



Détermination de la valeur absolue sur les systèmes de cytométrie en flux Cytomics FC 500, Navios et Navios EX

Pour diagnostic *in vitro*

Sur ordonnance uniquement, aux États-Unis

UTILISATION PRÉVUE

Les fluorosphères Flow-Count sont un réactif de microsphères fluorescentes utilisé pour la détermination directe de lymphocytes, et la détermination des pourcentages et valeurs absolues de sous-populations de lymphocytes dans des prélèvements biologiques en utilisant les systèmes de cytométrie en flux Cytomics FC 500, Navios et Navios EX, ainsi que pour la détermination des pourcentages et valeurs absolues de la population cellulaire des CD34+ dans les prélèvements biologiques en utilisant les systèmes de cytométrie en flux Cytomics FC 500.

Se reporter aux notices spécifiques contenues dans le coffret du produit pour obtenir des informations complètes sur les réactifs, dont l'utilisation, l'intérêt clinique et les instructions de prélèvement, de marquage et de lysage des échantillons pour l'analyse par cytométrie en flux.

UTILISATEURS PRÉVUS

Ce produit est destiné à un usage en laboratoire professionnel.

SYNTHÈSE ET EXPLICATION

Le total des globules blancs et les valeurs lymphocytaires en pourcentage sont généralement obtenus à partir du nombre de lymphocytes comptés sur un automate d'hématologie multiplié par le pourcentage de cellules marquées positivement obtenu sur un cytomètre en flux. Cette méthode standard (indirecte) est cependant associée à une large variation entre les laboratoires¹⁻⁴. Les fluorosphères Flow-Count sont une alternative efficace à la méthode standard (indirecte) pour les valeurs absolues et fournissent directement cette mesure semi-quantitative grâce à l'unique plateforme d'analyse d'immunophénotypage cytométrique en flux. Lorsque des volumes identiques d'un échantillon biologique et des fluorosphères Flow-Count sont présents, un rapport entre le nombre de cellules dans l'échantillon et le nombre de fluorosphères est établi. Les cellules d'intérêt et les fluorosphères sont ensuite comptées sur les systèmes de cytométrie en flux Cytomics FC 500, Navios ou Navios EX. Puisque la concentration de fluorosphères est connue, la valeur absolue des cellules peut être déterminée grâce à la formule suivante :

Valeur Absolue (Cellules/ μ L) =

$$\frac{\text{Nombre Total De Cellules Comptées}}{\text{Nombre Total De Fluorosphères Comptées}} \times \frac{\text{Fluorosphères Flow-Count Concentration testée}}{\text{Concentration testée}}$$

PRINCIPES DU TEST

La méthode (directe) utilisant le Flow-Count repose sur le mélange d'un volume connu d'un échantillon biologique (100 μ l) avec un volume identique de fluorosphères Flow-Count (100 μ l) dont la concentration est connue. L'échantillon est préparé d'après la notice spécifique du produit contenue dans le coffret. Des fluorosphères Flow-Count sont ensuite ajoutées à l'échantillon préparé. Après analyse sur un cytomètre en flux, la valeur absolue peut être calculée manuellement ou automatiquement par le logiciel de l'instrument grâce à la concentration indiquée.

CONTENU DES RÉACTIFS

Les fluorosphères Flow-Count se composent de fluorosphères en polystyrène de 10 μ m (diamètre nominal) en suspension dans un milieu aqueux contenant un surfactant et du formaldéhyde à 1 %. Chaque fluorosphère contient un marquage présentant une plage d'émission de fluorescence de 525 nm à 700 nm lorsqu'elle est excitée à 488 nm.

TRAÇABILITÉ

1. La concentration testée des fluorosphères Flow-Count est déduite de plusieurs analyses successives sur un analyseur de tailles de particules COULTER et traçable jusqu'aux billes de calibreur CC L10. La traçabilité est basée sur la norme EN ISO 17511.
2. Les valeurs attribuées ont été établies à partir d'échantillons représentatifs de ce lot de fluorosphères Flow-Count et sont spécifiques aux méthodologies de dosage de ce produit. Les valeurs attribuées par d'autres méthodologies peuvent être différentes. De telles différences, si elles sont présentes, peuvent être provoquées par des écarts systématiques inter-méthode.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Aucune préparation n'est nécessaire. Les fluorosphères Flow-Count sont utilisées directement, telles quelles, sans dilution. Tout l'aluminium de l'opercule doit être retiré du haut du flacon. Un mélange adéquat (vortexer 10 à 12 secondes) est nécessaire avant pipetage dans le flacon.

AVERTISSEMENTS

	DANGER
	Formaldéhyde < 3 %
	Provoque une irritation cutanée.
	Peut provoquer une allergie cutanée.
	Provoque une sévère irritation des yeux.
	Susceptible d'induire des anomalies génétiques.
	Peut provoquer le cancer.
	Se procurer les instructions avant utilisation.
	Porter des gants de protection, des vêtements de protection et un équipement de protection des yeux/du visage.
	EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée : consulter un médecin.
Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation.	
La fiche signalétique est disponible sur beckman.com/techdocs .	

1. Ce réactif contient du formaldéhyde à 1 %. Éviter tout contact avec la peau et les yeux. Le formaldéhyde peut en effet causer des dommages irréversibles à ces tissus. Ne pas respirer les émanations. Porter des protections adéquates, telles que des gants et des lunettes de protection.
2. Les fluorosphères Flow-Count sont utilisées directement telles quelles. Ne pas aliquoter ou

congeler les fluorosphères Flow-Count, faute de quoi des résultats erronés peuvent se produire.

3. Tout l'aluminium de l'opercule doit être retiré du haut du flacon. L'aluminium résiduel réagit avec le formaldéhyde et peut modifier l'apparence des fluorosphères Flow-Count.
4. Après ouverture, les fluorosphères Flow-Count doivent être stockées en position verticale pour éviter les risques de fuite.
5. Les prélèvements, les échantillons et tous les objets exposés à ces derniers doivent être traités comme étant potentiellement infectieux et doivent être éliminés en respectant les consignes de sécurité appropriées.
6. Ne jamais pipeter avec la bouche et éviter le contact des prélèvements et des échantillons avec la peau et les muqueuses.
7. Ne pas utiliser les fluorosphères Flow-Count au-delà de la date de péremption figurant sur l'étiquette du flacon.
8. Utiliser une pipette calibrée à déplacement positif ou une pipette à répétition pour distribuer les prélèvements biologiques et les fluorosphères Flow-Count, faute de quoi des résultats erronés peuvent se produire.
9. Utiliser les techniques de pipetage recommandées par le fabricant de pipettes pour garantir l'exactitude et la précision du pipetage du prélèvement et des fluorosphères Flow-Count, faute de quoi des résultats erronés peuvent se produire.
10. Les fluorosphères Flow-Count se déposent suite à des périodes prolongées sans utilisation. Vérifier que les fluorosphères sont complètement remises en suspension avant utilisation. Éviter tout mélange excessif afin de minimiser la formation de bulles d'air. Ne pas pipeter de bulles d'air, faute de quoi des résultats erronés peuvent se produire.
11. Des durées ou des températures d'incubation ou de mélange autres que celles précisées peuvent produire des résultats erronés.
12. Les échantillons préparés doivent être analysés sur le cytomètre en flux dans un délai de 2 heures maximum (voir les notices adéquates contenues dans le coffret du produit) après l'ajout des fluorosphères Flow-Count.
13. Chaque lot de fluorosphères Flow-Count présente une concentration de fluorosphères spécifique. Vérifier que la concentration testée est utilisée lors de la détermination de la valeur absolue.
14. Vérifier qu'au moins 1 000 fluorosphères Flow-Count sont comptées, faute de quoi des résultats erronés peuvent se produire.
15. Ne pas exposer les fluorosphères Flow-Count à une forte lumière pendant le stockage ou l'utilisation.
16. Éviter la contamination microbienne des fluorosphères Flow-Count, susceptible de produire des résultats erronés.
17. Éviter toute évaporation ou fuite des fluorosphères Flow-Count et des échantillons, susceptible de produire des résultats erronés.
18. Les méthodes de préparation nécessitant une étape de lavage ne doivent pas être utilisées en raison d'une perte de cellules inconnue.

CONDITIONS DE CONSERVATION ET STABILITÉ

IMPORTANT : après ouverture, les fluorosphères Flow-Count doivent être stockées en position verticale pour éviter les risques de fuite.

Si elles sont conservées entre 2 et 8 °C, les fluorosphères Flow-Count sont stables jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette du flacon. Les flacons ouverts de fluorosphères Flow-Count sont stables pendant 30 jours lorsqu'ils sont conservés entre 2 et 8 °C en l'absence de lumière. Éviter la congélation et l'exposition à la lumière. Amener les Fluorosphères Flow-Count à 20–25 °C avant utilisation.

Les échantillons préparés avec ajout de fluorosphères Flow-Count sont stables pendant 2 heures ou moins, comme indiqué dans la notice contenue dans le coffret du produit pour l'application choisie.

SIGNES DE DÉTÉRIORATION

Tout changement dans l'aspect des fluorosphères Flow-Count, lorsque les fluorosphères sont en suspension (l'aspect normal est un liquide trouble et incolore), ou l'apparition d'une population secondaire fluorescente contenant plus de 20 % de la population totale peut être le signe d'une détérioration et le réactif ne doit pas être utilisé.

PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Se reporter aux notices des réactifs spécifiques pour obtenir des instructions d'utilisation sur chaque application à tester.

PROCÉDURE DE DÉTERMINATION DE LA VALEUR ABSOLUE

MATÉRIEL FOURNI

Fluorosphères Flow-Count
REF 7547053 - 200 tests (1 x 20 ml)

MATÉRIEL NÉCESSAIRE, MAIS NON FOURNI

Échantillon biologique marqué avec l'anticorps monoclonal désiré et lysé avec le système de réactif COULTER IMMUNOPREP, ou

Échantillon biologique marqué avec les réactifs du Stem-Kit et lysé avec Lysing Solution (solution de lyse) 10X NH₄Cl préparée

Pipette à répétition (100 µl) et embouts, ou

Pipette à déplacement (100 µl) et embouts

Minuteur

Agitateur à vortex

Systèmes de cytométrie en flux Cytomics FC 500, Navios et Navios EX

Fluorosphères Flow-Count PROCÉDURE

1. Se munir du tube contenant l'échantillon préparé.

IMPORTANT : pour des résultats optimaux, il est nécessaire de faire preuve d'exactitude et de précision lors de l'ajout de 100 µl d'un échantillon biologique ou de 100 µl de fluorosphères Flow-Count dans le tube échantillon. Se reporter aux instructions de pipetage du fabricant et à la PROCÉDURE DE VÉRIFICATION DE LA TECHNIQUE DE PIPETAGE ci-dessous.

2. Vortexer les fluorosphères Flow-Count pendant 10 à 12 secondes. Éviter tout mélange excessif pour minimiser la formation de bulles d'air.
3. Ajouter 100 µl de fluorosphères Flow-Count dans le tube à essais. Ne pas pipeter de bulles d'air.
4. Vortexer le tube à 50 % de sa hauteur pendant 5 secondes. Vortexer de nouveau immédiatement avant l'analyse par cytométrie en flux.
5. Répéter les étapes 1 à 4 pour chaque échantillon nécessitant une détermination de la valeur absolue.

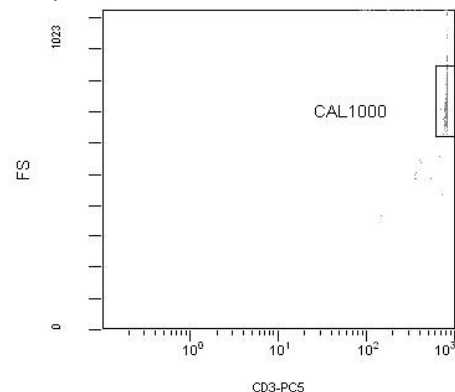
IMPORTANT : les échantillons préparés doivent être analysés sur le cytomètre en flux dans un délai de 2 heures après l'ajout des fluorosphères Flow-Count. Le délai maximum avant analyse après l'ajout des fluorosphères Flow-Count peut être inférieur pour certaines applications. Se reporter à la notice contenue dans le coffret du produit spécifique pour obtenir ces informations.

ANALYSE CYTOMÉTRIQUE EN FLUX POUR ÉCHANTILLONS

Consulter les notices des réactifs spécifiques pour obtenir les instructions d'utilisation adéquates concernant l'analyse de l'échantillon.

1. Vérifier que le cytomètre en flux est correctement aligné et standardisé pour la diffraction laser et l'intensité de fluorescence, et que la compensation de couleur est ajustée. Se reporter aux manuels respectifs de l'instrument pour obtenir des instructions.
2. Créer des histogrammes comme indiqué dans la notice du produit spécifique.
3. Créer un histogramme supplémentaire à deux paramètres de FL4 LOG (ou FL3 LOG, FL2 LOG ou FL1 LOG) vs FS ou TIME (voir la figure 1). Tracer un contour d'intérêt rectiligne (ou équivalent) autour des fluorosphères Flow-Count (coin supérieur droit) et le nommer sous l'appellation CAL.
4. Entrer la concentration testée des fluorosphères Flow-Count indiquée sur la feuille de valeur cible jointe à cette notice contenue dans le coffret. Se reporter aux manuels de l'instrument concernant la saisie de la concentration ou du facteur CAL.

Figure 1 : ce qui suit est un histogramme représentatif de fluorosphères Flow-Count analysées sur un cytomètre en flux Cytomics FC 500.



IMPORTANT : vérifier que la région CAL englobe complètement la population principale des fluorosphères Flow-Count (singulets) tout en excluant les doublons (événements présentant une diffusion axiale très élevée) et que la concentration testée est utilisée.

5. Vortexer les tubes à 50 % de leur hauteur pendant 5 secondes.
6. Analyser les échantillons sur le cytomètre en flux.

IMPORTANT : vérifier qu'au moins 1 000 fluorosphères Flow-Count sont comptées.

PROCÉDURE DE VÉRIFICATION DE LA TECHNIQUE DE PIPETAGE

L'exactitude et la précision du pipetage à la fois du prélèvement et des fluorosphères Flow-Count garantissent l'obtention de résultats optimaux. Suivre la procédure de vérification ci-dessous pour vérifier la précision de la technique de pipetage utilisée pour distribuer le prélèvement et les fluorosphères Flow-Count.

1. Placer un tube et une cuve de pesage sur une balance analytique.
2. Tarer la balance jusqu'à ce qu'elle indique zéro.
3. Suivre les instructions de pipetage du fabricant pour pipeter 100 µl de prélèvement ou de fluorosphères Flow-Count dans le tube à essais.
4. Noter le poids du tube à essais, de la cuve de pesage et du prélèvement distribué ou de l'échantillon de fluorosphères Flow-Count.
5. Tarer la balance jusqu'à ce qu'elle indique zéro.

6. Répéter les étapes 3 à 5 jusqu'à ce qu'au moins 10 prélèvements ou échantillons de fluorosphères Flow-Count aient été pesés.
7. Calculer la moyenne, l'écart-type (± 1 ET) et le coefficient de variation en pourcentage (% CV) des pesages.
8. Le % CV doit être $\leq 2,0$ %.

DÉTERMINATION DES VALEURS ABSOLUES

Pour déterminer la valeur absolue sur les cytomètres en flux Beckman Coulter, entrer la concentration testée de fluorosphères Flow-Count lors du nommage de la région CAL comme indiqué à l'étape 3 sous l'en-tête **ANALYSE CYTOMÉTRIQUE EN FLUX POUR ÉCHANTILLONS**. Lorsqu'au moins 1 000 fluorosphères sont comptées, la valeur absolue de l'échantillon est calculée automatiquement grâce à la formule suivante :

$$\text{Valeur Absolue (Cellules/}\mu\text{L)} = \frac{\text{Nombre Total De Cellules Comptées}}{\text{Nombre Total De Fluorosphères Comptées}} \times \text{Fluorosphères Flow-Count Concentration testée}$$

Si le prélèvement est dilué, le résultat de l'équation ci-dessus doit être corrigé par le facteur de dilution adéquat.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Pour obtenir des résultats optimaux, vérifier que les pipettes sont calibrées à la fréquence recommandée par le fabricant. Pour obtenir des résultats optimaux, vérifier que le cytomètre en flux est correctement aligné et standardisé pour la diffraction laser et l'intensité de fluorescence, et que la compensation de couleur soit ajustée.

Se reporter aux manuels respectifs de l'instrument pour obtenir des instructions.

Se reporter aux notices des produits spécifiques pour connaître les procédures de contrôle de qualité des réactifs.

LIMITATIONS

1. Le système de lyse est limité soit au système de réactif IMMUNOPREP ou à la Lysing Solution (solution de lyse) 10X NH₄Cl (uniquement avec réactifs Stem-Kit) lors de l'utilisation des fluorosphères Flow-Count. Ne pas utiliser les fluorosphères Flow-Count avec d'autres méthodes de lyse.
2. L'ajout de solvants organiques ou de solutions ioniques fortes peut faire gonfler ou agréger de manière irréversible des fluorosphères Flow-Count.
3. Les échantillons préparés doivent être analysés sur le cytomètre en flux dans un délai de 2 heures maximum après l'ajout des fluorosphères Flow-Count.
4. Pour connaître les autres limites de l'instrument, se reporter aux manuels du cytomètre en flux.
5. Pour connaître les autres limites du réactif, se reporter à la notice du produit spécifique.

CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES

ÉTUDE D'EXACTITUDE

Se reporter à la notice du produit spécifique pour connaître l'exactitude de la méthode.

LINÉARITÉ

Se reporter à la notice du produit spécifique pour connaître la linéarité de la méthode.

PRÉCISION

Se reporter à la notice de produit spécifique pour connaître la précision de la méthode.



RÉFÉRENCES SÉLECTIONNÉES

1. Rumke CL. 1995. The imprecision of the ratio of two percentages observed in differential white blood cell counts: A warning. Blood Cells 11:137-140.
2. Rumke CL. 1995. Imprecision of the ratio-derived differential leukocyte counts. Blood Cells 11:311-314.
3. Koepke JA and Landay AL. 1989. Precision and accuracy of absolute lymphocyte counts. Clin Immunol Immunopathol 52:19-27.
4. Malone JL, Simms TE, Gray GC, Wagner KF, Burge JR and Burke DS. 1990. Sources of variability in repeated T-helper lymphocyte counts from human immunodeficiency virus Type 1-infected patients: Total lymphocyte count fluctuations and diurnal cycle are important. J AIDS 3:144-151.

DISPONIBILITÉ DES PRODUITS

Fluorosphères Flow-Count

REF 7547053 - 200 tests (1 x 20 ml)

Pour des informations complémentaires, ou en cas de réception d'un produit endommagé, contacter le Service clientèle Beckman Coulter au 800-742-2345 à partir des États-Unis et du Canada, ou contacter le représentant Beckman Coulter local.

Pour les patients/utilisateurs/tiers dans l'Union européenne ou dans des pays soumis à une réglementation identique (Règlement 2017/746/UE sur les dispositifs médicaux de diagnostic in vitro) : si, au cours de l'utilisation de ce dispositif ou suite à cette utilisation, un incident grave se produisait, veuillez le signaler au fabricant et/ou à son représentant agréé, ainsi qu'à l'autorité nationale dont vous relevez.

Le résumé de la sécurité et des performances est disponible dans la base de données EUDAMED : ec.europa.eu/tools/eudamed

Un Glossary of Symbols (Glossaire des symboles) est disponible sur beckman.com/techdocs (Réf. C05838).



Beckman Coulter, Inc.
250 S. Kraemer Blvd.
Brea, CA 92821 U.S.A.
www.beckman.com



Beckman Coulter Ireland Inc.
Lismeehan
O'Callaghan's Mills
Co. Clare, Ireland 353 (0)65 683 1100

© 2021 Beckman Coulter, Inc.
Tous droits réservés.

Historique des révisions

Révision AA, 08/2021

Des modifications ont été apportées pour :

- UTILISATEURS PRÉVUS
- TRAÇABILITÉ
- SYNTHÈSE ET EXPLICATION
- CONTENU DES RÉACTIFS
- MATÉRIEL FOURNI
- DISPONIBILITÉ DES PRODUITS
- Déclaration d'avis à l'utilisateur

