

exbio

DryFlowEx TBNK 6-color
50 essais | N° de réf. ED7736



Mode d'emploi (FR)

Version: ED7736_IFU_v2_FR

Date de publication: 13-02-2024

Symboles figurant sur l'étiquetage du produit

| | | | |
|--|---|--|---|
| | Dispositif médical de diagnostic in vitro | | Limite de température |
| | Marquage CE de conformité | | Tenir à l'écart de la lumière du soleil |
| | Fabricant | | Conserver à l'abri de l'humidité |
| | Identifiant unique du dispositif | | Attention |
| | Consulter le mode d'emploi | | Ne pas réutiliser |
| | Contient suffisamment d'unités pour <n> tests | | Contient <n> tubes à essai à usage unique |
| | Référence catalogue | | Contenu |
| | Code du lot | | Marque UKCA |
| | Date de péremption | | Indique le mandataire en Suisse |

1. Usage prévu

DryFlowEx TBNK 6-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.

What is detected and/or measured

Le dispositif DryFlowEx TBNK 6-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, ainsi que des sous-ensembles de lymphocytes T auxiliaires/inducteurs (CD3+CD4+) et suppresseurs/cytotoxiques (CD3+CD8+).

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 affectations pathologiques et l'évaluation de leurs pourcentages et de leurs nombres peut être utilisée dans l'évaluation des pathologies suivantes :

- Progression de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ^(1, 5, 9, 11)
- Immunodéficiences héréditaires ^(3, 4, 13, 14, 17, 19)
- Maladies auto-immunes ^(6, 8)
- Troubles de la défense immunitaire innée ^(15, 16)

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 DryFlowEx TBNK 6-color permet de réaliser 50 tests et est fourni avec le réactif suivant :

TBNK 6-color ED7736-1 (10 sachets). Chaque sachet contient 5 tubes à usage unique bouchés contenant une combinaison prémélangée de réactifs marqués au fluorochrome séchés avec les ingrédients stabilisants en couche au fond des tubes à essai (12 x 75 mm) ; voir le Tableau 1.

TBNK 6-color Compensation Set ED7736-2 (1 sachet) contenant 6 tubes à usage unique bouchés, contenant chacun un seul réactif marqué au fluorochrome (voir le Tableau 1) séché avec les ingrédients stabilisants en couche au fond du tube (12 x 75 mm).

MISE EN GARDE : Le TBNK 6-color Compensation Set est uniquement destiné à la configuration de la compensation. Les réactifs marqués au fluorochrome simples (voir le Tableau 1) permettent une procédure de compensation simple et précise.

Composition

Tableau 1 Description des ingrédients actifs du TBNK 6-color

| Antigène | Fluorochrome | Clone | Isotype |
|----------|--------------|---------|---------|
| CD3 | FITC | UCHT1 | IgG1 |
| CD16 | PE | 3G8 | IgG1 |
| CD56 | PE | LT56 | IgG2a |
| CD45 | PerCP-Cy™5.5 | MEM-28 | IgG1 |
| CD4 | PE-Cy™7 | MEM-241 | IgG1 |
| CD19 | APC | LT19 | IgG1 |
| CD8 | APC-Cy™7 | LT8 | IgG1 |

5. Matériel requis mais non fourni

Solution de lyse des érythrocytes EXCELLYSE Easy, n° de réf. ED7066

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

Sérum physiologique tamponné au phosphate (1X PBS), pH 7,2 - 7,4

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

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

Mélangeur vortex

Centrifugeuse dotée d'adaptateurs de rotor appropriés pour les tubes à fond rond de 12 x 75 mm

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-Cy™5.5 | 488 | 695 |
| PE-Cy™7 | 488 | 780 |
| APC | 630 – 640 | 660 |
| APC-Cy™7 | 630 - 640 | 780 |

REMARQUE : Le dispositif a été testé sur des 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 20-30 °C.

Éviter l'exposition prolongée à la lumière.

Garder au sec.

MISE EN GARDE : Produit sensible à l'humidité. Ne pas ouvrir le sachet en aluminium avant la première utilisation.



Après la première ouverture, bien refermer le sachet en aluminium avec la fermeture Zip-Lock pour le stockage des tubes inutilisés restants.

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

À l'état normal, le réactif fourni se présente comme est une couche séchée transparente au fond du tube. Ne pas utiliser le réactif si un changement d'aspect est observé, par exemple en cas de présence d'humidité à l'intérieur du tube.

Limitation d'utilisation

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

Ne pas réutiliser les tubes à essai.

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 DryFlowEx TBNK 6-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. | 20, 21, 37 |
| Bilirubine (ictère) (non conjuguée) | La bilirubine peut augmenter le fond de fluorescence des cellules en raison de sa forte auto-fluorescence. | 24, 26, 30 |
| Débris cellulaires (après lyse) | Les débris cellulaires peuvent fausser la numération cellulaire et épuiser les anticorps présents dans le dispositif. | 23, 27 |
| Érythrocytes | Une lyse insuffisante des globules rouges présents dans l'échantillon peut fausser la numération cellulaire. | 28 |
| Hémoglobine | Les échantillons hémolysés peuvent donner des résultats erronés. | 25 |
| Anticorps humains anti-murins | Le traitement par anticorps monoclonaux peut donner des résultats erronés (capacité à se lier aux antigènes de surface de cellules). | 22, 32, 33, 34, 35, 36 |
| Immunoglobulines | Lavage impossible au moyen de la méthode à plate-forme unique, avec susceptibilité d'entraîner une numération erronée des sous-ensembles lymphocytaires. | 23 |
| Facteurs rhumatoïdes | La présence de radiofréquences interfère avec les tests immunologiques multiplex (MIA). | 29 |
| Triglycérides | Des taux élevés de lipides en circulation peuvent affecter l'analyse par cytométrie en flux de certaines populations de cellules sanguines. | 31 |

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 peut donner des résultats erronés. Suivre les instructions d'utilisation du dispositif.

10. Procédure

Préparation du ou des réactifs fournis

TBNK 6-color

Aucune préparation des réactifs n'est nécessaire. Ils sont fournis dans des tubes à essai à usage unique.

MISE EN GARDE : Produit sensible à l'humidité. Ne pas ouvrir le sachet en aluminium avant la première utilisation.



Chaque sachet contient 5 tubes bouchés de réactif TBNK 6-color à usage unique. Après chaque ouverture, bien refermer le sachet en aluminium avec la fermeture Zip-Lock pour le stockage des tubes inutilisés restants.

Après la première ouverture, utiliser les tubes de réactif TBNK 6-color restants dans les 30 jours.

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.

Configuration de la compensation

Récupérer les tubes Compensation Set en utilisant la même configuration de cytomètre en flux, avant l'analyse des tubes de réactifs colorés TBNK 6-color.

MISE EN GARDE : Le TBNK 6-color et le TBNK 6-color Compensation Set nécessitent le même type d'échantillon.

Tubes de compensation TBNK 6-color

1. Pipeter 50 μ l d'échantillon de sang bien mélangé au fond de chaque tube de compensation monochrome.
2. Agiter vigoureusement au vortex pendant 7 à 10 secondes et laisser incuber pendant 20 minutes à température ambiante dans l'obscurité.
3. Ajouter 1 ml de solution de lyse d'érythrocytes diluée (1X) dans chaque tube de compensation.
4. Agiter au vortex et laisser incuber pendant 10 minutes à température ambiante dans l'obscurité.
5. Centrifuger pendant 5 minutes à 300 g, jeter le surnageant et remettre en suspension le culot cellulaire dans 0,2 ml de 1X PBS.

6. 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.
7. Récupérer l'échantillon coloré immédiatement à l'aide d'un cytomètre en flux.

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 trappes sont mal positionnées.

Régler les trappes des populations positives et négatives pour chaque tube de compensation conformément à la Figure 1.

Calculer la matrice de compensation dans un logiciel de cytomètre développé par le fabricant, ou dans un logiciel dédié à l'analyse des données de cytométrie hors ligne. Utiliser cette matrice de compensation pour tous les tubes à essai de ce lot de réactifs TBNK 6-color.

MISE EN GARDE : Une fois réglé pour le lot de réactifs TBNK 6-color spécifique, ne pas modifier les réglages des détecteurs fluorescents afin de conserver les mêmes paramètres de récupération que la matrice de compensation et les mêmes résultats de compensation.

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 le sang de contrôle à l'aide du tube à essai TBNK 6-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. Étiqueter le tube TBNK 6-color avec l'identifiant de l'échantillon approprié.
2. Pipeter 50 µl d'échantillon de sang bien mélangé au fond du tube TBNK 6-color.

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.

3. Agiter vigoureusement au vortex pendant 7 à 10 secondes et laisser incuber pendant 20 minutes à température ambiante dans l'obscurité.

MISE EN GARDE : Écourter le temps d'agitation au vortex pourrait affecter les résultats du test.

4. Ajouter 1 ml de solution de lyse d'érythrocytes diluée (1X) dans le tube TBNK 6-color.
5. Agiter au vortex et laisser incuber pendant 10 minutes à température ambiante dans l'obscurité.
6. Centrifuger le tube TBNK 6-color pendant 5 minutes à 300 g.
7. Jeter le surnageant sans perturber le culot cellulaire et ajouter 0,2 ml de 1X PBS dans le tube à essai.
8. Agiter brièvement au vortex pour remettre en suspension le culot cellulaire.
9. Récupérer l'échantillon coloré à l'aide d'un 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 DryFlowEx TBNK 6-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.

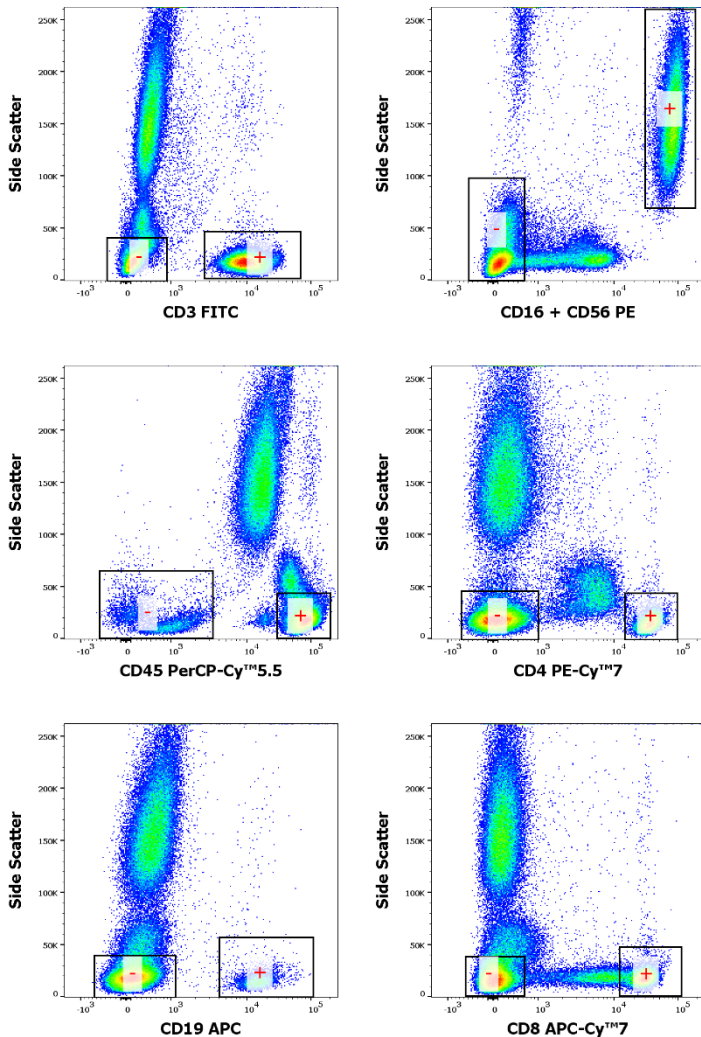
Se reporter aux spécifications du cytomètre indiquées par le fabricant concernant les lasers et les détecteurs de fluorescence selon les caractéristiques d'excitation et d'émission des fluorochromes à la section 6 Équipement requis.

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 tubes de compensation

Visualiser les données non compensées pour chaque tube de compensation dans un diagramme à diffusion latérale (SSC) par rapport au « fluorochrome à compenser ». Régler les trappes pour les populations positives (+) et négatives (-) comme illustré dans la Figure 1.

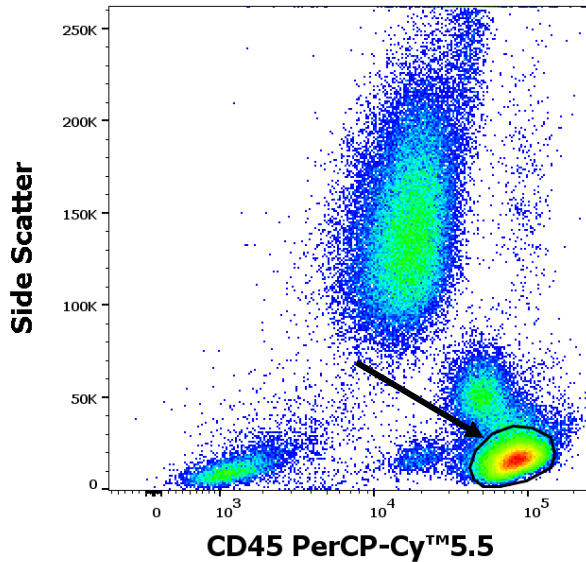
Figure 1 Identification des événements positifs (+) et négatifs (-) dans les tubes de compensation (données acquises sur BD FACSCanto™ II)



Analyse des données de l'échantillon coloré DryFlowEx TBNK 6-color

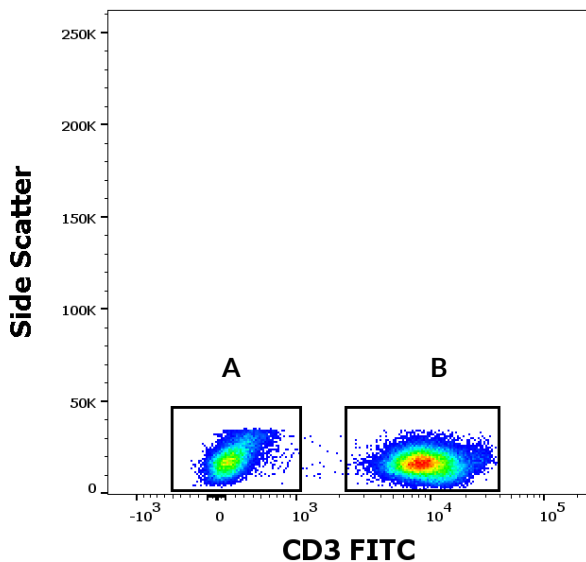
Visualiser les données compensées dans un graphique à dispersion latérale (SSC) par rapport au CD45 PerCP-Cy™5.5. Régler la région pour la population de lymphocytes CD45+ comme indiqué dans la Figure 2.

Figure 2 Délimitation de la population de lymphocytes CD45+ (données acquises sur BD FACSCanto™ II)



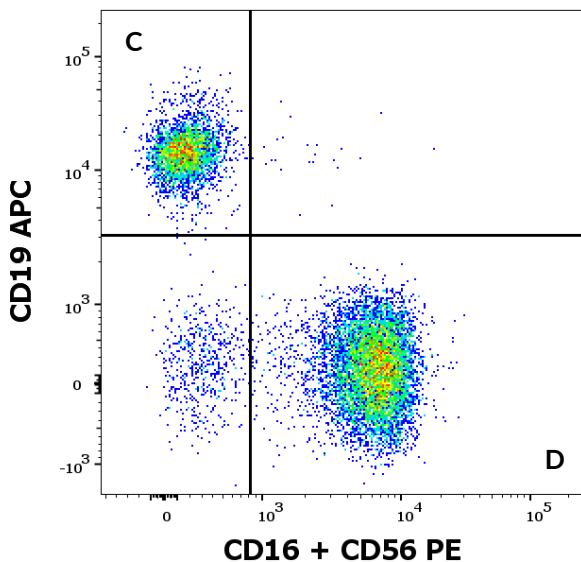
Afficher les lymphocytes CD45+ triés dans un graphique avec la dispersion latérale (SSC) par rapport au CD3 FITC comme le montre la Figure 3. Séparer les lymphocytes CD3+ et CD3- en utilisant les fenêtres appropriées. Calculer le pourcentage de lymphocytes T (CD3+ ; région B dans la Figure 3) par rapport à tous les lymphocytes.

Figure 3 Séparation des lymphocytes CD3+ et CD3- (données acquises sur BD FACSCanto™ II)



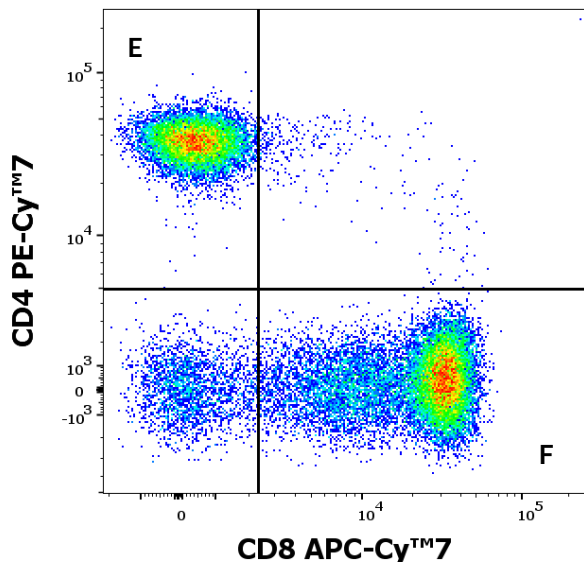
Afficher es lymphocytes CD3 triés (région A dans la Figure 3) sur un graphique CD19 APC par rapport à CD16+CD56 PE comme le montre la Figure 4. Régler les régions appropriées et calculer le pourcentage de lymphocytes B (CD16-CD56-CD19+ ; région C dans la Figure 4) et de cellules tueuses naturelles (NK) (CD16+CD56+CD19- ; région D dans la Figure 4) par rapport à tous les lymphocytes.

Figure 4 Lymphocytes CD3- dans un graphique à points CD19 APC par rapport à CD16+CD56 PE (données acquises sur BD FACSCanto™ II)



Afficher les lymphocytes T triés (CD3+ ; région B dans la Figure 3) sur un graphique CD4 PE-CyTM7 par rapport à CD8 APC-CyTM7 comme le montre la Figure 5. Régler les régions appropriées et calculer le pourcentage de lymphocytes T auxiliaires/inducteurs (CD4+CD8- ; région E dans la Figure 5) et de lymphocytes T suppresseurs/cytotoxiques (CD4-CD8+ ; région F dans la Figure 5) par rapport à tous les lymphocytes.

Figure 5 Lymphocytes CD3+ dans un graphique à points CD4 PE-CyTM7 par rapport à CD8 APC-CyTM7 (données acquises sur BD FACSCantoTM 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/μl)

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 UCHT1 reconnaît un épitope extracellulaire sur l'antigène CD3 du complexe TCR/CD3 sur les lymphocytes T humains matures. L'anticorps UCHT1 réagit avec la chaîne epsilon du complexe CD3. La spécificité de l'anticorps a été confirmée par le HCDM Council (atelier HLDA I⁽²⁾, HLDA III⁽¹²⁾ et HLDA VI⁽⁷⁾).

L'anticorps MEM-241 reconnaît l'antigène CD4 humain (glycoprotéine de surface CD4 des lymphocytes T). La spécificité de l'anticorps a été confirmée par le HCDM Council (atelier HLDA VIII).

L'anticorps LT8 reconnaît l'antigène CD8 humain (dimère à liaison disulfure exprimé sous la forme de deux homodimères de la chaîne alpha du CD8 ou d'hétérodimères de la chaîne alpha/bêta du CD8). La spécificité de l'anticorps a été confirmée par les ateliers HLDA (atelier HLDA V⁽¹⁸⁾ et atelier HLDA VII⁽¹⁰⁾).

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⁽¹⁸⁾).

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⁽¹²⁾).

Précision

La précision de la méthode a été mesurée sur le cytomètre en flux BD FACSCanto™ II et déterminée en comparant le dispositif DryFlowEx TBNK 6-color avec un produit similaire disponible sur le marché KOMBITEST TBNK 6-color (n° de réf. ED7733) par coloration parallèle de 118 donneurs de sang sains.

Sur les cytomètres en flux Beckman Coulter DxFLEx et Sysmex XF-1600™, la précision de la méthode a été déterminée en comparant les résultats de l'analyse des mêmes échantillons sanguins colorés par le dispositif DryFlowEx TBNK 6-color sur les cytomètres en flux BC DxFLEx et BD FACSCanto™ II (92 donneurs sains), respectivement, et sur les cytomètres en flux Sysmex XF-1600™ et BD FACSCanto™ II (71 donneurs sains).

L'exactitude de la méthode a été confirmée par la coloration parallèle de 46 patients (voir le Tableau 7) qu'on soupçonne d'être atteints d'une pathologie du système immunitaire.

Les paramètres de l'analyse de régression linéaire sont présentés dans les Tableaux 4 à 7.

Tableau 4 Analyse de régression linéaire pour les sous-ensembles de lymphocytes chez des donneurs sains (comparaison du dispositif DryFlowEx TBNK 6-color avec le produit de diagnostic in vitro KOMBITEST TBNK 6-color Reagent (EXBIO, n° de réf. ED7733))

| Sous-ensemble de lymphocytes | Unité | n | Pente | Ordonnée à l'origine | R ² | Intervalle |
|------------------------------|-------------|-----|-------|----------------------|----------------|---------------|
| CD3+ | % | 118 | 0.99 | +0.0054 | 0.9696 | 58.50 - 88.20 |
| | cellules/μl | 118 | 1.00 | -9.0904 | 0.9958 | 739 - 2492 |
| CD3+CD8+ | % | 118 | 1.06 | -0.006 | 0.9858 | 6.40 - 47.90 |
| | cellules/μl | 118 | 1.05 | -6.1323 | 0.9910 | 132 - 947 |
| CD3+CD4+ | % | 118 | 1.01 | -0.0015 | 0.9786 | 26.00 - 60.60 |
| | cellules/μl | 118 | 1.02 | -12.603 | 0.9936 | 410 - 1717 |
| CD3-CD16+CD56+ | % | 118 | 1.00 | -0.0023 | 0.9851 | 4.64 - 33.80 |
| | cellules/μl | 118 | 0.99 | -3.9727 | 0.9848 | 89 - 593 |
| CD3-CD19+ | % | 118 | 0.99 | -0.0015 | 0.9794 | 2.60 - 22.70 |
| | cellules/μl | 118 | 0.98 | -0.9509 | 0.9880 | 56 - 608 |

n = nombre d'échantillons sanguins

Tableau 5 Analyse de régression linéaire pour les sous-ensembles lymphocytaires chez les donneurs de sang sains (comparaison du dispositif ED7736 sur le BD FACSCanto™ II avec le dispositif ED7736 sur le BC DxFLEX)

| Sous-ensemble de lymphocytes | Unité | n | Pente | Ordonnée à l'origine | R ² | Intervalle |
|------------------------------|-------------|----|--------|----------------------|----------------|---------------|
| CD3+ | % | 92 | 0.9839 | 0.0106 | 0.9823 | 55.00 - 84.90 |
| | cellules/μl | 92 | 0.9992 | -0.0833 | 0.9985 | 408 - 2525 |
| CD3+CD8+ | % | 92 | 1.0187 | -0.0051 | 0.9864 | 6.25 - 45.40 |
| | cellules/μl | 92 | 1.0083 | -5.1608 | 0.9930 | 130 - 1182 |
| CD3+CD4+ | % | 92 | 0.9872 | 0.0017 | 0.9935 | 12.10 - 63.10 |
| | cellules/μl | 92 | 0.9869 | 3.4994 | 0.9975 | 108 - 1739 |
| CD3-CD16+CD56+ | % | 92 | 0.9857 | 0.0022 | 0.9904 | 4.96 - 32.70 |
| | cellules/μl | 92 | 0.9784 | 5.7585 | 0.9921 | 96 - 676 |
| CD3-CD19+ | % | 92 | 0.9992 | -0.0002 | 0.9900 | 3.23 - 21.60 |
| | cellules/μl | 92 | 1.0031 | -1.0160 | 0.9916 | 58 - 418 |

n = nombre d'échantillons sanguins

Tableau 6 Analyse de régression linéaire pour les sous-ensembles lymphocytaires chez les donneurs de sang sains (comparaison du dispositif ED7736 sur le BD FACSCanto™ II avec le dispositif ED7736 sur le Sysmex XF-1600™)

| Sous-ensemble de lymphocytes | Unité | n | Pente | Ordonnée à l'origine | R ² | Intervalle |
|------------------------------|-------------|----|--------|----------------------|----------------|---------------|
| CD3+ | % | 71 | 0.9942 | 0.0051 | 0.9853 | 53.40 - 85.30 |
| | cellules/μl | 71 | 1.0101 | -10.313 | 0.9990 | 396 - 2440 |
| CD3+CD8+ | % | 71 | 0.9718 | 0.00006 | 0.9878 | 11.30 - 47.90 |
| | cellules/μl | 71 | 0.9646 | 2.6825 | 0.9938 | 121 - 1111 |
| CD3+CD4+ | % | 71 | 0.9885 | 0.0077 | 0.9955 | 13.50 - 63.50 |
| | cellules/μl | 71 | 1.0178 | -7.2726 | 0.9972 | 114 - 1452 |
| CD3-CD16+CD56+ | % | 71 | 0.9905 | 0.0033 | 0.9915 | 5.71 - 33.60 |
| | cellules/μl | 71 | 0.9789 | 8.4040 | 0.9951 | 102 - 676 |
| CD3-CD19+ | % | 71 | 0.9149 | 0.0009 | 0.9652 | 5.11 - 19.20 |
| | cellules/μl | 71 | 0.9128 | 1.8844 | 0.9780 | 53 - 386 |

n = nombre d'échantillons sanguins

Tableau 7 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 DryFlowEx TBNK 6-color avec le système de cytométrie en flux AQUIOS CL - Beckman Coulter, Inc.)

| Sous-ensemble de lymphocytes | % | n | Pente | Ordonnée à l'origine | R ² | Intervalle |
|------------------------------|-------------|----|--------|----------------------|----------------|-------------|
| CD3+ | cellules/μl | 46 | 1.0027 | -0.6999 | 0.98 | 55.1 - 87.6 |
| | % | 46 | 0.9805 | 17.223 | 1.00 | 620 - 2710 |
| CD3+CD8+ | cellules/μl | 46 | 1.0033 | 0.7307 | 0.94 | 8.1 - 39.8 |
| | % | 46 | 1.0595 | 4.148 | 0.97 | 84 - 1130 |
| CD3+CD4+ | cellules/μl | 46 | 1.018 | -0.9716 | 0.97 | 24.4 - 68.2 |
| | % | 46 | 0.9884 | 6.4727 | 0.99 | 494 - 1619 |
| CD3-CD16+CD56+ | cellules/μl | 46 | 1.0469 | -0.5117 | 0.98 | 3.3 - 35.2 |
| | % | 46 | 1.0543 | -11.577 | 0.99 | 74 - 1070 |
| CD3-CD19+ | cellules/μl | 46 | 1.0213 | 0.1708 | 0.96 | 4.3 - 33.6 |
| | % | 46 | 1.036 | -0.1163 | 0.98 | 62 - 958 |

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 DryFlowEx TBNK 6-color en 6 réplicats. Les échantillons ont été analysés à l'aide des cytomètres en flux BD FACSCanto™ II, Beckman Coulter DxFLEX et Sysmex XF-1600™. Les données mesurées pour les sous-ensembles lymphocytaires indiqués ont été observées comme étant linéaires dans la plage de lymphocytes allant de 87 à 7 031 lymphocytes/ μ l avec le BD FACSCanto™ II, de 85 à 6 698 cellules/ μ l avec le Beckman Coulter DxFLEX et de 175 à 14 799 lymphocytes/ μ l avec le Sysmex XF-1600™. Les sous-ensembles cellulaires se situaient dans les plages indiquées dans les Tableaux 8 à 10.

Tableau 8 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+ | 79 - 6427 |
| CD3+CD8+ | 16 - 1271 |
| CD3+CD4+ | 57 - 4749 |
| CD3-CD16+CD56+ | 15 - 1198 |
| CD3-CD19+ | 8 - 722 |

Tableau 9 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+ | 79 - 6251 |
| CD3+CD8+ | 16 - 1274 |
| CD3+CD4+ | 57 - 4583 |
| CD3-CD16+CD56+ | 15 - 1276 |
| CD3-CD19+ | 8 - 704 |

Tableau 10 Intervalles linéaires des sous-ensembles de lymphocytes analysés à l'aide du XF-1600™ de Sysmex

| Sysmex XF-1600™ | |
|------------------------------|--------------------------------|
| Sous-ensemble de lymphocytes | Intervalle (cellules/ μ l) |
| CD3+ | 128 - 10391 |
| CD3+CD8+ | 53 - 4117 |
| CD3+CD4+ | 67 - 5421 |
| CD3-CD16+CD56+ | 32 - 2681 |
| CD3-CD19+ | 14 - 1090 |

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 11 à 13).

La limite de quantification a été définie comme la valeur la plus basse de 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 11 à 13).

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 11 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/ μ l) | $3 \times \text{ÉT}$ (ÉT) | LDD (cellules/ μ l) | LDQ (cellules/ μ l) |
| CD3+ | 1 | 0.6 (0.2) | 1.6 | 3 |
| CD3+CD8+ | 1 | 0.6 (0.2) | 1.6 | 2 |
| CD3+CD4+ | 1 | 0.6 (0.2) | 1.6 | 2 |
| CD3-CD16+CD56+ | 2 | 0.9 (0.3) | 2.9 | 5 |
| CD3-CD19+ | 1 | 0.3 (0.1) | 1.3 | 8 |

Tableau 12 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\timesÉT (ÉT) | LDD (cellules/μl) | LDQ (cellules/μl) |
| CD3+ | 1 | 0.3 (0.1) | 1.3 | 3 |
| CD3+CD8+ | 1 | 0.3 (0.1) | 1.3 | 2 |
| CD3+CD4+ | 1 | 0.6 (0.2) | 1.6 | 2 |
| CD3-CD16+CD56+ | 1 | 0.3 (0.1) | 1.3 | 2 |
| CD3-CD19+ | 1 | 0.6 (0.2) | 1.6 | 8 |

Tableau 13 Limites de détection et de quantification sur le Sysmex XF-1600™

| Sysmex XF-1600™ | | | | |
|------------------------------------|--|------------------------------------|---|---|
| Sous-ensemble lymphocytaire | Numération cellulaire la plus faible non nulle (cellules/μl) | 3\timesÉT (ÉT) | LDD (cellules/μl) | LDQ (cellules/μl) |
| CD3+ | 2 | 0.3 (0.1) | 2.3 | 2 |
| CD3+CD8+ | 1 | 0.6 (0.2) | 1.6 | 2 |
| CD3+CD4+ | 1 | 0.6 (0.2) | 1.6 | 8 |
| CD3-CD16+CD56+ | 1 | 0.6 (0.2) | 1.6 | 11 |
| CD3-CD19+ | 1 | 0.3 (0.1) | 1.3 | 14 |

Répétabilité

La répétabilité du dosage a été mesurée sur dix échantillons de sang en six réplicats. Les échantillons ont été analysés à l'aide des cytomètres en flux BD FACSCanto™ II, Beckman Coulter DxFLEX et Sysmex XF-1600™.

Les coefficients de variation (CV) sont indiqués dans les tableaux ci-dessous (Tableaux 14 à 16).

Tableau 14 Répétabilité du dispositif sur le FACSCanto™ II de BD

| BD FACSCanto™ II | | | | | |
|------------------------------|-------------------|----|---------|------|------|
| Sous-ensemble de lymphocytes | Unité | n | Moyenne | ÉT | % CV |
| CD3+ | % | 10 | 72.15 | 0.27 | 0.38 |
| | cellules/ μ l | 10 | 1454 | 4.9 | |
| CD3+CD8+ | % | 10 | 21.05 | 0.24 | 1.18 |
| | cellules/ μ l | 10 | 434 | 4.8 | |
| CD3+CD4+ | % | 10 | 46.68 | 0.28 | 0.61 |
| | cellules/ μ l | 10 | 932 | 5.1 | |
| CD3-CD16+CD56+ | % | 10 | 15.38 | 0.19 | 1.28 |
| | cellules/ μ l | 10 | 294 | 3.6 | |
| CD3-CD19+ | % | 10 | 11.45 | 0.15 | 1.34 |
| | cellules/ μ l | 10 | 217 | 2.7 | |

Tableau 15 Répétabilité du dispositif sur le DxFLEX de Beckman Coulter

| Beckman Coulter DxFLEX | | | | | |
|-------------------------------|-------------------|----|---------|------|------|
| Sous-ensemble de lymphocytes | Unité | n | Moyenne | ÉT | % CV |
| CD3+ | % | 10 | 70.90 | 0,34 | 0.48 |
| | cellules/ μ l | 10 | 1429 | 6.3 | |
| CD3+CD8+ | % | 10 | 20.33 | 0.33 | 1.33 |
| | cellules/ μ l | 10 | 418 | 5.3 | |
| CD3+CD4+ | % | 10 | 45.60 | 0.27 | 0.72 |
| | cellules/ μ l | 10 | 911 | 6.3 | |
| CD3-CD16+CD56+ | % | 10 | 16.13 | 0.25 | 1.61 |
| | cellules/ μ l | 10 | 308 | 5.0 | |
| CD3-CD19+ | % | 10 | 11.24 | 0.18 | 1.69 |
| | cellules/ μ l | 10 | 213 | 3.3 | |

Tableau 16 Répétabilité du dispositif sur le XF-1600 de Sysmex™

| Sysmex XF-1600™ | | | | | |
|------------------------------|-------------------|----|---------|-------|------|
| Sous-ensemble de lymphocytes | Unité | n | Moyenne | ÉT | % CV |
| CD3+ | % | 10 | 65.29 | 1.23 | 2.22 |
| | cellules/ μ l | 10 | 1090 | 20.6 | |
| CD3+CD8+ | % | 10 | 22.34 | 0.41 | 2.30 |
| | cellules/ μ l | 10 | 377 | 6.90 | |
| CD3+CD4+ | % | 10 | 38.12 | 0.98 | 2.77 |
| | cellules/ μ l | 10 | 633 | 16.30 | |
| CD3-CD16+CD56+ | % | 10 | 20.92 | 0.78 | 3.12 |
| | cellules/ μ l | 10 | 354 | 13.10 | |
| CD3-CD19+ | % | 10 | 11.96 | 0.44 | 3.81 |
| | cellules/ μ l | 10 | 193 | 7.10 | |

Reproductibilité

La reproductibilité du dosage sur le BD FACSCanto™ II et le Beckman Coulter DxFLEX a été mesurée sur 2 échantillons de sang stabilisés (CD Chex Plus® et CD-Chex Plus® CD4 Low de STRECK). La reproductibilité du dosage sur le Sysmex XF-1600™ a été mesurée sur 4 échantillons de sang stabilisés (CD Chex Plus® et CD-Chex Plus® CD4 Low et IMMUNO-TROL Low Cells et IMMUNO-TROL Cells de Beckman Coulter en plus). Les échantillons ont été mesurés dans les mêmes conditions pendant 15 jours en utilisant 3 lots du dispositif (5 jours chacun). Les coefficients de variation (CV) sont indiqués dans les tableaux ci-dessous (Tableaux 17 à 19).

Tableau 17 Reproductibilité du dispositif sur le FACSCanto™ II de BD

| Sous-ensemble de lymphocytes | Matériel | Unité | Moyenne | ÉT | % CV |
|------------------------------|--------------------------|-------------|---------|------|------|
| CD3+ | CD-Chex Plus® | % | 82.07 | 0.40 | 0.49 |
| | | cellules/μl | 1659 | 8.1 | 0.49 |
| | CD-Chex Plus® CD4 Low | % | 67.87 | 0.60 | 0.89 |
| | | cellules/μl | 917 | 8.1 | 0.89 |
| CD3+CD8+ | CD-Chex Plus® | % | 25.67 | 0.43 | 1.66 |
| | | cellules/μl | 519 | 8.6 | 1.66 |
| | CD-Chex Plus® CD4 Low | % | 47.23 | 0.80 | 1.69 |
| | | cellules/μl | 638 | 10.8 | 1.69 |
| CD3+CD4+ | CD-Chex Plus® | % | 47.20 | 0.51 | 1.08 |
| | | cellules/μl | 954 | 10.3 | 1.08 |
| | CD-Chex Plus® CD4 Low | % | 9.56 | 0.18 | 1.85 |
| | | cellules/μl | 129 | 2.4 | 1.85 |
| CD3-CD16+CD56+ | CD-Chex Plus® | % | 9.51 | 0.27 | 2.87 |
| | | cellules/μl | 192 | 5.5 | 2.87 |
| | CD-Chex Plus® CD4 Low | % | 17.00 | 0.49 | 2.89 |
| | | cellules/μl | 230 | 6.6 | 2.89 |
| CD3-CD19+ | CD-Chex Plus® | % | 7.89 | 0.17 | 2.18 |
| | | cellules/μl | 158 | 3.4 | 2.18 |
| | CD-Chex Plus® CD4 Low | % | 14.10 | 0.18 | 1.29 |
| | | cellules/μl | 190 | 2.5 | 1.29 |

Tableau 18 Reproductibilité du dispositif sur le DxFLEX de Beckman Coulter

| Sous-ensemble de lymphocytes | Matériel | Unité | Moyenne | ÉT | % CV |
|------------------------------|--------------------------|-------------------|---------|------|------|
| CD3+ | CD-Chex Plus® | % | 81.58 | 0.35 | 0.43 |
| | | cellules/ μ l | 1649 | 7.2 | 0.43 |
| | CD-Chex Plus® CD4 Low | % | 67.57 | 0.32 | 0.48 |
| | | cellules/ μ l | 913 | 4.3 | 0.48 |
| CD3+CD8+ | CD-Chex Plus® | % | 26.57 | 0.31 | 1.17 |
| | | cellules/ μ l | 537 | 6.3 | 1.17 |
| | CD-Chex Plus® CD4 Low | % | 48.73 | 0.41 | 0.85 |
| | | cellules/ μ l | 658 | 5.6 | 0.85 |
| CD3+CD4+ | CD-Chex Plus® | % | 45.43 | 0.53 | 1.17 |
| | | cellules/ μ l | 918 | 10.8 | 1.17 |
| | CD-Chex Plus® CD4 Low | % | 9.17 | 0.25 | 2.73 |
| | | cellules/ μ l | 124 | 3.4 | 2.73 |
| CD3-CD16+ CD56+ | CD-Chex Plus® | % | 9.77 | 0.15 | 1.56 |
| | | cellules/ μ l | 197 | 3.1 | 1.56 |
| | CD-Chex Plus® CD4 Low | % | 17.21 | 0.23 | 1.35 |
| | | cellules/ μ l | 232 | 3.1 | 1.35 |
| CD3-CD19+ | CD-Chex Plus® | % | 7.99 | 0.33 | 4.10 |
| | | cellules/ μ l | 161 | 6.6 | 4.10 |
| | CD-Chex Plus® CD4 Low | % | 14.18 | 0.23 | 1.63 |
| | | cellules/ μ l | 192 | 3.1 | 1.63 |

Tableau 19 Reproductibilité du dispositif sur le XF-1600™ de Sysmex

| Sous-ensemble de lymphocytes | Matériel | Unité | Moyenne | ÉT | % CV |
|------------------------------|--------------------------|-------------|---------|------|------|
| CD3+ | CD-Chex Plus® | % | 80.58 | 0.41 | 0.51 |
| | | cellules/μl | 1689 | 8.5 | |
| | CD-Chex Plus® CD4 Low | % | 64.19 | 0.71 | 1.10 |
| | | cellules/μl | 866 | 9.6 | |
| | IMMUNO-TROL Cells | % | 73.47 | 0.39 | 0.53 |
| | | cellules/μl | 930 | 4.9 | |
| IMMUNO-TROL Low Cells | % | 56.03 | 0.71 | 1.26 | |
| | cellules/μl | 431 | 5.4 | | |
| CD3+CD8+ | CD-Chex Plus® | % | 23.43 | 0.60 | 2.54 |
| | | cellules/μl | 490 | 12.5 | |
| | CD-Chex Plus® CD4 Low | % | 43.78 | 0.99 | 2.26 |
| | | cellules/μl | 591 | 13.3 | |
| | IMMUNO-TROL Cells | % | 24.11 | 0.26 | 1.08 |
| | | cellules/μl | 305 | 3.3 | |
| IMMUNO-TROL Low Cells | % | 34.74 | 1.00 | 2.87 | |
| | cellules/μl | 267 | 7.7 | | |
| CD3+CD4+ | CD-Chex Plus® | % | 51.31 | 0.74 | 1.45 |
| | | cellules/μl | 1073 | 15.6 | |
| | CD-Chex Plus® CD4 Low | % | 12.14 | 0.84 | 6.92 |
| | | cellules/μl | 164 | 11.3 | |
| | IMMUNO-TROL Cells | % | 45.17 | 0.51 | 1.14 |
| | | cellules/μl | 572 | 6.5 | |
| IMMUNO-TROL Low Cells | % | 15.83 | 0.36 | 2.28 | |
| | cellules/μl | 122 | 2.8 | | |
| CD3-CD16+ CD56+ | CD-Chex Plus® | % | 8.52 | 0.28 | 3.31 |
| | | cellules/μl | 178 | 5.9 | |
| | CD-Chex Plus® CD4 Low | % | 15.53 | 0.48 | 3.06 |
| | | cellules/μl | 209 | 6.4 | |
| | IMMUNO-TROL Cells | % | 10.03 | 0.28 | 2.80 |
| | | cellules/μl | 127 | 3.6 | |
| IMMUNO-TROL Low Cells | % | 21.59 | 0.59 | 2.74 | |
| | cellules/μl | 166 | 4.6 | | |
| CD3-CD19+ | CD-Chex Plus® | % | 9.93 | 0.25 | 2.48 |
| | | cellules/μl | 208 | 5.1 | |
| | CD-Chex Plus® CD4 Low | % | 18.70 | 0.31 | 1.63 |
| | | cellules/μl | 252 | 4.1 | |
| | IMMUNO-TROL Cells | % | 13.03 | 0.34 | 2.58 |
| | | cellules/μl | 165 | 4.3 | |
| IMMUNO-TROL Low Cells | % | 17.45 | 0.55 | 3.14 | |
| | cellules/μl | 134 | 4.2 | | |

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

| | |
|------------------------|---|
| BD FACSCanto™ II | Logiciel BD FACSDiva – version 8.0.2 |
| Beckman Coulter DxFLEx | CytExpert for DxFLEx – version 2.0.2.18 |
| Sysmex XF-1600™ | Logiciel IPU – 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™ | Logiciel IPU – 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 suspectés de présenter des pathologies du système immunitaire

Les données cliniques ont été recueillies sur un site clinique auprès de 46 patients suspectés d'être atteints de pathologies du système immunitaire. La performance clinique a été déterminée en comparant le dispositif DryFlowEx TBNK 6-color 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 20).

Tableau 20 Performances cliniques du dispositif DryFlowEx TBNK 6-color

| | | Statut immunitaire évalué par une méthode de laboratoire clinique accrédité | |
|---|------------------------------------|---|-------------|
| | | Pathologies du système immunitaire | État normal |
| Statut immunitaire évalué par le dispositif ED7736 DryFlowEx TBNK 6-color | Pathologies du système immunitaire | 9 patients | 0 patient |
| | État normal | 0 patient | 37 patients |

13. Valeurs attendues

Intervalle de référence

Les laboratoires doivent établir leurs propres intervalles de référence normaux pour les sous-ensembles lymphocytaires identifiés à l'aide du DryFlowEx TBNK 6-color à partir de la population locale de donneurs normaux en raison des variations de valeur liées à l'âge, au sexe, aux caractéristiques cliniques et à l'origine ethnique.

14. Limitations

Le dispositif DryFlowEx TBNK 6-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 DryFlowEx TBNK 6-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) Bensussan, A et al. Significant enlargement of a specific subset of CD3+CD8+ peripheral blood leukocytes mediating cytotoxic T-lymphocyte activity during human immunodeficiency virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 15;90(20):9427-30. doi: 10.1073/pnas.90.20.9427.
- 2) Bernard, A et al. *Leucocyte Typing*. Springer, 1984.
- 3) 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.
- 4) de Saint Basile, G et al. Severe combined immunodeficiency caused by deficiency in either the delta or the epsilon subunit of CD3. *J Clin Invest*. 2004 Nov;114(10):1512-7. doi: 10.1172/JCI22588.
- 5) Giorgi, J V. Characterization of T lymphocyte subset alterations by flow cytometry in HIV disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1993 Mar 20;677:417-9. doi: 10.1111/j.1749-6632.1993.tb38803.x.
- 6) Iwatani, Y et al. Decreases in alpha beta T cell receptor negative T cells and CD8 cells, and an increase in CD4+ CD8+ cells in active Hashimoto's disease and subacute thyroiditis. *Clin Exp Immunol*. 1992 Mar;87(3):444-9. doi: 10.1111/j.1365-2249.1992.tb03017.x.
- 7) Kishimoto, T et al. *Leucocyte Typing VI*. Garland Publishing, 1997.
- 8) 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.
- 9) Li, Y et al. AIDS prevention and control in the Yunnan region by T cell subset assessment. *PLoS One*. 2019 Apr 18;14(4):e0214800. doi: 10.1371/journal.pone.0214800.
- 10) Mason, D et al, eds.: *Leucocyte Typing VII: White Cell Differentiation Antigens: Proceedings of the Seventh International Workshop and Conference Held in Harrogate, United Kingdom: Oxford University Press; 2002*.
- 11) McCarty, B et al. Low Peripheral T Follicular Helper Cells in Perinatally HIV-Infected Children Correlate With Advancing HIV Disease. *Front Immunol*. 2018 Aug 24;9:1901. doi: 10.3389/fimmu.2018.01901.
- 12) McMichael AJ, ed. *Leucocyte Typing III: 54 White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1987.
- 13) Monafo, W J et al. A hereditary immunodeficiency characterized by CD8+ T lymphocyte deficiency and impaired lymphocyte activation. *Clin Exp Immunol*. 1992 Dec;90(3):390-3. doi: 10.1111/j.1365-2249.1992.tb05856.x.
- 14) North, M E et al. Primary defect in CD8+ lymphocytes in the antibody

- deficiency disease (common variable immunodeficiency): abnormalities in intracellular production of interferon-gamma (IFN-gamma) in CD28+ ('cytotoxic') and CD28- ('suppressor') CD8+ subsets. *Clin Exp Immunol.* 1998 Jan;111(1):70-5. doi: 10.1046/j.1365-2249.1998.00479.x.
- 15) 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.
 - 16) 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.
 - 17) Picat, M Q et al. T-cell activation discriminates subclasses of symptomatic primary humoral immunodeficiency diseases in adults. *BMC Immunol.* 2014 Mar 12;15:13. doi: 10.1186/1471-2172-15-13.
 - 18) Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, et al, eds.: *Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens.* New York, NY: Oxford University Press; 1995.
 - 19) 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.
 - 20) Tate J, Ward G. Interferences in immunoassay. *Clin Biochem Rev.* 2004 May;25(2):105-20. PMID: 18458713; PMCID: PMC1904417.
 - 21) Selby C. Interference in immunoassay. *Ann Clin Biochem.* 1999 Nov; 36 (Pt 6):704-21. doi: 10.1177/000456329903600603. PMID: 10586307.
 - 22) 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.
 - 23) 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.
 - 24) 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
 - 25) 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.
 - 26) 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.
- 27) 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.
- 28) Hervé Lecoeur, 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).
- 29) 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.
- 30) 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
- 31) 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>
- 32) 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, *Oncolimmunology*, 6:3, DOI: 10.1080/2162402X.2017.1283460
- 33) 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>
- 34) 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

- 35) 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>
- 36) 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.
- 37) 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>

16. Marques commerciales

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, Cy™ est une marque déposée de Cytiva, 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..

17. Historique des révisions

Version 2, ED7736_IFU_v2

- 1) Cytomètres en flux mis à jour sur lesquels l'appareil a été testé.
- 2) Stockage des échantillons mis à jour. Interférence endogène et exogène ajoutée.
- 3) Précision mise à jour (cytomètres en flux BD FACSCanto™ II, Beckman Coulter DxFlex, Sysmex XF-1600™)
- 4) Linéarité mise à jour (cytomètres en flux BD FACSCanto™ II, Beckman Coulter DxFlex, Sysmex XF-1600™)
- 5) Limite de détection/Limite de quantification/Seuil de test mis à jour (cytomètres en flux BD FACSCanto™ II, Beckman Coulter DxFlex, Sysmex XF-1600™)
- 6) Répétabilité et reproductibilité mises à jour (cytomètres en flux BD FACSCanto™ II, Beckman Coulter DxFlex, Sysmex XF-1600™)
- 7) Valeurs attendues supprimées
- 8) Références mises à jour

18. Fabricant

EXBIO Praha, a.s.
Nad Safinou II 341
25250 Vestec
Czech Republic

Coordonnées

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

19. 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.