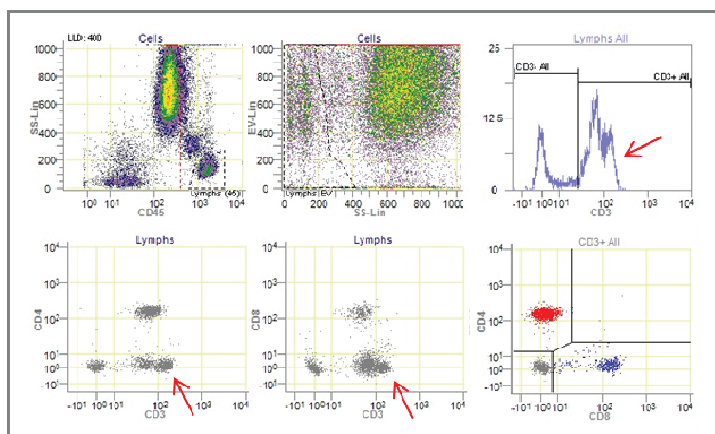
Cf procédure HI-ANA-MT-017 marquage sur cellules lavées

- 1) 300 µL sang total + 2 mL de PBS
- 2) Vortexer
- 3) Centrifuger 6min à 300g (Programme 1)
- 4) Eliminer le surnageant
- 5) Répéter les étapes 1) à 4)
- 6) Reprendre le culot dans 300 µL de SAB
- 7) Passer le tube sur l'AQUIOS CL



5.1.3.6 Lymphocytes double-négatifs (CD3 forts ou alpha bêta)

Sur certains bilans, une population de lymphocytes T CD4- et CD8- peut être mise en évidence. Il peut s'agir de lymphocytes exprimant le CD3 plus fortement que les autres (lymphocytes T CD3 gamma delta) ou bien de lymphocytes T CD3 alpha beta ; ces lymphocytes n'expriment ni le CD4 ni le CD8.



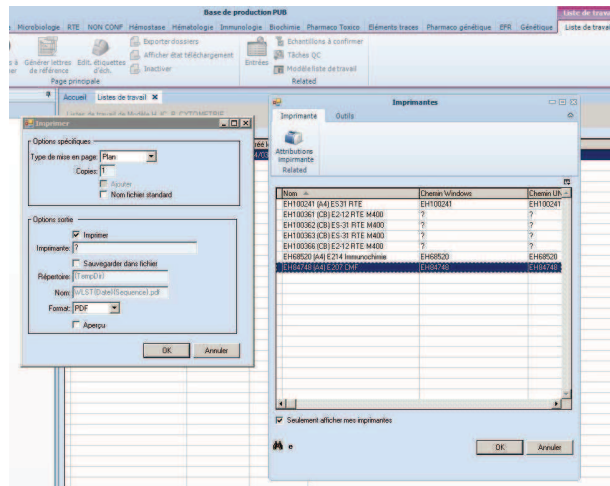
Si le résultat « **CD3+ reliability check** » est > 10% : prévenir le biologiste de validation pour un éventuel marquage supplémentaire des TCR $\gamma\delta$ et $\alpha\beta$ ou marquage « double-négatif ».

5.2 Validation biologique

La validation biologique permet de s'assurer de la qualité globale du résultat rendu après validation technique, plus particulièrement de la concordance avec les antécédents, avec les résultats de NFP d'hématologie cellulaire du jour et de la cohérence avec les données cliniques et thérapeutiques du patient.

1) Ouvrir une session GLIMS

2) Imprimer régulièrement la liste de travail du jour en passant par l'onglet Immunologie → LDT → LDT CYTOMETRIE → OK. Sélectionner le format PDF puis choisir l'imprimante en double cliquant sur la ligne de l'imprimante.



3) Ouvrir la liste de validation du jour (Immunologie → Validation biologique → Validation biologique Immunocell) puis dans « Options » Sélectionner « Afficher résultat image » pour voir apparaître les graphes de l'AQUIOS transmis par LPM (6 images correspondant à la fenêtre « Details »)

4) S'assurer de la bonne séparation des nuages des populations d'intérêt (cf § 1. de la validation technique). Dans le cas contraire, « rejouer » le résultat en modifiant les fenêtres sur l'écran de l'Aquios et en renvoyant les nouveaux résultats sur LPM.

5) La validation technique telle que décrite dans le chapitre précédent permet de traiter les anomalies observées en particulier sur les graphes CD45Log/SSLin, EVLin/SSLin et CD3 All. Elle ne prend cependant pas en compte le graphe des leucocytes CD45Log/SSLin, ni le graphe CD45 sur AllDataPoints de la matrice de 16 histogrammes. Des anomalies peuvent également survenir sur ces graphes et ne pas être visualisées en routine. C'est la validation biologique qui permet de les rechercher, en particulier en vérifiant systématiquement la concordance avec les antécédents, ainsi qu'avec un **NFP** du jour, si elles sont disponibles.

La validation biologique va donc suivre l'algorithme en ANNEXE 1.

- Rechercher dans GLIMS le résultat de la NFP et les résultats de phénotypage lymphocytaire antérieurs lorsqu'ils existent :
 - o Pour les CD3, CD4 et CD8 % : différence >5% refaire le marquage si nécessaire après avis biologique (concordance clinico-biologique)
 - o De manière générale, un écart maximum de +10% à -20 % entre les lymphocytes de la NF et notre résultat est acceptable (soit par exemple pour des lymphocytes NF à 2000, la fourchette est de 1600-2200).

Toute discordance même minime implique la révision des histogrammes Aquios pour s'assurer qu'une anomalie sans alarme n'est pas la cause de la discordance et l'application de l'algorithme de validation biologique.

Il n'est pas rare d'avoir un nombre de lymphocytes discordants avec des leucocytes concordants en particulier en cas de formule manuelle. Rarement il est possible d'avoir un nombre de lymphocytes concordants avec des leucocytes discordants en particulier en cas de nombreux éléments mal lysés contaminants la fenêtre des leucocytes.

Cas particuliers :

- Anomalie d'un graphe, **mauvaise lyse** : **se référer** à l'algorithme de validation biologique
- En cas de présence significative (>2%) de **lymphocytes double positifs CD3+/CD4+/CD8+**, ajouter un commentaire sur la ligne du pourcentage de CD3, CD4 ou CD8 selon le cas (exemple : 2,5% des lymphocytes expriment simultanément CD4 et faiblement CD8). Pour cela, se placer dans commentaire externe, appuyer sur la touche « Inser », sélectionner le commentaire préétabli adéquat
- Si la population de **lymphocytes double-négatifs CD3+/CD4-/CD8-** est >10%, penser à rajouter un panel T3TCR et/ou « doubles négatifs » selon le contexte clinique.
- En cas de présence d'une **population CD45faible** dans le nuage des lymphocytes
 - o Sur le Navios, fenêtrer cette population pour évaluer sa proportion parmi la population lymphoïde
 - o Dans certains cas (LLC, petites cellules, éléments altérés...), la discordance avec la NFP peut être expliquée par un discriminant de taille trop haut ou par l'agressivité de la lyse qui élimine des cellules. Sur le Navios, essayer de repasser les échantillons avec un **discriminant à 50**. Revoir le résultat pour y associer un commentaire.
 - o Sur Glims, mettre un commentaire sur le pourcentage de lymphocytes
 - Si la population CD45faible est bien discriminée des lymphocytes normaux : « On note la présence de x% d'une population de cellules exprimant faiblement CD45 (polynucléaires basophiles? éléments immatures? blastes? »
 - Si la discrimination entre la population CD45faible et les lymphocytes normaux n'est pas possible : « On note la présence d'une population de cellules exprimant faiblement CD45 (polynucléaires basophiles? éléments immatures? blastes?). La numération a été effectuée sur l'ensemble de la population lymphoïde. »
- **Hyperlymphocytose hors limite de linéarité**: Voir validation technique 5.1.3.2
 - o En cas de réanalyse sur le Navios, valider les pourcentages issus de la ré-analyse sur le Navios et calculer les valeurs absolues à partir de la NFP.

- Dans ce cas, supprimer l'analyse technique Aquios/Navios et ajouter HNUMH : « *technique du laboratoire ayant utilisé la NFP.* »
 - En l'absence de résultats de NFP, et si les difficultés proviennent d'une forte population CD45 faible, ne pas rendre les valeurs absolues et ajouter un commentaire : « *L'analyse de cet échantillon par cytométrie ne permet pas de rendre les valeurs absolues des sous-populations lymphocytaires.* »
- **Marquage non spécifique** : il faut refaire le marquage sur cellules « lavées » sur l'AQUIOS CL.
- Dans ce cas, seuls les pourcentages peuvent être rendus à partir d'un tel résultat. Les valeurs absolues de leucocytes et de lymphocytes totaux doivent être rendues à partir du passage initial et les autres VA (lymphocytes CD3, CD4, CD8) doivent être calculées à partir des pourcentages issus du deuxième passage sur l'AQUIOS CL.

Une fois que les résultats auront satisfait le biologiste de validation, **confirmer** puis **valider** biologiquement le résultat.

ANNEXE 1 : ALGORITHME DE VALIDATION DES RESULTATS PROBLEMATIQUES

ALGORITHME DE VALIDATION BIOLOGIQUE DES NUMERATIONS CD3, CD4, CD8 SUR AQUIOS CL

La validation technique conformément au 5.1 a permis de détecter les anomalies visibles sur les graphes analysés. Les données ont été retraitées si besoin.

Validation technique conforme
ET résultats concordants avec les ATCD :
 - Ecart entre -10 et +20% pour les VA des lymphocytes
ET résultats concordants avec la NFP si ATCD discordants ou indisponibles :
 - Ecart < 3% pour les pourcentages de sous-populations lymphocytaires

Validation technique non conforme
Ou résultats discordants avec NFP:
 - Ecart non compris entre -10 et +20% pour les VA des lymphocytes
Ou résultats discordants avec les ATCD sans NFP disponible
 - Ecart > 5% pour les pourcentages de sous-populations lymphocytaires

- ETAPE 2: consulter la matrice de 16 histogrammes**
- 1 Graphe des leucocytes CD45LOG/SSLOG
 - 2 Discriminant CD45
 - 3 Fenêtrage Lymphs 45 sur le graphe CD45LOG/SSLIN
 - 4 Fenêtrage Lymphs EV sur le graphe EVLIN/SSLIN
 - 5 Population CD3- sur Lymphs et CD3+All sur LymphsAll

- RISQUES**
- Ne pas prendre tous les leucocytes ou inclure des érythrocytes mal lysés
 - Exclure des lymphocytes CD45 faible
 - Inclure des monocytes ou PNB / perdre en recouvrement / exclure des CD45 faibles
 - Inclure des monocytes / perdre en recouvrement
 - Surestimer le compte de lymphocytes totaux et LT CD3, CD4 et CD8

Fenêtrage des leucocytes sur CD45LOG/SSLOG et Disc45

Leucocytes incorrects

Leucocytes corrects

Fenêtrage Lymphs EV et Lymphs 45

Fenêtrage Lymphs EV et Lymphs 45

Anomalie à la fois du Lymphs EV et du Lymphs 45

Anomalie uniquement du Lymphs EV ou du Lymphs 45

Anomalie à la fois du Lymphs EV et du Lymphs 45

Anomalie uniquement du Lymphs EV ou du Lymphs 45

% et VA incorrects Lymphocytes totaux, LT CD3, CD4 et CD8

Contamination de CD3+All ou CD3-
% et VA incorrects Lymphocytes totaux, LT CD3, CD4 et CD8

% et VA incorrects Lymphocytes totaux, LT CD3, CD4 et CD8

Contamination de CD3+All ou CD3-
% et VA incorrects Lymphocytes totaux, LT CD3, CD4 et CD8

CD3+All correct ET CD3- correct
Tous les résultats sont corrects

Marquage Optilyse sans bille sur Navios**

Analyse sur Navios de la cupule AQUIOS**

Marquage Optilyse sans bille sur Navios**

Analyse sur Navios de la cupule AQUIOS**

Tous les résultats sont corrects

ETAPE 3: conduite à tenir pour le rendu des résultats

Leucocytes	AQUIOS
Lymphocytes (%)	AQUIOS
Lymphocytes (VA)	AQUIOS
CD3+ (%)	AQUIOS
CD3+ (VA)	AQUIOS
CD4+ (%)	AQUIOS
CD4+ (VA)	AQUIOS
CD8+ (%)	AQUIOS
CD8+ (VA)	AQUIOS

NFP*	NFP*	NFP ou disc
NFP*	NFP*	NFP ou disc
NFP* + code « HNUMH »	NFP* + code « HNUMH »	AQUIOS
NAVIOS	NAVIOS	AQUIOS
Calcul*	Calcul*	AQUIOS
NAVIOS	NAVIOS	AQUIOS
Calcul*	Calcul*	AQUIOS
NAVIOS	NAVIOS	AQUIOS
Calcul*	Calcul*	AQUIOS

AQUIOS	AQUIOS	AQUIOS
NAVIOS	NAVIOS	AQUIOS
Calcul	Calcul	AQUIOS
NAVIOS	NAVIOS	AQUIOS
Calcul	Calcul	AQUIOS
NAVIOS	NAVIOS	AQUIOS
Calcul	Calcul	AQUIOS
NAVIOS	NAVIOS	AQUIOS
Calcul	Calcul	AQUIOS

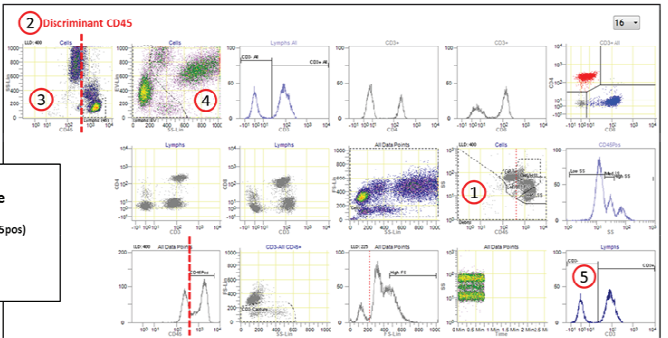
* Si aucune NFP n'est disponible, ne rendre que les % issus du Navios et noter un commentaire: « L'analyse de cet échantillon par cytométrie ne permet pas de rendre les valeurs absolues des sous-populations lymphocytaires »

** Si la pureté est insuffisante, le résultat pourra être rendu en tenant compte de la contamination par les monocytes et en appliquant la correction proposée dans HI-PostA-IT-001

Tous les résultats présentant une anomalie phénotypique ou analytique doivent être accompagnés d'un commentaire

RAPPEL:
 Lymphocytes totaux (VA) = CD3+All + CD3- + CD3-capture
 (Lymphs 45 OU Lymphs EV) (Lymphs 45 ET Lymphs EV) (CD3+All ET CD45pos)

CD3/CD4/CD8 en VA issus de CD3+All
 CD3/CD4/CD8 en %: VA rapportées aux VA des lymphocytes totaux



Matrice 16 histogrammes

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon est engagé dans une démarche de lutte contre le plagiat. De ce fait, une sensibilisation des étudiants et encadrants des thèses a été réalisée avec notamment l'incitation à l'utilisation d'une méthode de recherche de similitudes.

GOSSEZ Morgane

Evaluation de l'AQUIOS CL pour la numération en valeur absolue des lymphocytes T CD4.

Thèse de Pharmacie, Lyon 1, 2016

RESUME

Contexte. La cytométrie en flux (CMF) simple-plateforme basée sur l'utilisation de billes calibrées représente la technique de référence de la numération des valeurs absolues de lymphocytes T (LT) CD4. La précision et la reproductibilité de cette analyse biologique sont fondamentales, notamment dans le cadre du suivi des patients séropositifs au Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH). Or, il s'agit d'une méthode complexe, coûteuse, nécessitant des opérateurs qualifiés. Récemment, une méthode alternative, automatisée, basée sur une approche volumétrique ne nécessitant pas de billes de quantification a été proposée (Cytomètre AQUIOS CL, Beckman Coulter). Cette technologie pourrait ainsi améliorer la standardisation et l'accréditation des résultats de numération des LT CD4.

Objectifs. Le but de cette thèse a été d'évaluer les performances et la mise en place en routine de deux cytomètres AQUIOS CL dans un laboratoire de biologie clinique.

Méthode. Nous avons effectué une première étude des performances de l'AQUIOS CL avant sa commercialisation (évaluation type β -test sur site). Par la suite, nous avons réalisé une validation de méthode pour deux AQUIOS CL installés au laboratoire, selon les recommandations du COFRAC (Comité Français d'Accréditation). Enfin, nous avons évalué leur mise en pratique en routine pendant les six premiers mois d'utilisation.

Résultats. Les résultats très satisfaisants du β -test ont été récemment publiés (Gossez *et al.* Cytometry 2016) et ont conforté le choix des AQUIOS CL pour la réalisation en routine des numérations de LT CD4 au laboratoire. La validation de méthode a confirmé les performances dans le cadre des exigences du COFRAC (e.g. pour les LT CD4/ μ L - CV reproductibilité selon les niveaux de concentrations : 2,8-5,5% ; CV répétabilité : 2,0-5,0%). Les premiers mois d'utilisation ont permis d'identifier quelques problèmes mécaniques résolus depuis par l'industriel. Nous avons également mis en évidence des problèmes de lyse des érythrocytes pour lesquels nous avons défini des algorithmes décisionnels permettant la validation biologique. Enfin, malgré un changement radical des pratiques, l'arrivée de l'AQUIOS CL a été bien vécue par l'équipe du laboratoire (techniciens, internes et praticiens).

Conclusion. Cette étude illustre l'intérêt de l'AQUIOS CL pour la numération des LT CD4 en routine clinique dans un laboratoire hospitalier d'immunologie cellulaire. Ces résultats seront à confirmer sur une plus longue période d'étude, et à confronter avec ceux d'autres laboratoires équipés de cette nouvelle technologie. D'une manière plus générale, ce travail s'inscrit dans l'effort actuel de standardisation de la cytométrie en flux en clinique.

MOTS CLES : Lymphocytes T CD4, valeurs absolues, cytométrie en flux, standardisation, validation de méthode

JURY M. MONNERET Guillaume, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
M. DUMONTET Charles, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Mme CARCELAIN Guislaine, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
M. FRANCE Georges, Docteur en Pharmacie, GSK - Global Quality Lead for Local Operating Companies
Mme POITEVIN-LATER Françoise, Praticien Hospitalier

DATE DE SOUTENANCE Vendredi 14 octobre 2016

ADRESSE DE L'AUTEUR 7 rue Bodin, 69001 LYON