

exbio

KOMBITEST B/NK Cell 4-color 50 essais | N° de réf. ED7735















Mode d'emploi (FR)

Version : ED7735_IFU_v2_FR

Date de publication : 03-12-2024

Symboles figurant sur l'étiquetage du produit

	Dispositif médical de diagnostic in vitro		Limite de température
	Marquage CE de conformité Numéro d'identification de l'organisme notifié		Tenir à l'écart de la lumière du soleil
	Fabricant		Marque UKCA
	Identifiant unique du dispositif		
	Consulter le mode d'emploi		
	Contient suffisamment d'unités pour <n> tests		
	Référence catalogue		
	Code du lot		
	Date de péremption		

1. Usage prévu

KOMBITEST B/NK Cell 4-color est destiné à la détection et au dénombrement des populations et sous-ensembles de lymphocytes dans le sang total humain par cytométrie en flux.

Éléments détectés et/ou mesurés

Le dispositif KOMBITEST B/NK Cell 4-color détecte et mesure les pourcentages relatifs et les nombres absolus de lymphocytes T (CD3+), de lymphocytes B (CD3-CD19+) et de lymphocytes NK (CD3-CD16+56+) humains.

Fonction du dispositif

Le dispositif est destiné à être utilisé dans l'évaluation immunologique de patients normaux et peut aider au diagnostic de patients présentant ou suspectés de présenter une déficience immunitaire.

Contexte d'un état physiologique ou pathologique

Les fréquences des populations de lymphocytes mesurées par le dispositif peuvent être affectées par diverses affections pathologiques et sont utiles pour l'évaluation des pathologies suivantes :

- Cellule T CD3+ dans les infections virales et les immunodéficiences héréditaires ^(1, 7)
- Cellules B CD3-/CD19+ dans les maladies auto-immunes ⁽²⁾
- Cellules NK CD3-/CD16+56+ dans l'immunité innée et les déficiences immunologiques ^(4, 5)

Type de dosage

Non automatisé

Quantitatif

Type d'échantillon requis

Échantillon de sang total périphérique humain anticoagulé

Population testée

Non destiné à une population spécifique.

2. Utilisateur prévu

Le dispositif est destiné à un usage professionnel en laboratoire uniquement. Ne convient pas aux tests au chevet du patient ni aux auto-tests.

Conditions de qualification

Les utilisateurs prévus doivent avoir des compétences de pointe dans l'analyse de cytométrie en flux de cellules humaines, les techniques de laboratoire standard, notamment le pipetage, ainsi que la manipulation sûre et appropriée d'échantillons dérivés du corps humain.

L'utilisateur prévu doit respecter la norme EN ISO 15189 ou d'autres normes

nationales, le cas échéant.

3. Principe du test

Le principe du test repose sur la détection d'anticorps monoclonaux se liant à une molécule spécifique (antigène) exprimée par certaines cellules sanguines humaines. Les anticorps monoclonaux utilisés dans le test sont marqués avec différents fluorochromes qui sont excités par un faisceau laser provenant d'un cytomètre en flux lors de l'acquisition d'un échantillon sanguin coloré par un anticorps. La fluorescence (émission de lumière) ultérieure de chaque fluorochrome présent sur une cellule sanguine acquise est recueillie et analysée par l'instrument. L'intensité de la fluorescence est directement proportionnelle à la densité d'expression de l'antigène dans une cellule, permettant ainsi la séparation de différents sous-ensembles cellulaires.

4. Réactif(s) fourni(s)

Contenu

Le dispositif KOMBITEST B/NK Cell 4-color permet de réaliser 50 tests et est fourni avec le réactif suivant :

1 flacon (1 ml) contenant une combinaison prémélangée d'anticorps monoclonaux marqués au fluorochrome CD3 FITC / CD16 PE + CD56 PE / CD45 PerCP / CD19 APC, dilué à des concentrations optimales dans une solution stabilisante de sérum physiologique tamponnée au phosphate (PBS) contenant 15 mM d'azide de sodium et 0.2 % d'albumine sérique bovine (BSA).

Composition

Tableau 1 Description des composants actifs

Antigène	Fluorochrome	Clone	Isotype	Concentration (µg/ml)
CD3	FITC	TB3	IgG2b	2
CD16	PE	3G8	IgG1	1.5
CD56	PE	LT56	IgG2a	1.5
CD19	APC	LT19	IgG1	2
CD45	PerCP	MEM-28	IgG1	5

5. Matériel requis mais non fourni

Tubes à essai à fond rond de de 12x75 mm

Solution de lyse des érythrocytes (EXCELLYSE Easy, EXBIO Praha, a.s., n° de réf. ED7066 ou CyLyse™ FX, Sysmex Partec GmbH, n° de réf. BD303500)

Eau déionisée (qualité réactif)

Cellules de contrôle de processus (Streck CD-Chex Plus®, n° de réf. 213323 ou contrôle de cellules lysables équivalent)

6. Équipement requis

Pipette automatique avec embouts jetables (20-100 µl) pour le pipetage des échantillons et des réactifs

Distributeur de liquide ou pipette avec embouts jetables (0.5-2 ml) pour distribuer la solution de lyse des érythrocytes

Mélangeur vortex

Analyseur d'hématologie (pour le nombre absolu de cellules) capable de dénombrer les leucocytes (globules blancs) et les lymphocytes par µl d'échantillon

Cytomètre en flux avec deux sources d'excitation laser (488 nm et ~ 635 nm), des détecteurs de lumière diffuse, des filtres optiques et des détecteurs d'émission appropriés pour recueillir les signaux émis par les fluorochromes indiqués dans le Tableau 2.

Tableau 2 Caractéristiques spectrales des fluorochromes utilisés dans le dispositif

Fluorochrome	Excitation [nm]	Émission [nm]
FITC	488	525
PE	488	576
PerCP	488	677
APC	630 – 640	660

REMARQUE : Le dispositif a été testé sur les cytomètres en flux BD FACSCanto™ II (BD Biosciences), DxFLEX (Beckman Coulter) et Sysmex XF-1600™ (Sysmex Corporation).

7. Conservation et manipulation

Conserver à une température de 2-8 °C.

Éviter l'exposition prolongée à la lumière.

Ne pas congeler.

Voir la section 10, Procédure (Préparation des réactifs) pour plus d'informations sur la stabilité en cours d'utilisation et la durée de conservation après la première

ouverture, ainsi que sur les conditions de conservation et la stabilité des solutions de travail (le cas échéant).

8. Avertissements, précautions et limitations d'utilisation

Classification des dangers SGH

Consulter la fiche de données de sécurité (FDS) disponible sur la page du produit à l'adresse www.exbio.cz pour obtenir des informations complètes sur les risques qu'impliquent les substances chimiques et les mélanges contenus dans le produit, ainsi que sur la manière dont ils doivent être manipulés et éliminés.

Danger biologique

Les échantillons biologiques et les échantillons de sang humain ainsi que toute substance entrant en contact avec ces derniers sont toujours considérés comme du matériel infectieux.

Utiliser des équipements de sécurité et de protection individuelle pour éviter tout contact avec la peau, les yeux et les muqueuses.

Respecter toutes les lois, réglementations et procédures en vigueur relatives à la manipulation et l'élimination du matériel infectieux.

Signes de détérioration

L'aspect normal du réactif fourni est un liquide transparent. Ne pas utiliser le réactif si un changement d'aspect est observé, par exemple turbidité ou signes de précipitation.

Limitation d'utilisation

Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur les étiquettes des produits.

9. Échantillon

Utiliser du sang périphérique veineux prélevé dans un récipient pour échantillon classé comme dispositif médical, avec l'anticoagulant EDTA.

REMARQUE : Déterminer le nombre absolu de leucocytes et le nombre de lymphocytes dans l'échantillon de sang prélevé par un analyseur d'hématologie. Le dispositif KOMBITEST B/NK Cell 4-color ne fournit pas à lui seul le nombre de cellules absolu.

Les échantillons de sang contenant plus de 40×10^3 leucocytes/ μl nécessiteront une dilution avec une solution PBS avant leur traitement.

Traiter les échantillons de sang au plus tard 24 heures après leur prélèvement. Conserver l'échantillon à la température du laboratoire (20 - 25 °C). Ne pas réfrigérer l'échantillon.

Interférences endogènes

Les sources d'interférences endogènes sont identifiées dans le Tableau 3 sur la base des recherches littéraires scientifiques.

Tableau 3 Interférences endogènes du dispositif

Interférences endogènes	Impact	Référence
Albumine	L'albumine, en forte concentration, peut interférer en raison de sa capacité à se lier et à libérer de grandes quantités de ligands.	8, 9, 10
Bilirubine (ictère) (non conjuguée)	La bilirubine peut augmenter le fond de fluorescence des cellules en raison de sa forte auto-fluorescence.	11, 12, 13
Débris cellulaires (après lyse)	Les débris cellulaires peuvent fausser la numération cellulaire et épuiser les anticorps présents dans le dispositif.	14, 15
Érythrocytes	Une lyse insuffisante des globules rouges présents dans l'échantillon peut affecter la numération cellulaire.	16
Hémoglobine	Les échantillons hémolysés peuvent produire des résultats peu fiables.	17
Anticorps humains anti-murins	Peut affecter la fonctionnalité du dispositif (capacité à se lier aux antigènes de surface des cellules)	18, 19, 20, 21, 22, 23
Immunoglobulines	Ne peut être lavé selon la méthode de la plate-forme unique et peut affecter le nombre de sous-ensembles lymphocytaires.	24
Facteurs rhumatoïdes	La présence de radiofréquences interfère avec les tests immunologiques multiplex (MIA).	25
Triglycérides	Des taux élevés de lipides en circulation peuvent affecter l'analyse par cytométrie en flux de certaines populations de cellules sanguines.	26

Interférences exogènes

Les échantillons datant de plus de 24 heures peuvent donner des résultats erronés.

Les échantillons réfrigérés peuvent donner des résultats erronés.

La préparation incorrecte de la solution de lyse érythrocytaire (EXCELLYSE Easy, EXBIO Praha, a.s., n° de réf. ED7066 ou CyLyse™ FX, Sysmex Partec GmbH, n°

de réf. BD303500) peut donner des résultats erronés. Suivre les instructions du fabricant concernant l'utilisation de la solution de lyse érythrocytaire.

10. Procédure

Préparation du ou des réactifs fournis

Aucune préparation de réactif n'est nécessaire.

Amener le réactif à température ambiante avant utilisation. Maintenir le récipient primaire du dispositif au sec.

Utiliser le réactif directement à partir de son récipient primaire d'origine. La durée d'utilisation du réactif (exposition à la lumière et à des températures élevées) ne doit pas dépasser 4 heures par jour.

Après son ouverture initiale, le réactif conserve ses caractéristiques de performance jusqu'à la date de péremption indiquée à condition qu'il soit conservé conformément aux indications mentionnées dans son emballage primaire d'origine.

MISE EN GARDE : Ne pas diluer le réactif.

Préparation du matériel requis, mais pas fourni

Diluer la solution concentrée de lyse des érythrocytes avec de l'eau déionisée conformément aux instructions du fabricant. La solution de lyse des érythrocytes diluée (1X) est stable pendant 1 mois si elle est conservée dans un distributeur de liquide ou un récipient fermé à température ambiante.

Contrôle de qualité

Utiliser Streck CD-Chex Plus® ou des cellules de contrôle équivalentes comme contrôle de procédure positif pour garantir le bon fonctionnement du dispositif comme prévu. Streck CD-Chex Plus® fournit des valeurs établies pour le pourcentage de numération positive et absolue des lymphocytes T, des lymphocytes B, des granulocytes, des monocytes et des lymphocytes NK, notamment deux niveaux cliniquement pertinents de cellules CD4+.

Colorer les cellules de contrôle à l'aide du réactif KOMBITEST B/NK Cell 4-color selon le traitement de l'échantillon tel que spécifié dans le mode d'emploi. Vérifier que les résultats obtenus (% de cellules positives) se situent dans l'intervalle attendu indiqué pour le lot de cellules de contrôle utilisé.

Coloration des échantillons

1. Pour chaque échantillon, étiqueter un tube à essai à fond rond de 12x75 mm avec l'identification appropriée de l'échantillon.
2. Pipeter 20 µl de réactif KOMBITEST B/NK Cell 4-color au fond du tube à essai de 12x75 mm.
3. Pipeter 50 µl d'échantillon de sang bien mélangé au fond du tube à essai.

MISE EN GARDE : Éviter de pipeter le sang sur le côté du tube à essai. S'il reste une gouttelette ou un frottis de sang sur le côté du tube, il se peut que celui-ci ou celle-ci ne soit pas coloré par le réactif ou que les érythrocytes ne soient pas lysés et que le résultat du test ne soit pas valide.

4. Agiter au vortex et laisser incuber le tube à essai pendant 20 minutes à température ambiante dans l'obscurité.
5. Ajouter 500 µl de solution de lyse (1X) diluée dans le tube à essai.
6. Agiter au vortex et laisser incuber le tube à essai pendant 10 minutes à température ambiante dans l'obscurité.

Récupérer l'échantillon coloré immédiatement sur le cytomètre en flux. Si l'échantillon coloré n'est pas récupéré immédiatement, le conserver à 2-8 °C dans l'obscurité et l'analyser dans les 24 heures.

MISE EN GARDE : Agiter au vortex l'échantillon coloré immédiatement avant la récupération sur le cytomètre en flux pour éviter les agrégats.

Analyse par cytométrie en flux

Le cytomètre en flux sélectionné pour être utilisé avec le dispositif KOMBITEST B/NK Cell 4-color doit être calibré de façon routinière à l'aide de microbilles fluorescentes pour garantir la stabilité de la sensibilité des détecteurs conformément aux instructions du fabricant du cytomètre.

S'il n'est pas correctement entretenu, le cytomètre en flux peut produire de faux résultats.

Se reporter aux spécifications du cytomètre indiquées par le fabricant concernant les lasers et les détecteurs de fluorescence selon les caractéristiques d'excitation et d'émission des fluorochromes à la section 6 Équipement requis.

Régler les tensions sur les détecteurs de fluorescence d'intérêt avant l'analyse des échantillons colorés. La tension sur un détecteur PMT doit être suffisamment élevée pour qu'un minimum d'événements colorés négativement interfèrent avec le canal 0 sur l'axe de fluorescence. En outre, la tension du détecteur PMT ne doit pas dépasser les valeurs auxquelles les événements positifs sont poussés vers l'axe droit.

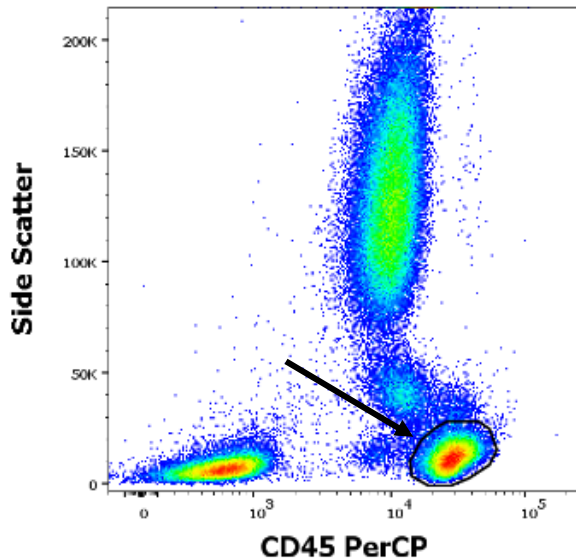
Compenser les signaux de fluorescence entre les détecteurs avant ou après l'acquisition des données. Les données peuvent être interprétées de manière incorrecte si les signaux de fluorescence sont mal compensés ou si les régions sont mal positionnées.

Pour l'analyse des données mesurées, il est possible d'utiliser un logiciel de cytométrie développé par le fabricant ou un logiciel dédié à l'analyse des données de cytométrie hors ligne (par exemple FlowJo™, VenturiOne®, Infinicyt™).

Analyse des données de l'échantillon coloré KOMBITEST B/NK Cell 4-color

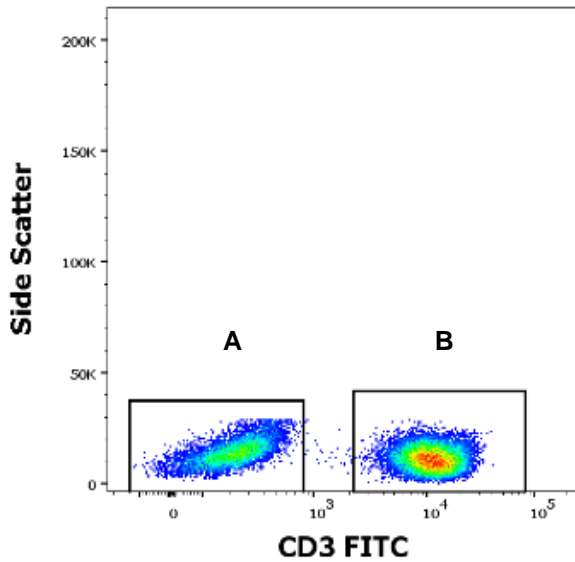
Visualiser les données compensées dans un graphique à dispersion latérale (SSC) par rapport au CD45 PerCP. Régler la région pour la population de lymphocytes CD45+ comme indiqué dans la Figure 1.

Figure 1 Délimitation de la population de lymphocytes CD45+ (données acquises sur BD FACSCanto™ II)



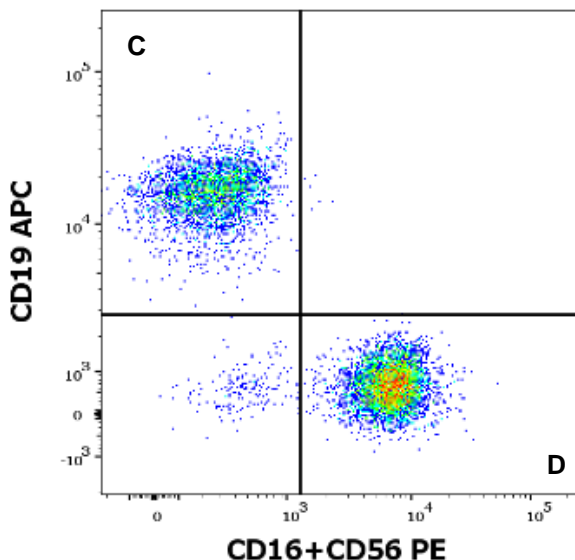
Afficher les lymphocytes CD45+ triés dans un graphique avec la dispersion latérale (SSC) par rapport au CD3 FITC comme le montre la Figure 2. Séparer les lymphocytes CD3+ et CD3- en utilisant les fenêtres appropriées. Calculer le pourcentage de lymphocytes T (CD3+ ; région B dans la Figure 2) par rapport à tous les lymphocytes.

Figure 2 Séparation des lymphocytes CD3+ et CD3- (données acquises sur BD FACSCanto™ II)



Afficher es lymphocytes CD3 triés (région A dans la Figure 2) sur un graphique CD19 APC par rapport à CD16+CD56 PE comme le montre la Figure 3. Régler les régions appropriées et calculer le pourcentage de lymphocytes B (CD16-CD56-CD19+ ; région C dans la Figure 3) et de cellules tueuses naturelles (NK) (CD16+CD56+CD19- ; région D dans la Figure 3) par rapport à tous les lymphocytes.

Figure 3 Lymphocytes CD3- dans un graphique à points CD19 APC par rapport à CD16+CD56 PE (données acquises sur BD FACSCanto™ II)



Calcul et interprétation des résultats de l'analyse

Pour obtenir des nombres absolus, utiliser le nombre absolu de lymphocytes tel que déterminé par un analyseur d'hématologie. Se reporter aux instructions du fabricant de l'analyseur d'hématologie. Utiliser les équations ci-dessous pour le dénombrement absolu du sous-ensemble de lymphocytes requis.

$$A \times \frac{B (\%)}{100 (\%)} = \text{Numération absolue du sous-ensemble de lymphocytes requis}$$

A = nombre absolu de lymphocytes (données de l'analyseur d'hématologie ; cellules/ μ l)

B = pourcentages relatifs du sous-ensemble de lymphocytes requis par rapport à tous les lymphocytes (données issues du cytomètre en flux ; %)

11. Performances analytiques

Spécificité

L'anticorps TB3 reconnaît l'antigène CD3 humain du complexe TCR/CD3. La spécificité de l'anticorps a été confirmée par le HCDM Council (atelier HLDA XI).

L'anticorps 3G8 reconnaît l'antigène CD16 humain (récepteur Fc-gamma des immunoglobulines de type III de faible affinité). La spécificité de l'anticorps a été confirmée par l'atelier HLDA (atelier HLDA V ⁽⁶⁾).

L'anticorps LT56 reconnaît l'isoforme leucocytaire de l'antigène humain CD56 (Neural Cell Adhesion Molecule 1). La spécificité de l'anticorps a été confirmée par l'HCDM Council (atelier HLDA X).

L'anticorps LT19 reconnaît l'antigène CD19 humain (glycoprotéine transmembranaire des lymphocytes B CD19). La spécificité de l'anticorps a été confirmée par l'HCDM Council (atelier HLDA X).

L'anticorps MEM-28 reconnaît toutes les isoformes leucocytaires du CD45 humain (récepteur de protéine tyrosine phosphatase de type C). La spécificité de l'anticorps a été confirmée par l'atelier HLDA (atelier HLDA III ⁽³⁾).

Précision

La précision de la méthode a été mesurée sur le cytomètre en flux BD FACSCanto™ II. Pour ce faire, le dispositif KOMBITEST B/NK Cell 4-color a été comparé à un produit similaire disponible sur le marché, notamment le dispositif KOMBITEST TBNK 6-color (EXBIO, Cat. No. ED7733). Cette comparaison s'est faite par une coloration parallèle de 60 donneurs de sang sains.

L'exactitude de la méthode a été confirmée par la coloration parallèle de 81 patients (voir tableau 5) soupçonnés d'être atteints d'une pathologie du système immunitaire. Les paramètres de l'analyse de régression linéaire sont présentés dans les tableaux 4 et 5.

Tableau 4 Analyse de régression linéaire pour les sous-ensembles de lymphocytes chez des donneurs sains (comparaison du dispositif KOMBITEST B/NK Cell 4-color avec le produit de diagnostic in vitro KOMBITEST TBNK 6-color (EXBIO, Cat. No. ED7733))

Sous-ensemble de lymphocytes	Unité	n	Pente	Ordonnée à l'origine	R ²
CD3+	%	60	0.994	0.003	1.00
	cellules/µl	60	0.992	9.958	1.00
CD3-CD16+CD56+	%	60	0.995	0.001	1.00
	cellules/µl	60	1.010	-2.796	1.00
CD3-CD19+	%	60	1.003	0.002	1.00
	cellules/µl	60	1.003	3.669	0.99

n = nombre d'échantillons sanguins

Tableau 5 Analyse de régression linéaire de sous-ensembles de lymphocytes chez les patients que l'on suspecte d'être atteints de troubles du système immunitaire (comparaison du dispositif KOMBITEST B/NK Cell 4-color avec le système de cytométrie en flux AQUIOS CL - Beckman Coulter, Inc.)

Sous-ensemble de lymphocytes	Unité	n	Pente	Ordonnée à l'origine	R ²
CD3+	%	81	1.042	-2.976	0.97
	cellules/µl	81	1.005	-0.010	1.00
CD3-CD16+CD56+	%	81	1.061	-0.626	0.98
	cellules/µl	81	1.078	-0.017	0.99
CD3-CD19+	%	81	1.023	-0.163	0.99
	cellules/µl	81	1.032	-0.006	1.00

n = nombre d'échantillons sanguins

Linéarité

La linéarité de la méthode a été vérifiée sur 10 dilutions en série d'un échantillon de sang enrichi en leucocytes (couche leucocytaire). Les échantillons de cellules ont été colorés avec le KOMBITEST B/NK Cell 4-color en 6 réplicats. Les échantillons ont été analysés à l'aide du cytomètre en flux FACSCanto™ II de BD et du cytomètre en flux DxFLEX du Beckman Coulter. Les données mesurées pour les sous-ensembles de lymphocytes indiqués ont été observées comme étant linéaires dans l'intervalle de lymphocytes de 368 - 10634 cellules/µl avec le cytomètre en flux FACSCanto™ II de BD et dans l'intervalle de 328 - 9061 cellules/µl avec le cytomètre en flux DxFLEX de Beckman Coulter. Les sous-ensembles de cellules se situaient dans les intervalles indiqués dans les

Tableaux 6 et 7.

Tableau 6 Intervalles linéaires des sous-ensembles de lymphocytes analysés à l'aide du FACSCanto™ II de BD

BD FACSCanto™ II	
Sous-ensemble de lymphocytes	Intervalle (cellules/ μ l)
CD3+	227 - 6163
CD3-CD16+CD56+	59 - 1609
CD3-CD19+	34 - 912

Tableau 7 Intervalles linéaires des sous-ensembles de lymphocytes analysés à l'aide du DxFLEX de Beckman Coulter

Beckman Coulter DxFLEX	
Sous-ensemble de lymphocytes	Intervalle (cellules/ μ l)
CD3+	217 - 6051
CD3-CD16+CD56+	69 - 1669
CD3-CD19+	33 - 889

Limite de détection / limite de quantification / valeur-seuil

Les données de linéarité ont été utilisées pour déterminer la limite de détection (LDD) et la limite de quantification (LDQ).

La limite de détection a été définie comme la valeur la plus basse non nulle de la numération cellulaire absolue plus $3 \times \text{ÉT}$ (écart-type) pour chaque sous-ensemble lymphocytaire (voir les Tableaux 8 à 9).

La limite de quantification a été définie comme la valeur la plus basse dans la plage de linéarité des concentrations de l'analyte présentée sous forme de numération absolue du sous-ensemble lymphocytaire, pour laquelle le CV des hexaplicats ne dépassait pas 10 % et la récupération était comprise entre 90 % et 110 % (voir les Tableaux 8 à 9).

Les résultats du dosage ne sont pas uniquement diagnostiques pour une entité clinique unique, et la valeur-seuil ne peut donc pas être estimée.

Tableau 8 Limites de détection et de quantification sur le BD FACSCanto™ II

BD FACSCanto™ II				
Sous-ensemble lymphocytaire	Numération cellulaire la plus faible non nulle (cellules/μl)	3×ÉT (ÉT)	LDD (cellules/μl)	LDQ (cellules/μl)
CD3+	1	0.12 (0.04)	1.12	8
CD3-CD16+CD56+	3	1.2 (0.4)	4.2	21
CD3-CD19+	1	1.2 (0.4)	2.2	34

Tableau 9 Limites de détection et de quantification sur le Beckman Coulter DxFLEX

Beckman Coulter DxFLEX				
Sous-ensemble lymphocytaire	Numération cellulaire la plus faible non nulle (cellules/μl)	3×ÉT (ÉT)	LDD (cellules/μl)	LDQ (cellules/μl)
CD3+	1	0.3 (0.1)	1.3	25
CD3-CD16+CD56+	1	0.3 (0.1)	1.3	23
CD3-CD19+	1	0.6 (0.2)	1.6	33

Répétabilité

La répétabilité du dosage a été mesurée sur dix échantillons de sang en six réplicats. Les échantillons ont été analysés à l'aide du cytomètre en flux FACSCanto™ II de BD et du cytomètre en flux DxFLEX du Beckman Coulter. Les coefficients de variation (CV) sont indiqués dans les tableaux ci-dessous (Tableaux 10 et 11).

Tableau 10 Répétabilité du dispositif sur le FACSCanto™ II de BD

BD FACSCanto™ II					
Sous-ensemble de lymphocytes	Unité	n	Moyenne	ÉT	% CV
CD3+	%	10	66.47	0.29	0.44
	cellules/μl	10	1362	6.19	
CD3-CD16+CD56+	%	10	18.66	0.21	1.26
	cellules/μl	10	374	4.36	
CD3-CD19+	%	10	13.69	0.20	1.57
	cellules/μl	10	284	4.35	

Tableau 11 Répétabilité du dispositif sur le DxFLEX de Beckman Coulter

Beckman Coulter DxFLEX					
Sous-ensemble de lymphocytes	Unité	n	Moyenne	ÉT	% CV
CD3+	%	10	65.99	0.59	0.92
	cellules/ μ l	10	1352	11.67	
CD3-CD16+CD56+	%	10	19.08	0.44	2.44
	cellules/ μ l	10	382	8.62	
CD3-CD19+	%	10	13.55	0.34	2.59
	cellules/ μ l	10	281	6.73	

Reproductibilité

La reproductibilité du dosage a été mesurée sur 2 échantillons de sang stabilisés (CD-Chex Plus® et CD-Chex Plus® CD4 Low) dans les mêmes conditions pendant 15 jours en utilisant 3 lots du dispositif (5 jours chacun). Les échantillons ont été analysés à l'aide du cytomètre en flux FACSCanto™ II de BD et du cytomètre en flux DxFLEX du Beckman Coulter. Les coefficients de variation (CV) sont indiqués dans les tableaux ci-dessous (Tableaux 12 et 13).

Tableau 12 Reproductibilité du dispositif sur le FACSCanto™ II de BD

Sous-ensemble de lymphocytes	Matériel	Unité	Moyenne	ÉT	% CV
CD3+	CD-Chex Plus®	%	77.39	0.24	0.31
		cellules/ μ l	1909	5.97	
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	61.38	0.55	0.90
		cellules/ μ l	891	8.04	
CD3-CD16+CD56+	CD-Chex Plus®	%	10.57	0.19	1.84
		cellules/ μ l	261	4.81	
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	19.28	0.46	2.37
		cellules/ μ l	280	6.64	
CD3-CD19+	CD-Chex Plus®	%	11.20	0.13	1.13
		cellules/ μ l	276	3.12	
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	17.95	0.38	2.13
		cellules/ μ l	261	5.55	

Tableau 13 Reproductibilité du dispositif sur le DxFLEX de Beckman Coulter

Sous-ensemble de lymphocytes	Matériel	Unité	Moyenne	ÉT	% CV
CD3+	CD-Chex Plus®	%	76.77	0.27	0.36
		cellules/µl	1894	6.77	
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	60.53	0.38	0.62
		cellules/µl	878	5.45	
CD3-CD16+CD56+	CD-Chex Plus®	%	10.83	0.21	1.96
		cellules/µl	267	5.23	
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	19.54	0.31	1.61
		cellules/µl	284	4.55	
CD3-CD19+	CD-Chex Plus®	%	11.36	0.23	2.03
		cellules/µl	280	5.68	
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	18.23	0.43	2.38
		cellules/µl	265	6.31	

REMARQUE : Toutes les données de performance analytique ont été mesurées à l'aide de la solution de lyse des érythrocytes EXCELLYSE Easy (EXBIO Praha, a.s., n° de réf. ED7066).

Pour l'analyse par cytométrie en flux, les cytomètres en flux suivants, y compris la version du logiciel, ont été utilisés :

BD FACSCanto™ II	BD FACSDiva Software – version 8.0.2
Beckman Coulter DxFLEX	CytExpert for DxFLEX – version 2.0.2.18
Sysmex XF-1600™	IPU Software – version 0(0.09-00)

Pour la numération cellulaire absolue, l'analyseur d'hématologie à double plate-forme avec les spécifications suivantes a été utilisé :

Sysmex XN-1000™	IPU Software – version 00-22(164)
-----------------	-----------------------------------

Pour l'évaluation des données mesurées, la plate-forme d'analyse suivante a été utilisée :

FlowJo™ (Becton, Dickinson and Company) - version 10.9.0

12. Performances cliniques

Patients atteints d'immunodéficience primaire

Les données cliniques ont été recueillies sur un site clinique auprès de 30 patients suspectés d'être atteints d'immunodéficience commune variable (ICV). Les performances cliniques du dispositif ED7735 ont été déterminées par comparaison du dispositif KOMBITEST B/NK Cell 4-color utilisant la solution de lyse des érythrocytes EXCELLYSE Easy (EXBIO Praha, a.s., n° de réf. ED7066) avec une méthode de laboratoire clinique accréditée (système de cytométrie en flux AQUIOS CL - Beckman Coulter, Inc.).

Les résultats de l'évaluation de l'état immunitaire du patient ont été évalués en fonction de l'immunodéficience (Tableau 14).

Tableau 14 Performances cliniques du dispositif KOMBITEST B/NK Cell 4-color - Patients atteints d'ICV

		Statut immunitaire évalué par une méthode de laboratoire clinique accrédité	
		Immunodéficience	État normal
Statut immunitaire évalué par le dispositif KOMBITEST B/NK Cell 4-color	Immunodéficience	23 patients	0 patient
	État normal	0 patient	7 patients

13. Valeurs attendues

Intervalle de référence

Tableau 15 Intervalles de référence des donneurs de sang sains mesurés sur BD FACSCanto™ II

Sous-ensemble de lymphocytes	n	Unité	Gamme		Médiane
			Min	Max	
CD3+	60	%	57.8	87.2	73.0
	60	cellules/ μ l	766	2105	1405
CD3-CD16+ CD56+	60	%	4.3	31.4	14.7
	60	cellules/ μ l	82	595	281
CD3-CD19+	60	%	2.8	23.5	10.1
	60	cellules/ μ l	61	630	184

Les intervalles de référence du tableau 15 ont été établis sur des patients sains qui étaient considérés comme des donneurs de sang selon la législation de la République tchèque, car ils remplissaient les critères stricts pour être donneurs de sang dans une banque de sang. Les données ont été mesurées sur le cytomètre en flux BD FACSCanto™ II.

Les intervalles de référence spécifiques peuvent varier en fonction de la région et de la population sur laquelle les valeurs ont été établies. Voilà pourquoi les laboratoires doivent établir leurs propres intervalles de référence normaux pour les sous-ensembles de lymphocytes identifiés à l'aide du KOMBITEST B/NK Cell 4-color à partir de la population locale de donneurs normaux. En effet, les valeurs obtenues peuvent varier en fonction de l'âge, du sexe, des caractéristiques cliniques et de l'origine ethnique.

14. Limitations

Le dispositif KOMBITEST B/NK Cell 4-color n'a pas été validé pour être utilisé avec des échantillons prélevés avec des anticoagulants héparine ou citrate acide dextrose (ACD) pour déterminer les numérations relatives et absolues.

Le dispositif KOMBITEST B/NK Cell 4-color n'est pas destiné au dépistage et/ou au phénotypage d'échantillons de leucémie et de lymphome.

Les numérations absolues ne sont pas comparables entre les laboratoires utilisant différents équipements de différents fabricants.

15. Références

- 1) Boldt, A et al. Eight-color immunophenotyping of T-, B-, and NK-cell subpopulations for characterization of chronic immunodeficiencies Cytometry B Clin Cytom. 2014 May;86(3):191-206. doi: 10.1002/cyto.b.21162.
- 2) Kucuksezer, U C et al. The Role of Natural Killer Cells in Autoimmune Diseases. Front Immunol. 2021 Feb 25;12:622306. doi: 10.3389/fimmu.2021.622306.
- 3) McMichael AJ, ed. Leucocyte Typing III: 54 White Cell Differentiation Antigens. New York, NY: Oxford University Press; 1987.
- 4) Orange, J S. Natural killer cell deficiency. J Allergy Clin Immunol. 2013 Sep;132(3):515-525. doi: 10.1016/j.jaci.2013.07.020.
- 5) Orange, J S. How I Manage Natural Killer Cell Deficiency. J Clin Immunol. 2020 Jan;40(1):13-23. doi: 10.1007/s10875-019-00711-7.
- 6) Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, et al, eds.: Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens. New York, NY: Oxford University Press; 1995.
- 7) van Dongen, J J M et al. EuroFlow-Based Flowcytometric Diagnostic Screening and Classification of Primary Immunodeficiencies of the Lymphoid System. Front Immunol. 2019 Jun 13;10:1271. doi: 10.3389/fimmu.2019.01271.
- 8) Tate J, Ward G. Interferences in immunoassay. Clin Biochem Rev. 2004 May;25(2):105-20. PMID: 18458713; PMCID: PMC1904417.
- 9) Selby C. Interference in immunoassay. Ann Clin Biochem. 1999 Nov; 36 (Pt 6):704-21. doi: 10.1177/000456329903600603. PMID: 10586307.
- 10) J Frengen, B Kierulf, R Schmid, T Lindmo, K Nustad, Demonstration and minimization of serum interference in flow cytometric two-site immunoassays, Clinical Chemistry, Volume 40, Issue 3, 1 March 1994, Pages 420–425, <https://doi.org/10.1093/clinchem/40.3.420>.
- 11) Htun NM, Chen YC, Lim B, et al. Near-infrared autofluorescence induced by intraplaque hemorrhage and heme degradation as marker for high-risk atherosclerotic plaques. Nat Commun. 2017;8(1):75. Published 2017 Jul 13. doi:10.1038/s41467-017-00138-x.
- 12) Haga Y, Kay HD, Tempero MA, Zetterman RK. Flow cytometric measurement of intracellular bilirubin in human peripheral blood mononuclear cells exposed to unconjugated bilirubin. Clin Biochem. 1992 Aug;25(4):277-83. doi: 10.1016/0009-9120(92)80033-d. PMID: 1381998.
- 13) XUE Yan, XU Li, DANG Liheng, WANG Chao, CUI Yaqiong, WANG Ping, WANG Ning, ZHANG Xinjie, LIU Yang. Interference of high levels of bilirubin on lymphocyte subset determination in peripheral blood by flow cytometry and its elimination methods[J]. Laboratory Medicine, 2022, 37(12): 1169-1173.

- 14) Higgins J, Hill V, Lau K, Simpson V, Roayaei J, Klabansky R, Stevens RA, Metcalf JA, Baseler M. Evaluation of a single-platform technology for lymphocyte immunophenotyping. *Clin Vaccine Immunol.* 2007 Oct;14(10):1342-8. doi: 10.1128/CVI.00168-07. Epub 2007 Aug 29. PMID: 17761524; PMCID: PMC2168127.
- 15) Lam WK, Law YFW, Yip SF. Resolution of platelet count interference due to cytoplasmic fragments of leukaemic cells by flow cytometry in acute myeloid leukaemia. *Int J Lab Hematol.* 2022 Dec;44(6):983-985. doi: 10.1111/ijlh.13859. Epub 2022 May 3. PMID: 35504732.
- 16) Hervé Lecoœur, Marie-Lise Gougeon, Comparative analysis of flow cytometric methods for apoptosis quantitation in murine thymocytes and human peripheral lymphocytes from controls and HIV-infected persons Evidence for interference by granulocytes and erythrocytes, *Journal of Immunological Methods*, Volume 198, Issue 1, 1996, Pages 87-99, ISSN 0022-1759, [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(96\)00148-2](https://doi.org/10.1016/0022-1759(96)00148-2).
- 17) de Jonge G, Dos Santos TL, Cruz BR, Simionatto M, Bittencourt JIM, Krum EA, Moss MF, Borato DCK. Interference of in vitro hemolysis complete blood count. *J Clin Lab Anal.* 2018 Jun;32(5):e22396. doi: 10.1002/jcla.22396. Epub 2018 Feb 3. PMID: 29396875; PMCID: PMC6817011.
- 18) Kricka LJ. Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. *Clin Chem.* 1999 Jul;45(7):942-56. Erratum in: *Clin Chem* 2000 Oct;46(10):1722. PMID: 10388468.
- 19) Yasmine Van Caeneghem, Stijn De Munter, Paola Tieppo, Glenn Goetgeluk, Karin Weening, Greet Verstichel, Sarah Bonte, Tom Taghon, Georges Leclercq, Tessa Kerre, Reno Debets, David Vermijlen, Hinrich Abken & Bart Vandekerckhove (2017) Antigen receptor-redirected T cells derived from hematopoietic precursor cells lack expression of the endogenous TCR/CD3 receptor and exhibit specific antitumor capacities, *Oncol Immunology*, 6:3, DOI: 10.1080/2162402X.2017.1283460.
- 20) Lamia Achour, Mark G. H. Scott, Hamasseh Shirvani, Alain Thuret, Georges Bismuth, Catherine Labbé-Jullié, Stefano Marullo; CD4-CCR5 interaction in intracellular compartments contributes to receptor expression at the cell surface. *Blood* 2009; 113 (9): 1938–1947. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-141275>.
- 21) A. Stronkhorst, G. N. J. Tytgat & S. J. H. Van Deventer (1992) CD4 Antibody Treatment in Crohn's Disease, *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 27:sup194, 61-65, DOI: 10.3109/00365529209096029.
- 22) Zinzani, P.L., Minotti, G. Anti-CD19 monoclonal antibodies for the treatment of relapsed or refractory B-cell malignancies: a narrative review with focus on diffuse large B-cell lymphoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 148, 177–190 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00432-021-03833-x>.
- 23) Whiteman KR, Johnson HA, Mayo MF, Audette CA, Carrigan CN, LaBelle A,

- Zukerberg L, Lambert JM, Lutz RJ. Lorvotuzumab mertansine, a CD56-targeting antibody-drug conjugate with potent antitumor activity against small cell lung cancer in human xenograft models. *MAbs*. 2014 Mar-Apr;6(2):556-66. doi: 10.4161/mabs.27756. Epub 2014 Jan 8. PMID: 24492307; PMCID: PMC3984343.
- 24) Higgins J, Hill V, Lau K, Simpson V, Roayaei J, Klabansky R, Stevens RA, Metcalf JA, Baseler M. Evaluation of a single-platform technology for lymphocyte immunophenotyping. *Clin Vaccine Immunol*. 2007 Oct;14(10):1342-8. doi: 10.1128/CVI.00168-07. Epub 2007 Aug 29. PMID: 17761524; PMCID: PMC2168127.
- 25) Bartels EM, Falbe Wätjen I, Littrup Andersen E, Danneskiold-Samsøe B, Bliddal H, Ribel-Madsen S. Rheumatoid factor and its interference with cytokine measurements: problems and solutions. *Arthritis*. 2011;2011:741071. doi: 10.1155/2011/741071. Epub 2011 Jun 22. PMID: 22046523; PMCID: PMC3200114.
- 26) van Ierssel SH, Hoymans VY, Van Craenenbroeck EM, Van Tendeloo VF, Vrints CJ, et al. (2012) Endothelial Microparticles (EMP) for the Assessment of Endothelial Function: An In Vitro and In Vivo Study on Possible Interference of Plasma Lipids. *PLOS ONE* 7(2): e31496. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031496>.

16. Résumé des caractéristiques de sécurité et des performances

Le résumé des caractéristiques de sécurité et des performances sera disponible dans la base de données Eudamed à l'adresse <https://ec.europa.eu/tools/eudamed/#/screen/home>. D'ici là, le résumé des caractéristiques de sécurité et des performances est disponible sur demande.

17. Utilisation de marques tierces

BD FACSCanto™ II, BD FACSLyric™, BD Multitest™ et FlowJo™ sont des marques déposées de Becton, Dickinson and Company. CD-Chex Plus® est une marque déposée de Streck. CyLyse™ FX, Sysmex XN-1000™ et Sysmex XF-1600™ sont des marques déposées de Sysmex Corporation. VenturiOne® est une marque déposée d'Applied Cytometry. Infinicyt™ est une marque déposée de Cytognos S.L..

18. Historique des révisions

Version 2, ED7735_IFU_v2

- 1) Ajout du numéro d'identification de l'organisme notifié.
- 2) Correction du texte dans la section « Contexte d'un état physiologique ou pathologique ».
- 3) Ajout d'interférences endogènes et exogènes.
- 4) Ajout de la précision du chapitre.
- 5) Insérer une nouvelle section : Limite de détection / limite de quantification / seuil du dosage
- 5) Section 13. Valeurs attendues - corrections mineures du texte.
- 6) Références mises à jour.
- 7) Ajout d'un nouveau chapitre, le numéro 16. Résumé des caractéristiques de sécurité et des performances.

19. Fabricant

EXBIO Praha, a.s.
Nad Safinou II 341
25250 Vestec
République tchèque

Coordonnées

info@exbio.cz
technical@exbio.cz
orders@exbio.cz
www.exbio.cz

20. Représentants autorisés

N/A

REMARQUE : Tout incident grave survenu en relation avec le dispositif doit être signalé au fabricant et à l'autorité compétente locale.