



Assistance Publique
Hôpitaux de Marseille

Tests de prolifération lymphocytaire

Saison 6:Accréditation

Une avancée vers une harmonisation des pratiques
entre les laboratoires

CQ interlaboratoires

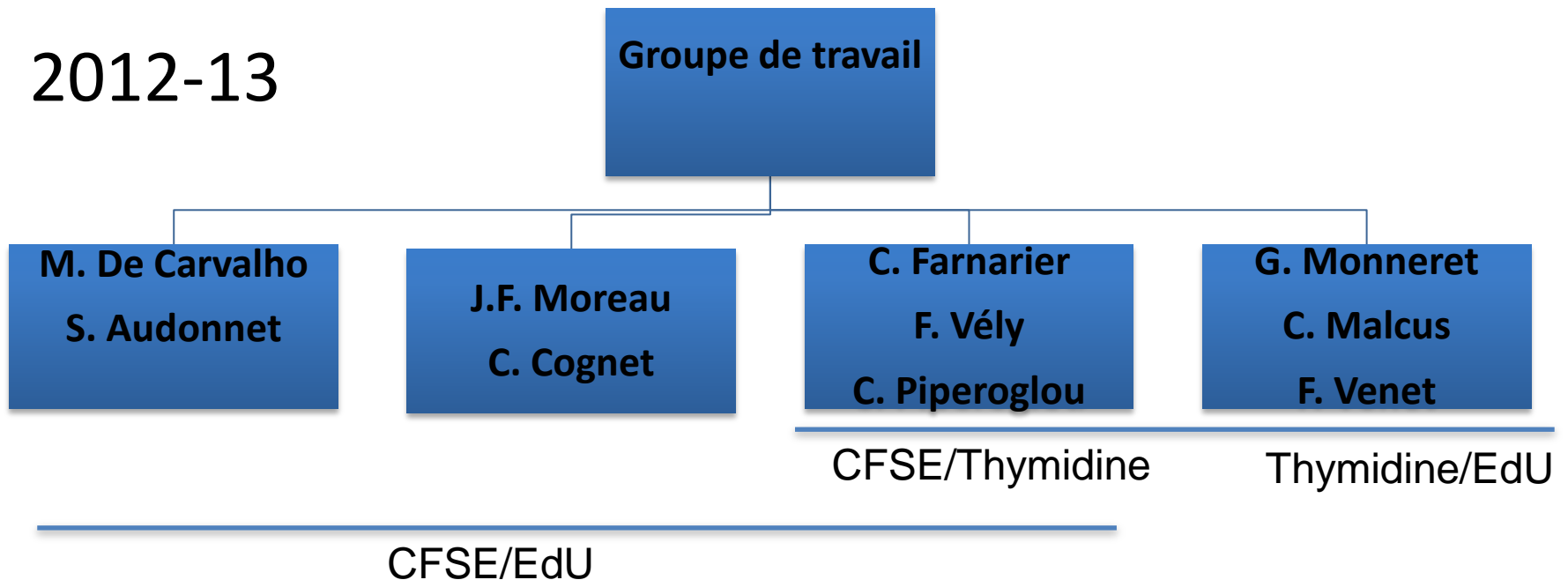
C. Farnarier

pour le Groupe de travail sur les tests de prolifération

Journée des labo. d'Immunologie, réseau CEREDIH
Jeudi 15 décembre 2016

Historique de l'action du groupe de travail

- 2009 présentation d'une technique froide: le CFSE
- 2010-11 les différentes pratiques des 18 laboratoires réalisant les tests de prolifération sur les 30 laboratoires consultés
- 2012-13



- printemps 2015 réunion de réflexion du groupe de travail 14 laboratoires
- Fin 2015 mise en place d'un CQ interlaboratoires
- Janvier 2016 présentation de la validation de methode nouvelle SH form et résultats du CQ interlaboratoires

Enquête TTL 2015

30 laboratoires interrogés 23 réponses :
18 réalisent un TTB et 5 sous-traitent pour le moment

Vers l'accréditation

- **Pré-analytique**

Prélèvement

- Héparinate NA ou LI, ACD , **EDTA attention**
- Acheminement et conservation à T ambiante
- Délai maximale de traitement de l'échantillon après prélèvement : 24H testé par Guita Maki et Hélène Moins

- **Préparation des cellules**

- cellules fraîches, cellules congelées si besoin ou nécessaire (technique de congélation et de décongélation envoyées aux labo mais non discutées)

- **Mise en culture**

- fonds plats , fonds ronds, mit.plat-Ag rond (testés Marseille)
- RPMI Glu ou Glutamax
- milieu conditionné AIMV Albumax ou AIMV Albumax +2%SAB
- Sérum
 - SVF 10%
 - SAB 10%-20% source=Biowest ou EFS?
 - Réserve d'un lot?
- PBMC 10^5 à $2 \cdot 10^5$ en triplicat minimum pour les antigènes
- Temps de culture : 3-3.5j mitogènes et 6-7 jours antigènes

• Agonistes

PHA: Sigma 1-100 μ g/ml max à 10 μ g/ml

Oxoid , Remel , 0,25 à 10 μ g/ml max à ?? μ g/ml Fisher??

PWM: Sigma (8) 0,5 à 50 μ g/ml

CD3 ebiosciences, Jansen-Cilag OKT3 10ng-50 μ g/ml

Beckman UCHT1 50-0.05 μ g/ml; HIT3a 1.5-5 μ g/ml

(penser aux produits culture azide, endotoxines...)

Candidine Biorad 0,025 à 50 μ g/ml, JPT technologies peptide,
HKCA Invivogen et Virion/Sérion à 10 μ g/mL testés par D. Monnier

Anatoxine tétanique Staten 0,025 à 50 μ g/ml, Pasteur

Tuberculine Staten 1 à 50 μ g/ml avec 5 μ g/ml majoritaire
problème d'approvisionnement

- **Révélation**

Thymidine tritiée (12)

BrdU lecture en plaque (1)

CFSE (4) + (2 en évaluation)

EdU en cytométrie 1 (2 en évaluation)

- **Résultats**

Interprétation seule: 3 laboratoires

Chiffres bruts ou calcul d'index + interprétation: 12 laboratoires

Répétabilité

Réalisée le 06/06/2014 sur PBMC issues d'une poche de l'EFS (poche 14) décongelées le 05/06/2014.

- **En % de lymphocytes totaux**

Echantillon	Nombre (N)	Moyenne	Ecart-type	CV%	CV % fournisseur	CV limite	Conclusion
Milieu niv 1	12	3.1	0,69	22,04	NA		conforme
CD3 niv 2	12	52.6	5,32	10,12	NA		conforme
PHA niv 3	12	77.2	1,06	1,38	NA		conforme

- **En% de lymphocytes CD3+**

Echantillon	Nombre (N)	Moyenne	Ecart-type	CV%	CV % fournisseur	CV limite	Conclusion
Milieu niv 1	7	2,3	0,38	16,45	NA		conforme
CD3 niv2	7	62,1	5,11	8,24	NA		conforme
PHA niv3	7	81,1	0,53	0,66	NA		conforme

Reproductibilité/ Fidélité intermédiaire

- CIQ: cellules congelées **une fois / semaine?**

Evaluation de la qualité

- CQ Interlaboratoires: cellules congelées

Fidélité intermédiaire :

Réalisée du 16/04/2014 au 27/06/2014 sur PBMC issues d'une poche de l'EFS (poche 14) décongelées la veille de chaque manipulation.

- **En % de lymphocytes totaux.**

Echantillon	Nombre (N)	Moyenne	Ecart-type	CV%	CV % fournisseur	CV limite	Conclusion
Milieu niv 1	9	3,3	1,00	30,26	NA	NA	conforme
CD3 niv2	9	50,6	8,25	16,31	NA	NA	conforme
PHA niv3	9	78,5	4,77	6,08	NA	NA	conforme

- **En % de lymphocytes T**

Echantillon	Nombre (N)	Moyenne	Ecart-type	CV%	CV % fournisseur	CV limite	Conclusion
Milieu niv 1	9	2,7	2,29	84,47	NA	NA	conforme
CD3 niv2	9	61,7	8,98	14,55	NA	NA	conforme
PHA niv3	9	84,0	5,26	6,27	NA	NA	conforme

Evaluation de la qualité

Contrôle interlaboratoires

18 laboratoires réalisent les tests de prolifération:

- 13 ont accepté de participer
- 11 ont pu rendre leurs résultats dans les délais

Objectifs

Court terme: Tester la faisabilité

Moyen terme: Avoir des résultats conduisant à une même conclusion pour le patient

Premier CQ inter-laboratoires

(envoi 8-12-15)

- Envoi en carboglace en 24H:
 - 1 amp de PBMC provenant d'une poche de L'EFS (P27)
 - 1 amp de PBMC provenant d'un Concentré Leuco-Plaquettaire (CLP-1)
- Accompagnées d'une procédure de décongélation

Mitogènes: rendus selon techniques

- **Thymidine** (7 laboratoires)
 - IS cpm stim/cpm BG
 - Δ cpm stim-cpm BG
 - CPM stim en comparant à la limite inférieure Normale
- **CFSE** (2 laboratoires)
 - Δ % CFSE dim stim- % CFSEdim BG
 - IS % CFSEdim stim/% CFSEdim BG
- **EdU** (1 laboratoire)
 - chiffre
- **BrdU** (1 laboratoire)
 - % par rapport à 3 témoins sains du jour

Résultats Mitogènes

CLP-1

	Thymidine	CFSE	EdU	BrdU	Total
PHA	4 norm 2 dim 1 ininter	2 norm	1 norm	1 norm	8/11 norm 2/11 dim 1 ininter
CD3	4 Norm 1 dim 2 ininter	2 norm	1 dim		6/9 norm 2/9 dim 2/9 ininter

EFS 27

	Thymidine	CFSE	EdU	BrdU	Total
PHA	7 norm	2 norm	1 dim	1 norm	10/11 norm 1/11 dim
CD3	6 Norm	2 norm	1 dim		7/9 norm 1/9 dim

Normal= Bonne réponse ou très bonne réponse
Dim: modérée ou faible

Antigènes: rendus selon la technique

- **Thymidine (7 laboratoires)**

- IS > 3 ou 2 cpm stim/cpmBG

- cpm stim en comparant à la limite inférieure normale

- **CFSE (2 laboratoires)**

- D % CFSEdimStim - % CFSEdimBG > 2

- D % CFSEdimStim / % CFSEdimBG > 2 associé aux T CD25+

- **EdU (1 laboratoire)**

- Chiffre

- **BrdU**

- % 3 donneurs du jours

Résultats antigènes

EFS 27

	³HThy	CFSE	EdU	BrdU	Total
Candidine	2 Pos 3 Neg	2 Neg	1 Neg	1Pos	3/9 Pos 6/9 Neg
Tet	2 faible 4 Neg	2 Neg	1Neg		2/9 faible Pos 7/9 Neg
Tuberculine	6 Pos	2 Pos	1Pos		9/9 Pos

CLP-1

	³H Thy	CFSE	EdU	BrdU	Total
Candidine	1Pos 3Indet 1Neg	1Indet 1faiblepos	1 Indet	1Pos	2/9 Pos 1/9 Faible pos 5/9 Indet 1/9 Neg
Tet	5 Indet 1 Neg	1Indet 1faiblePos	1 Indet		1/9 faible Pos 7/9 Indet 1/9 Neg
Tuberculin e	4 Indet 1 Neg 1 Pos	1 Indet 1faiblePos	1 Indet		1/9 Pos 1/9 faible Pos 6/9 Indet 1/9 Neg

Conclusions CQ interlaboratoires

- Malgré l'hétérogénéité des techniques utilisées
Résultats encourageants
- Nécessité de s'accorder sur le mode de rendu des résultats
- Nécessité d'interpréter les résultats par rapport aux normales du laboratoire

Conclusions

- Hétérogénéité des techniques et très grande hétérogénéité du rendu des résultats
- 6 laboratoires seulement incluent un contrôle sain connu ou pas peu de laboratoires introduisent un témoin de la reproductibilité
- Interprétation par rapport aux normales établies par le laboratoire en utilisant les contrôles
- Nécessité du CQInter-laboratoires projet à discuter au sein du Ceredih

**Groupe des laboratoires participant au CEREDIH:
Faire des sous groupes de réflexion en fonction de la technique utilisée
Dégager une procédure associée à des recommandations pour publication.**

Budget:
pour 3 envois de 2 ampoules /an
à destination de 15 laboratoires

- Concentré leuco-plaquettaire ou poche de sang 2 par envois 324 euros TTC
- Préparation des cellules 324 euros TTC
- Congélation des ampoules 1620 euros TTC
- Colis et envois en carboglace sous 24H 3120 euros TTC
- Vacances 900 euros

Soit= 6288 euros TTC

Liste des Laboratoires participants au groupe

CEDI Hôpital Necker-Enfants Malades 149 rue de Sèvres 75743 Paris Cedex 15	Capucine Picard Jérémy Rosain	0144495088	capucine.picard@nck.aphp.fr
CHU de Nancy Av. Du Morvan 54511 Vandoeuvre-les-Nancy	Marcello De Carvalho	0383157615	m.decarvalho@chu-nancy.fr
Lab Immunologie, CHU Rouen	Serge Jacquot	02 32 88 80 71	serge.jacquot@chu-rouen.fr
CHU Pontchaillou, 2 rue Henri Le Guilloux, 35033 RENNES	Delphine Monnier	02 99 28 90 57	delphine.monnier@chu-rennes.fr
Laboratoire d'Immunologie Hopital de la Conception Pavillon Cornil 147 Bd Baille Marseille 13005	Catherine Farnarier, Frédéric Vély, Daniel Bertin	04-91-38-18-53	catherine.farnarier@ap-hm.fr ; Frederic.VELY<vely@ciml.univ-mrs.fr>
Immunologie CHU REIMS av général Koenig 51092 Reims Cedex	Jhm Cohen, Thierry Tabary	0326783213 ; ...7237	ttabary@chu-reims.fr
Hop Edouard Herriot Pav E 2d étage 5, place d'Arsonval 69003 LYON	Guillaume Monneret, Façoise Poitevin, Christophe Malcus	04 72 11 97 55;-52-47	françoise.poitevin@chu-lyon.fr ; christophe.malcus@chu-lyon.fr
EFS-BFC, 8 rue du Dr Jean-François Xavier Girod, 25000 BESANCON	Estelle Seilles	03.81.61.56.98	estelle.seilles@univ-fcomte.fr
labo Immuno CHU Caen bd Clemenceau 14000 Caen	Brigitte Le Mauff	0231 27 20 97	lemauff-b@chu-caen.fr
Institut d'Immunologie Bd du Pr Jules Leclercq - 59037 - Lille	Myriam Labalette	03 20 44 65 76	immunologiecellulaire@chru-lille.fr
Laboratoire d'Immunologie Cellulaire, Hopital Saint Louis 1 Avenue Claude Vellefaux, 75010 Paris	Hélène Moins, Guitta Maki	01 42 49 90 95	helene.moins@univ-paris-diderot.fr ; guitta.maki@sls.aphp.fr
Laboratoire d'Immunologie - Institut de Biologie et de Pathologie - Boulevard de la Chantourne - 38043 Grenoble Cedex 9	Martine Pernollet	04 76 76 54 16	MPernollet@chu-grenoble.fr
Immunologie-Robert Debré, 48 bd Sérurier. 75019 Paris	Valérie Guérin-El Khourouj Guislain Carcelain	01 40 03 53 05	valerie.guerin@rdb.aphp.fr guislaine.carcelain@rdb.aphp.fr
Laboratoire Immunologie CHU Estaing 63003 Clermont ferrand	Bertrand Evrard	04 73 75 06 33	bevvard@chu-clermontferrand.fr