CD34 QuantiFlowEx Kit

50 essais | N° de réf. **ED7080**

IVD CE 2265

Mode d'emploi (FR)

Version : ED7080_IFU_v5_FR

Date de publication : 24-10-2024

Symboles figurant sur l'étiquetage du produit

IVD	Dispositif médical de diagnostic in vitro		Limite de température
CE 2265	Marquage CE de conformité Numéro d'identification de l'organisme notifié		Tenir à l'écart de la lumière du soleil
	Fabricant		Garder au sec Maintenir à l'abri de la pluie
UDI	Identifiant unique du dispositif		Mise en garde
	Consulter le mode d'emploi	CONC 10×	Solution concentrée (10x)
	Contient suffisamment d'unités pour <n> tests	CONTENTS	Contenu
REF	Référence catalogue	UK CA	Marque UKCA
LOT	Code du lot		
	Date de péremption		

1. Usage prévu

Le CD34 QuantiFlowEx Kit est destiné à la détection et au comptage des cellules souches hématopoïétiques viables totales à partir du total des leucocytes viables dans des échantillons de sang et de tissus humains par cytométrie en flux.

Éléments détectés et/ou mesurés

Le dispositif CD34 QuantiFlowEx Kit détecte et mesure les pourcentages relatifs et les nombres absolus de cellules souches hématopoïétiques humaines viables (CD34+CD45dim).

Fonction du dispositif

Le dispositif est destiné à la surveillance du décompte de cellules souches hématopoïétiques dans le sang périphérique, la moelle osseuse et les produits de leucaphérèse.

Contexte d'un état physiologique ou pathologique

Le décompte précis du nombre de cellules souches hématopoïétiques (CSH) dans le sang humain et les échantillons de tissus ou les greffons destinés à la transplantation est nécessaire pour la prise en charge des patients ou le traitement des greffons [(1)].

Type de dosage

Non automatisé

Quantitatif

Type d'échantillon requis

Sang périphérique normal, sang périphérique mobilisé, produit(s) de leucaphérèse ou moelle osseuse.

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.

Le 7-AAD est un colorant imperméable à la membrane cellulaire qui est exclu des cellules viables et se lie à l'ADN dans les cellules non viables. Les différences d'intensité de la fluorescence cellulaire permettent d'exclure les cellules non viables de l'analyse.

4. Réactif(s) fourni(s)

Contenu

Le dispositif CD34 QuantiFlowEx Kit contient suffisamment d'unités pour 50 tests et est fourni avec les réactifs suivants :

Staining Reagent (ED7080-1 ; 1 flacon) contenant 1 ml d'une combinaison prémélangée d'anticorps monoclonaux marqués au fluorochrome CD45 FITC et CD34 PE, dilués à des concentrations optimales dans du sérum physiologique tamponné au phosphate (PBS) stabilisant contenant de l'azoture de sodium 15 mM, voir le Tableau 1.

7-AAD (ED7080-2 ; 1 flacon) contenant 1 ml de colorant de viabilité cellulaire 7-aminoactinomycine D (7-AAD), dilué à une concentration optimale dans du sérum physiologique tamponné au phosphate (PBS) stabilisant contenant de l'azoture de sodium 15 mM.

Lysing Solution (ED7080-3 ; 1 flacon) contenant 15 ml de solution tamponnée concentrée (10X) à base de chlorure d'ammonium, sans fixateur.

Composition

Tableau 1 Description et concentrations des composants actifs

Antigène	Fluorochrome	Clone	Isotype	Concentration (µg/ml)
CD45	FITC	MEM-28	IgG1	30
CD34	PE	4H11 [APG]	IgG1	35

5. Matériel requis, mais non fourni

Pour les méthodes à plate-forme simple et double

Tubes à essai à fond rond (12 x 75 mm)

Eau déionisée (qualité réactif)

Cellules de contrôle de processus (Streck CD-Chex CD34®, contrôle CD34 – 3 niveaux, n° de réf. 213337, 213347, 213383 ou un contrôle de cellules lysables équivalent avec un décompte prédéfini de CSH CD34)

Uniquement pour la méthode à plate-forme simple

Étalon de décompte des cellules fluorescentes

- à utiliser avec les cytomètres Becton Dickinson
    - Tubes BD Trucount™
- à utiliser avec les cytomètres Beckman Coulter
    - Beckman Coulter Flow-Count™ Fluorospheres

6. Équipement requis

Pour les méthodes à plate-forme simple et double

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

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

Billes de comptage (tubes TruCount™ (BD Biosciences ; N° de réf. 663028), FlowCount Fluorospheres (Beckman Coulter ; n° de réf. 7547053)

Mélangeur de type vortex

Cytomètre en flux avec deux sources d'excitation laser (488 nm), détecteurs de lumière diffuse, filtres optiques et 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
7-AAD	488	670

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

Uniquement pour la méthode à double plate-forme

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

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

Les réactifs fournis se présentent normalement sous forme de 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 ou des tissus prélevés dans un récipient pour échantillon classé comme dispositif médical, avec l'anticoagulant EDTA, l'héparine ou l'ACD (Acide-Citrate-Dextrose).

L'échantillon suivant peut être analysé à l'aide du dispositif :

sang périphérique normal et mobilisé, produits de leucaphérèse et moelle osseuse.

REMARQUE : Pour l'analyse à double plate-forme, déterminer le nombre absolu de cellules leucocytaires dans l'échantillon prélevé par un analyseur d'hématologie. Le dispositif CD34 QuantiFlowEx Kit ne fournit pas à lui seul le nombre de cellules absolu.

Traiter les échantillons de sang au plus tard 24 heures après leur prélèvement.

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	À des concentrations élevées, l'albumine peut interférer en raison de sa capacité à se lier et à libérer de grandes quantités de ligands.	2, 3, 4
Bilirubine (ictère) (non conjugué)	La bilirubine peut augmenter le fond de fluorescence des cellules en raison de sa forte autofluorescence.	5, 6, 7
Débris cellulaires (après lyse)	Les débris cellulaires peuvent fausser la numération cellulaire et épuiser les anticorps présents dans le dispositif.	8, 9
Érythrocytes	Une lyse insuffisante des globules rouges présents dans l'échantillon peut fausser la numération cellulaire.	6
Hémoglobine	Les échantillons hémolysés peuvent donner des résultats erronés.	10
Anticorps anti-murins humains	Le traitement par anticorps monoclonaux peut donner des résultats erronés (capacité à se lier aux antigènes de surface des cellules).	11, 12, 13, 14, 15, 16
Immunoglobulines	Ne peut être lavé et peut donner une numération erronée des sous-ensembles	8

	de lymphocytes.	
Facteurs rhumatoïdes	La présence de facteurs rhumatoïdes interfère avec les tests immunologiques multiplex (MIA).	17
Triglycérides	Des niveaux élevés de lipides circulants peuvent affecter l'analyse par cytométrie en flux de certaines populations de cellules sanguines.	18

Interférences exogènes

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

Les échantillons réfrigérés peuvent donner des résultats erronés.

Une mauvaise préparation de la solution de lyse érythrocytaire peut conduire à des résultats erronés. Suivre les instructions du fabricant pour l'utilisation de la solution de lyse érythrocytaire.

10. Procédure

Préparation du ou des réactifs fournis

Staining Reagent et 7-AAD

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.

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.

Lysing Solution

Diluer la solution de lyse des érythrocytes concentrée (10X) dans la solution de lyse de travail (1X) avec de l'eau déionisée.

> **MISE EN GARDE :** La solution de lyse de travail (1X) est stable pendant **1 jour seulement**. Préparer une solution de lyse de travail récente (1X) chaque jour de mesure en mélangeant 1 volume de solution de lyse concentrée (10X) avec 9 volumes d'eau déionisée et la conserver dans le distributeur de liquide ou dans un récipient fermé à température ambiante.

Préparation du matériel requis, mais non fourni

Pour la préparation et l'utilisation des étalons de comptage des cellules fluorescentes, suivre les instructions du fabricant.

Contrôle de qualité

Utiliser Streck CD-Chex CD34® ou des cellules de contrôle équivalentes comme contrôle de procédure positif pour garantir le bon fonctionnement du dispositif comme prévu. Streck CD-Chex CD34® fournit des valeurs établies pour le pourcentage de comptages positifs et absolus de CSH CD34+.

Colorer les cellules de contrôle à l'aide du CD34 QuantiFlowEx Kit 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 – Méthode à plate-forme simple

1. Pour chaque échantillon, étiqueter un tube à essai à fond rond de 12×75 mm avec l'identification appropriée de l'échantillon.

   REMARQUE : Utiliser le tube BD Trucount™ comme tube à essai pour le nombre absolu des cellules souches CD34.

2. Pipeter 20 µl de réactif de coloration au fond du tube à essai.

3. Pipeter 20 µl de 7-AAD au fond du tube à essai.

4. Pipeter 100 µl d'échantillon bien mélangé au fond du tube à essai en utilisant la technique de pipetage inversé.

   MISE EN GARDE : La précision du pipetage est essentielle pour le nombre absolu des cellules souches CD34+. Par conséquent, il convient d'utiliser la technique de pipetage inversé à l'aide d'une pipette à déplacement d'air automatique.

   Pour l'aspiration de l'échantillon par pipetage inversé, appuyer sur le bouton de la pipette jusqu'à la 2^{e} butée et aspirer l'échantillon. Placer ensuite l'embout de la pipette contenant l'échantillon de sang près du fond du tube, puis appuyer sur le bouton de la pipette jusqu'à la 1ère butée pour distribuer l'échantillon.

   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.

5. Agiter au vortex et laisser incuber le tube à essai pendant 20-30 minutes à température ambiante dans l'obscurité.

6. Ajouter 2 ml de la solution de lyse de travail (1X) dans le tube à essai.

7. Agiter au vortex et laisser incuber le tube à essai pendant 10 minutes à température ambiante dans l'obscurité.

8. Si le tube BD Trucount™ n'a pas été utilisé comme tube à essai, ajouter 100 µl

de Flow Count™ Fluorospheres en utilisant la technique de pipetage inversé. Suivre les instructions du fabricant.

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

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

Coloration des échantillons – méthode à double plate-forme

MISE EN GARDE : Déterminer le nombre absolu de cellules leucocytaires dans l'échantillon prélevé par un analyseur d'hématologie avant le traitement de l'échantillon.

1. Pour chaque échantillon, étiqueter un tube à essai à fond rond de 12×75 mm avec l'identification appropriée de l'échantillon.
2. Pipeter 20 µl de réactif de coloration au fond du tube à essai.
3. Pipeter 20 µl de 7-AAD au fond du tube à essai.
4. Pipeter 100 µl d'échantillon bien mélangé au fond du tube à essai en utilisant la technique de pipetage inversé.
5. Agiter au vortex et laisser incuber le tube à essai pendant 20-30 minutes à température ambiante dans l'obscurité.
6. Ajouter 2 ml de la solution de lyse de travail (1X) dans le tube à essai.
7. Agiter au vortex et laisser incuber le tube à essai pendant 10 minutes à température ambiante dans l'obscurité.
8. Récupérer l'échantillon coloré immédiatement sur le cytomètre en flux. Si l'échantillon coloré n'est pas récupéré immédiatement, boucher le tube à essai, le conserver à 2-8 °C dans l'obscurité et l'analyser dans les 2 heures qui suivent.

   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 CD34 QuantiFlowEx Kit doit être étalonné 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 décrites 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.

Selon l'échantillon, récupérer au moins 300 000 à 1 000 000 événements par tube.

Toujours obtenir les paramètres de diffusion de la lumière cellulaire : Diffusion de la lumière en biais vers l'avant (aussi bien la zone du signal que la hauteur du signal) et diffusion latérale (perpendiculaire) de la lumière (aussi bien la zone du signal que la hauteur du signal).

Pour la méthode **à plate-forme simple**, définir le seuil de fluorescence dans le détecteur FITC plutôt que la taille de l'événement pour la collecte de données. Le seuil de diffusion vers l'avant (taille de l'événement) peut exclure de l'analyse les événements de microparticules de l'étalon de comptage, ce qui aura une influence négative sur le comptage du pourcentage de cellules souches CD34+.

Pour la méthode à **double plate-forme**, définir le seuil sur Diffusion vers l'avant.

Compenser les signaux de fluorescence entre les détecteurs avant ou après la récupération des données. Les données peuvent être interprétées de manière incorrecte si les signaux de fluorescence sont mal compensés ou si les trappes sont mal positionnées.

> **REMARQUE :** Les échantillons à faible viabilité cellulaire attendue doivent être utilisés pour la préparation du contrôle de compensation 7-AAD, par exemple des cellules sanguines traitées avec une solution de lyse à base de formaldéhyde. Les échantillons à haute viabilité cellulaire fournissent un faible nombre de cellules mortes. Un faible nombre de cellules mortes peut influencer négativement l'intensité de fluorescence moyenne des cellules mortes 7-AAD et peut produire une compensation inadéquate.

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 avec CD34 QuantiFlowEx Kit

Analyser les données mesurées et compensées à l'aide d'un logiciel approprié. Le protocole d'entrée de l'International Society for Hematotherapy and Graft Engineering (ISHAGE) (Fig. 1-5) doit être appliqué pour le comptage du pourcentage de cellules souches CD34+ vivantes.

En utilisant 5 paramètres (2 paramètres de diffusion de la lumière et 3 paramètres de fluorescence), les cellules souches hématopoïétiques CD34+ sont identifiées par une combinaison d'entrées séquentielle et booléenne en fonction de leurs propriétés.

Les vraies cellules souches CD34+ expriment les antigènes CD34 et CD45, mais l'expression de l'antigène CD45 est similaire à celle des cellules blastiques. L'intensité de la coloration est détectable, mais plus faible que dans les lymphocytes, par exemple.

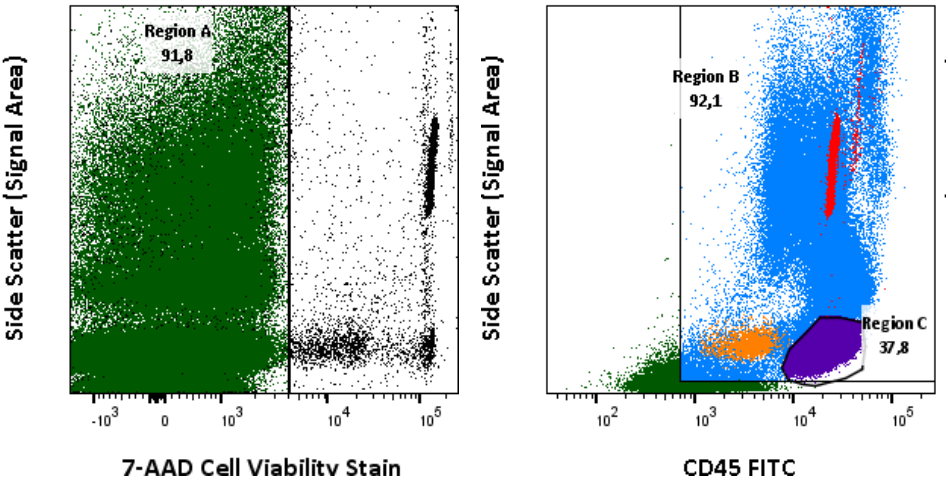
Les vraies cellules souches CD34+ émettent aussi un signal de diffusion de la lumière en biais vers l'avant similaire à celui des cellules blastiques ou des lymphocytes et présentent de faibles propriétés de diffusion de la lumière perpendiculaire (diffusion latérale).

Les figures 1 à 5 montrent la séquence d'entrée logique assurant l'identification précise des cellules souches CD34 + vivantes pour un comptage précis en pourcentage.

Tout d'abord, visualisez tous les événements **dans un diagramme en pointillés de la zone de signal à diffusion latérale (SSC-A)** par **rapport à la coloration** de viabilité 7-AAD et placez une trappe autour des cellules **vivantes (7-AAD négatif) comme** indiqué par la région A dans l'image de gauche.

REMARQUE : Lors de l'utilisation d'un contrôle sanguin stabilisé, par exemple Streck CD-Chex CD34®, il est vivement conseillé de vérifier la viabilité de la Région A et de repositionner la région si nécessaire, car le sang stabilisé contient du formaldéhyde qui imprègne la membrane cellulaire, ce qui entraîne une coloration positive -du colorant de viabilité 7AAD.

Figure 1 L'image de gauche représente la sélection d'une population viable. L'image de droite représente tous les événements délimités des régions A, B, C, G (dérivées de la région F) et I.

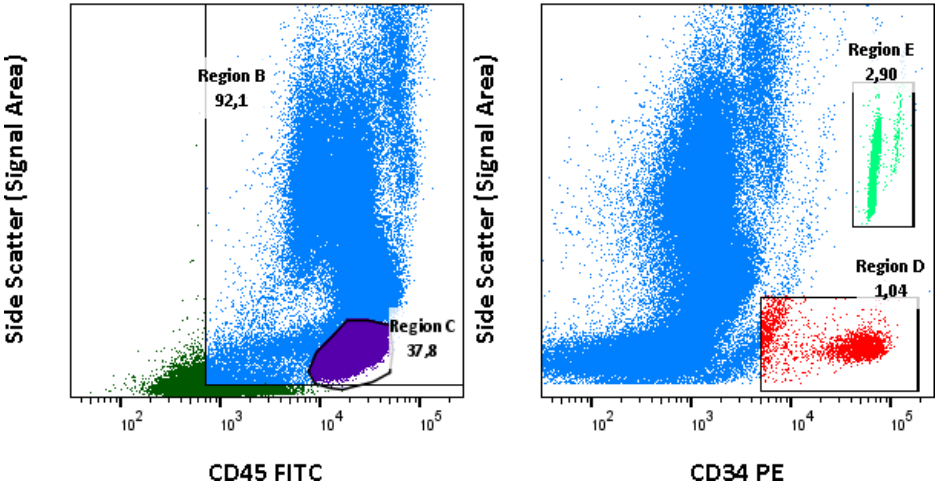


Visualiser les cellules de la région A dans un graphique par points SSC-A vs. CD45 FITC et placer une trappe autour des **leucocytes (région B)** et une trappe autour **des lymphocytes** représentés par **la région C**.

Amener les cellules de la région B dans un graphique par points SSC-A vs. CD34 PE et placer une trappe autour des événements positifs **CD34 (région D)**.

L'image de droite montre **tous les événements**, y compris les microparticules fluorescentes de la **région I** représentées dans **la région E**. **La région E** indique les propriétés optiques et fluorescentes de l'étalon de comptage des microparticules fluorescentes présent dans le tube BD TruCount™ (uniquement pour la méthode à plate-forme unique).

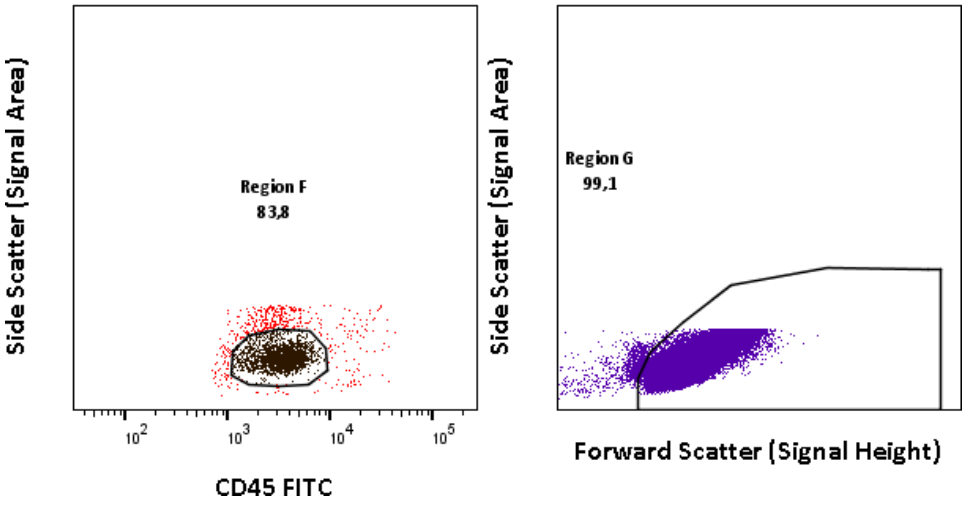
Figure 2 L'image de gauche représente la sélection de la population viable de leucocytes (région B) et de lymphocytes (région C). L'image de droite montre des événements CD34 positifs viables (région D) sélectionnés parmi les leucocytes (région B). Pour la méthode à plate-forme unique, une trappe (région E) peut être placée autour des billes fluorescentes



Purifier les événements CD34 positifs de la région D en plaçant une **région F** autour d'un groupe de cellules positives CD45 dim dans le graphique à points SSC-A vs. CD45 FITC avec les événements de la région D, comme indiqué dans la figure 3 à gauche.

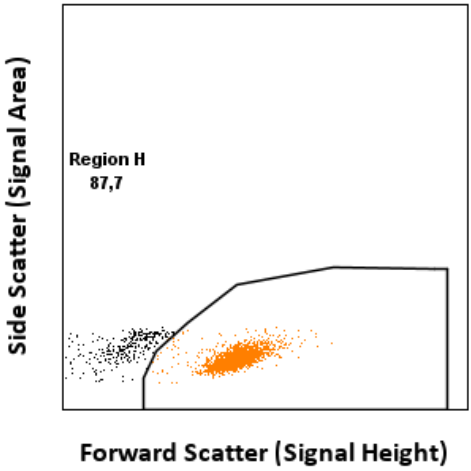
Afficher les lymphocytes $CD45^+$ (Région C) dans le graphique à points SSC-A vs FSC-H (hauteur du signal de diffusion vers l'avant). Placer une nouvelle trappe délimitant les lymphocytes $CD45^+$ de débris et d'événements mineurs (**Région G**), comme indiqué sur la figure 3 de droite.

Figure 3 L'image de gauche montre l'élimination des cas non spécifiques colorés par le CD34, c'est-à-dire les plaquettes ou les agrégats. La région F a été utilisée pour délimiter les cellules spécifiquement colorées qui sont CD45dimSSCslow CD34+. L'image de droite montre la délimitation des lymphocytes $CD45^+$ (région G) de la région C.



Copier la trappe de **la région G** délimitant les lymphocytes de la **figure 3** (image de droite) et coller celle-ci dans le graphique à points SSC-A vs. FSC-H contenant les événements de la **région F** et créer la région H afin de distinguer le groupe de cellules souches CD34+ des débris et événements mineurs. Les cellules de la Région F (Figure 3) détectées à l'intérieur de la trappe de la **Région H** représentent les vraies cellules souches $CD34^+$.

Figure 4 L'image représente la sélection des vraies cellules souches CD34+ (région H).



Uniquement pour la méthode à plate-forme simple :
Pour s'assurer que la trappe correcte des billes fluorescentes (région E) est installée, les trappes de contrôle (régions I, J, K dans les figures 5 et 6) doivent être visualisées.

Visualiser **tous les événements** dans CD34 PE vs. CD45 FITC et placer les régions autour de l'étalon de comptage des microparticules fluorescentes délimitant les microparticules de BD TruCount™ (**Région I**) ou les microparticules de Beckman Coulter's Flow-Count™ (**Région J**).

REMARQUE : La taille des billes de comptage et les propriétés de fluorescence peuvent varier d'un fabricant à l'autre.

Figure 5 L'image de gauche représente la taille et les propriétés fluorescentes des billes du tube BD TruCount™ (région I). L'image de droite représente la taille et les propriétés fluorescentes des billes BC Flow-Count™ Fluorospheres (région J).

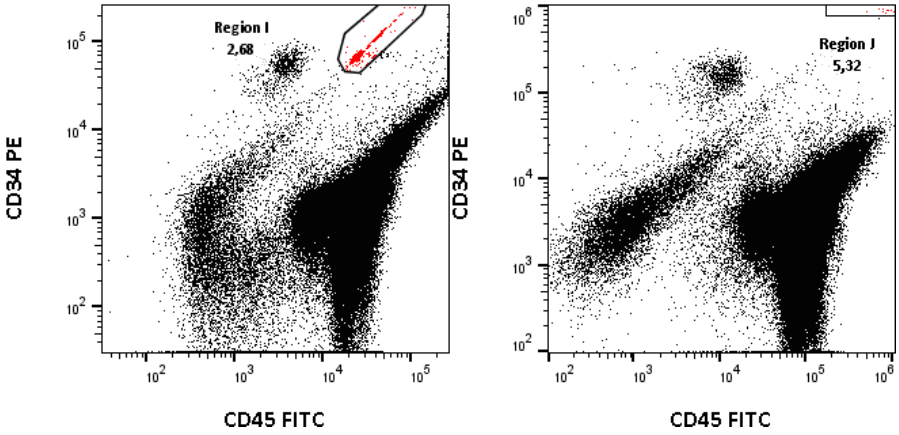
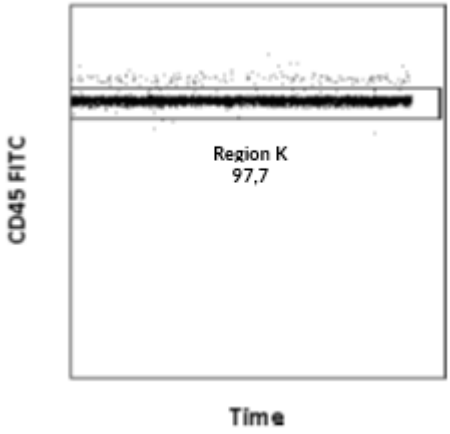


Figure 6 L'image présente toutes les billes de comptage de singulets dans le temps (**région K**).



REMARQUE : Toute non-homogénéité dans la région K (perturbation de l'acquisition, diminution de la fluorescence) doit faire l'objet d'un réexamen. Une acquisition non homogène des événements ou une acquisition qui n'est pas perpendiculaire à l'axe du CD45 FITC indique des problèmes de fluidité d'un cytomètre en flux.

Calcul et interprétation des résultats de l'analyse – Méthode à simple plate-forme

Utiliser les équations ci-dessous pour le nombre absolu et le pourcentage des cellules souches CD34⁺ vivantes à partir de tous les leucocytes vivants.

Nombre absolu des cellules souches CD34⁺ vivantes pour 1 µl de sang :

$$CD34^{+}Abs = \frac{Region\ H}{Region\ E} \times \frac{P}{V} \times DF$$

Nombre absolu des leucocytes vivants pour 1 µl de sang :

$$WBC\ Abs = \frac{Region\ B}{Region\ E} \times \frac{P}{V} \times DF$$

Décompte en pourcentage des cellules *CD34⁺* vivantes à partir de tous les leucocytes vivants :

$$\%\ CD34^{+} = \frac{CD34^{+}Abs}{WBC\ Abs} \times 100$$

CD34⁺ Abs	nombre absolu des cellules souches CD34⁺ vivantes pour 1 µl de sang
WBC Abs	nombre absolu des leucocytes vivants pour 1 µl de sang
% CD34⁺	pourcentage de cellules souches CD34⁺ vivantes parmi tous les leucocytes vivants
Région B	nombre d'événements dans la Région B (leucocytes)
Région H	vraies cellules souches CD34⁺
Région E	nombre d'événements dans la région E (microparticules)
P	nombre de microparticules par test (présentes dans le tube à essai) indiqué par le fabricant des microparticules
V	volume de l'échantillon – 100 µl
DF	facteur de dilution (dilution de l'échantillon avant coloration) ; DF = 2 signifie que 1 volume de sang (100 µl) a été dilué avec 1 volume de PBS contenant 0,5 % de BSA (100 µl)

Calcul et interprétation des résultats de l'analyse – Méthode à double plate-forme

Utilisez un analyseur d'hématologie pour définir le décompte de leucocytes par µl d'échantillon. Se reporter aux instructions du fabricant de l'analyseur d'hématologie.

Utiliser les équations ci-dessous pour le nombre absolu et le pourcentage des cellules souches CD34⁺ vivantes à partir de tous les leucocytes vivants.

Nombre absolu des cellules souches CD34⁺ vivantes pour 1 µl de sang :

$$CD34^{+}Abs = \frac{Region\ H}{Region\ B} \times WBC\ Abs \times DF$$

Décompte en pourcentage des cellules *CD34⁺* vivantes à partir de tous les leucocytes vivants :

$$\%\ CD34^{+} = \frac{Region\ H}{Region\ B} \times 100$$

CD34⁺ Abs	nombre absolu des cellules souches CD34⁺ vivantes pour 1 µl de sang
WBC Abs	nombre absolu des leucocytes vivants pour 1 µl de sang défini à l'aide d'un analyseur d'hématologie
% CD34⁺	pourcentage de cellules souches CD34⁺ vivantes parmi tous les leucocytes vivants
Région B	nombre d'événements dans la Région B (leucocytes)
Région H	nombre de vraies cellules souches CD34⁺
DF	facteur de dilution (dilution de l'échantillon avant coloration) ; DF = 2 signifie que 1 volume de sang (100 µl) a été dilué avec 1 volume de PBS contenant 0,5 % de BSA (100 µl)

11. Performances analytiques

Spécificité

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 [19]).

L'anticorps 4H11[APG] reconnaît l'épitope de classe III de l'antigène humain CD34 (mucosialine). La spécificité de l'anticorps a été confirmée par l'atelier HLDA (atelier HLDA VI [20]).

Précision

L'exactitude de la méthode a été déterminée en comparant le dispositif CD34 QuantiFlowEx Kit avec la méthode à double plate-forme interne d'un laboratoire clinique accrédité bien documenté (cocktail d'anticorps conjugués à une seule couleur provenant de différents fabricants, combiné à une solution de lyse à base de chlorure d'amonium) par la coloration parallèle de 75 échantillons de sang ou de tissus analysés à la fois par le cytomètre de flux BD FACSCanto™ II ou le cytomètre en flux Beckman Coulter Navios (tableau 4, 5, 6). Les paramètres de l'analyse de régression linéaire sont présentés dans les tableaux 4 à 6.

Tableau 4 Analyse de régression linéaire pour les cellules souches CD34+ dans le sang périphérique (comparaison du dispositif CD34 QuantiFlowEx Kit avec la méthode interne d'un laboratoire clinique accrédité) analysées par le cytomètre en flux BD FACSCanto™ II ou le cytomètre en flux Beckman Coulter Navios.

Comparaison entre ED7080 et la méthode accréditée						
Sang périphérique						
Population cible	**Unité**	**n**	**Pente**	**Ordonnée à l'origine**	**r^2**	**Intervalle**
$CD34^+CD45dim$	%	30	0,9743	-0,0005	0,9967	0,02 - 2,22
	cellules/µl	30	0,9757	-0,4106	0,9947	0,24 - 468

Tableau 5 Analyse de régression linéaire pour les cellules souches CD34+ dans les produits de leucaphérèse (comparaison du dispositif CD34 QuantiFlowEx Kit avec la méthode interne d'un laboratoire clinique accrédité) analysées par le cytomètre en flux BD FACSCanto™ II ou le cytomètre en flux Beckman Coulter Navios.

Comparaison entre ED7080 et la méthode accréditée						
Produits de leucaphérèse (CSSP)						
Population cible	**Unité**	**n**	**Pente**	**Ordonnée à l'origine**	**r^2**	**Intervalle**
$CD34^+CD45dim$	%	25	0,9999	-0,0061	0,9925	0,81 - 10,56
	cellules/µl	25	0,9844	45,762	0,9918	1392 - 17497

Table 6 Linear regression analysis for CD34+ stem cells in bone marrow (comparison of the device CD34 QuantiFlowEx Kit accredited clinical laboratory in-house method) analysed by BD FACSCanto™ II flow cytometer or Beckman Coulter Navios flow cytometer.

Comparaison entre ED7080 et la méthode accréditée						
Moelle osseuse						
Population cible	**Unité**	**n**	**Pente**	**Ordonnée à l'origine**	**r^2**	**Intervalle**
$CD34^+CD45dim$	%	20	0,9385	0,0467	0,9954	0,24 - 3,14
	cellules/µl	20	1,028	-4,1351	0,9991	47 - 1708

Linéarité

La linéarité de la méthode a été vérifiée sur un dérivé sanguin de couche leucocytaire d'un donneur de sang sain enrichi de 11 dilutions consécutives (en série ; 2 fois) de cellules CD34+ (KG-1) en 1 jour par 1 opérateur, analysé par le

cytomètre en flux BD FACSCanto™ II. La régression linéaire a été utilisée pour l'évaluation de la valeur attendue par rapport à la valeur moyenne récupérée à chaque dilution. La plage de linéarité est répertoriée dans le Tableau 7.

Tableau 7 Linéarité du dispositif sur BD FACSCanto™ II

BD FACSCanto™ II					
Population cible	**Unité**	**Pente**	**Ordonnée à l'origine**	**r^2**	**Intervalle**
$CD34^+CD45dim$	cellules/µl	1,0648	4,4804	1,0000	3,64-2862

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 BD FACSLyric™ et du cytomètre en flux Sysmex XF-1600™. Les coefficients de variation (CV) sont indiqués dans les tableaux ci-dessous (Tableaux 8 et 9).

Tableau 8 Répétabilité du dispositif sur BD FACSLyric™

BD FACSLyric™					
Population cible	**Unité**	**n**	**Plage de valeurs évaluée**	**É-T**	**CV (%)**
$CD34^+CD45dim$	%	10	0,03-0,07	0,0035	7,2
	cellules/µl	10	8-20	1,0	7,2

Tableau 9 Répétabilité du dispositif sur Sysmex XF-1600™

Sysmex XF-1600™					
Population cible	**Unité**	**n**	**Plage de valeurs évaluée**	**É-T**	**CV (%)**
$CD34^+CD45dim$	%	10	0,03-0,07	0,0047	9,4
	cellules/µl	10	7-20	1,2	9,4

Reproductibilité

La reproductibilité du test a été mesurée sur un échantillon de sang stabilisé (CD-Chex CD34, Niveau 3) dans les mêmes conditions pendant 15 jours. Les échantillons ont été analysés à l'aide du cytomètre en flux BD FACSLyric™ et du cytomètre en flux Sysmex XF-1600™. Les coefficients de variation (CV) sont indiqués dans les tableaux ci-dessous (Tableaux 10 et 11).

Tableau 10 Reproductibilité du dispositif sur BD FACSLyric™

Reproductibilité – BD FACSLyric™						
Type d'échantillon	**Plage attendue (%)**	**Valeur moyenne attendue (%)**	**Valeur moyenne obtenue (%)**	**É-T**	**CV (%)**	**Plage de valeurs mesurée**
CD-Chex CD34, Level 3	1,35 – 1,95	1,65	1,67	0,06	3,6	1,46-1,70

Tableau 11 Reproductibilité du dispositif sur Sysmex XF-1600™

Reproductibilité – Sysmex XF-1600™						
Type d'échantillon	**Plage attendue (%)**	**Valeur moyenne attendue (%)**	**Valeur moyenne obtenue (%)**	**É-T**	**CV (%)**	**Plage de valeurs mesurée**
CD-Chex CD34, Level 3	1,35 – 1,95	1,65	1,54	0,04	2,8	1,48-1,62

REMARQUE: 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
BD FACSLyric™	BD FACSSuite Software – version 1.5
Sysmex XF-1600™	IPU Software – version 0(0.09-00)
Navios EX	Navios Ex Software v2.0

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

Les données cliniques ont été recueillies sur un site clinique. La performance clinique du dispositif ED7080 a été déterminée en comparant le dispositif CD34 QuantiFlowEx Kit avec la méthode interne d'un laboratoire clinique accrédité. 75 échantillons, comprenant du sang périphérique, des produits de leucaphérèse et des échantillons de moelle osseuse, ont été testés. Dans 67 des 75 cas, la différence entre les méthodes était inférieure à 10 % , ce qui signifie que les

résultats obtenus par les deux méthodes étaient largement identiques. Les différences relatives entre les méthodes variaient de -13 % à +11%. Ces données ont ensuite été comparées à l'aide d'une analyse de régression linéaire et d'une évaluation de Bland-Altmann de la concordance entre les méthodes (différence relative des comptages), qui a montré une très bonne concordance entre les méthodes. La valeur moyenne des différences relatives de comptage entre deux méthodes est de 1 % et une erreur standard de 6%.
Les lignes directrices pour la détermination des CSH CD34+ suggèrent de comparer les résultats avec une différence relative maximale acceptable de 10 % entre les doubles [21]. Selon ces recommandations, ces méthodes fournissent des données qui peuvent être considérées comme équivalentes.

13. Valeurs attendues

Le dispositif est destiné à la détection et au comptage des cellules souches hématopoïétiques totales viables et n'établit aucun diagnostic par lui-même dans le cas où une plage de valeurs normales pourrait être établie.
Pour trois types d'échantillons, les plages de valeurs obtenues lors de l'étude clinique sont présentées dans la section 11 (Performances analytiques), à la partie Précision.

14. Limitations

Le dispositif n'est pas destiné à l'identification et au comptage des cellules souches Les échantillons présentant une numération très élevée des globules blancs doivent être dilués dans du PBS avant la coloration afin d'obtenir une numération leucocytaire inférieure à 20 x 103 cellules/µl [22].

15. Références

1) Sutherland DR, et. al. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. J Hematother. 1996 Jun;5(3):213-26. doi: 10.1089/scd.1.1996.5.213.

2) Tate J, et al. Interferences in immunoassay. Clin Biochem Rev. 2004 May; 25(2):105-20.

3) Selby C. Interference in immunoassay. Ann Clin Biochem. 1999 Nov;36(6):704-21. doi: 10.1177/000456329903600603.

4) Frengen J, et al. Demonstration and minimization of serum interference in flow cytometric two-site immunoassays. Clinical Chemistry. 1994 March;40(3):420–425, https://doi.org/10.1093/clinchem/40.3.420.

5) Htun NM, 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. doi:10.1038/s41467-017-00138-x.

6) Lecoeur H, et al. 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. 1996;198(1):87-99. https://doi.org/10.1016/0022-1759(96)00148-2.

7) XUE Y, et al. 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. Doi: 10.3969/j.issn.1673-8640.2022.12.013.

8) Higgins J, et al. Evaluation of a single-platform technology for lymphocyte immunophenotyping. Clin Vaccine Immunol. 2007 Oct;14(10):1342-8. doi: 10.1128/CVI.00168-07.

9) Lam WK, et al. 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.

10) de Jonge G, et al. Interference of in vitro hemolysis complete blood count. J Clin Lab Anal. 2018 Jun;32(5):e22396. doi: 10.1002/jcla.22396.

11) Kricka LJ. Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. Clin Chem. 1999 Jul;45(7):942-56.

12) Achour L, et al. CD4-CCR5 interaction in intracellular compartments contributes to receptor expression at the cell surface. Blood 2009;113(9): 1938–1947. doi: 10.1182/blood-2008-02-141275.

13) Van Caeneghem Y, et al. Antigen receptor-redirected T cells derived from hematopoietic precursor cells lack expression of the endogenous TCR/CD3 receptor and exhibit specific antitumor capacities. OncoImmunology. 2017;6:3, doi: 10.1080/2162402X.2017.1283460.

14) Stronkhorst A, et al. CD4 Antibody Treatment in Crohn's Disease, Scandinavian Journal of Gastroenterology, 1992;27(194):61-65, doi: 10.3109/00365529209096029.

15) Zinzani, PL, et al. 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. 2022;148:177–190. doi: 10.1007/s00432-021-03833-x.

16) Whiteman KR, et al. 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.

17) Bartels EM, et al. Rheumatoid factor and its interference with cytokine measurements: problems and solutions. Arthritis. 2011;2011:741071. doi: 10.1155/2011/741071.

18) van Ierssel SH, et al. Endothelial Microparticles (EMP) for the Assessment of Endothelial Function: An In Vitro and In Vivo Study on Possible Interference of Plasma Lipids. PLOS ONE. 2012;7(2):e31496. doi: 10.1371/journal.pone.0031496.

19) McMichael AJ, et al. eds. Leucocyte Typing III. White Cell Differentiation Antigens. Oxford: Oxford University Press, 1987.

20) Kishimoto T, et al. eds. Leucocyte Typing VI. New York: Garland Publishing, Inc., 1997.

21) Whitby A, et. al. ISHAGE protocol: are we doing it correctly? Cytometry B Clin Cytom. 2012 Jan;82(1):9-17. doi: 10.1002/cyto.b.20612. Epub 2011 Sep 13.

22) Keeney M, et al. "Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering." Cytometry vol. 34,2 (1998): 61-70. doi: 10.1002/(SICI)1097-0320(19980415)34:2<61::AID-CYTO1>3.0.CO;2-F.

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™, Trucount™, FlowJo™ sont des marques déposées de Becton, Dickinson and Company, Sysmex XF-1600™ est une marque déposée de Sysmex Corporation, CD-Chex CD34® est une marque déposée de Streck, Navios™, Flow-Count™ Fluorospheres est une marque déposée de Beckman Coulter.

18. Historique des révisions

Version 5, ED7080_IFU_v5

Nouvelle présentation de l'IFU conforme aux exigences de l'IVDR (EU) 2017/746. Ajout du numéro d'identification de l'organisme notifié. Ajout d'un nouveau chapitre, le numéro 16, intitulé « Résumé des caractéristiques de sécurité et des performances». Modification du texte de la stratégie d'accès, des recommandations pour l'accès à une plate-forme unique ont été formulées. Clarification du terme « facteur de dilution ». Modifications des chapitres 11, 12, 14 et 15 (ajout de données analytiques et cliniques).

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.