



BD Trucount™ Tubes

Détermination des numérations absolues de leucocytes dans le sang

N° de référence 663028

11/2020

23-3674-11

IVD



BD, le logo BD, CellQuest, FACS, FACSCalibur, FACSCComp, FACSCount, FACSFlow, Multiset, Tritest, Trucount et Vacutainer sont des marques commerciales de Becton, Dickinson and Company ou de ses filiales.
© 2020 BD. Tous droits réservés.



Becton, Dickinson and Company BD Biosciences

2350 Qume Drive
San Jose, CA 95131 USA

Benex Limited
Pottery Road, Dun Laoghaire
Co. Dublin, Ireland
Tel +353.1.202.5222
Fax +353.1.202.5388

BD Biosciences
European Customer Support
Tel +32.53.720.600
help.biosciences@bd.com

Australian and New Zealand Distributors:

Becton Dickinson Pty Ltd.
66 Waterloo Rd
Macquarie Park NSW 2113
Australia

Becton Dickinson Limited
14B George Bourke Drive
Mt Wellington, Auckland 1060
New Zealand

1. UTILISATION

Les BD Trucount™ Tubes sont utilisés pour déterminer les numérations absolues de leucocytes dans le sang.

Les BD Trucount™ Tubes sont conçus pour être utilisés avec des produits de diagnostic in vitro, tels que les réactifs BD Tritest™, et un cytomètre en flux convenablement équipé. Les BD Trucount™ Tubes peuvent être utilisés avec le BD FACSTM Loader.

2. PRINCIPES DE LA MÉTHODE

Les procédures décrites dans ce mode d'emploi s'appliquent aux applications d'immunophénotypage. Pour d'autres applications, consulter le mode d'emploi du produit correspondant.

Ajouter le réactif anticorps monoclonal adéquat et le sang total directement dans le BD Trucount™ Tube. Le culot lyophilisé dans le tube se dissout, libérant ainsi un nombre connu de billes fluorescentes. Lors de l'analyse, il est possible de déterminer le nombre absolu de cellules positives contenues dans l'échantillon (cellules/ μ l) par comparaison des événements cellulaires et des événements de billes. Si le logiciel approprié, tel que BD Multiset™, est utilisé, c'est lui qui déterminera les numérations absolues. En cas d'analyse manuelle des données à l'aide d'un logiciel tel que BD CellQuest™ Pro, diviser le nombre d'événements cellulaires positifs par le nombre d'événements de billes, puis le multiplier par la concentration de billes BD Trucount™.

3. RÉACTIF

Chaque boîte contient deux sachets. Chaque sachet contient 25 BD Trucount™ Tubes, permettant d'effectuer 25 tests.

Précautions

- Réservé au diagnostic in vitro.
- Les BD Trucount™ Tubes sont conçus pour être utilisés avec une procédure spécifique de lyse sans lavage. Pour la numération absolue, préparer et analyser les échantillons dans les BD Trucount™ Tubes. Ne pas transférer les billes dans un autre tube. La présence de protéines, comme les protéines sériques contenues dans le sang total, est nécessaire au bon fonctionnement des billes BD Trucount™ pour la numération absolue.¹ Suivre le mode d'emploi du test lors de la dilution des échantillons. **Ne pas tenter de fixer le seuil sur la lumière diffractée aux petits angles (FSC) pour la collecte des données.** Ne pas retirer la pièce de retenue métallique du BD Trucount™ Tube.
- Il incombe à l'utilisateur de valider toute autre méthode ou utilisation.
- L'ajout d'un volume précis de sang est essentiel pour parvenir au résultat souhaité. Les pipettes doivent être étalonées de manière à distribuer exactement 50 µl d'échantillon. Si cette pipette ou une pipette de type similaire n'est pas utilisée, employer la technique de pipetage inverse (voir Pipetage inverse à la section 6 pour une brève description). Pour plus d'informations, consulter les instructions du fabricant de la pipette.
- S'assurer toujours d'utiliser le nombre de billes provenant du lot de BD Trucount™ Tubes employé lors de la saisie de cette valeur dans le logiciel

ou du calcul manuel d'une numération absolue. Il est essentiel d'utiliser le nombre correct de billes pour déterminer un nombre de cellules. Ne pas mélanger différents lots de tubes pour le même test.

- Stocker les BD Trucount™ Tubes dans leur sachet d'origine, à une température comprise entre 2 °C et 25 °C. Pour éviter la formation de condensation, ouvrir le sachet uniquement après l'avoir porté à température ambiante et le refermer immédiatement après le retrait d'un tube. Un sachet non ouvert reste stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage. Ne pas ouvrir le sachet et utiliser les tubes au-delà de cette date de péremption. Utiliser les tubes dans l'heure qui suit leur retrait du sachet. Utiliser les tubes restants dans le mois suivant l'ouverture du sachet.

AVERTISSEMENT Tous les échantillons biologiques et les matières avec lesquelles ils sont entrés en contact sont susceptibles de constituer un danger biologique. Ils doivent être manipulés comme des matières pouvant transmettre une infection^{2,3} et leur mise au rebut doit être effectuée en prenant les précautions conformes aux réglementations applicables. Ne jamais pipeter à la bouche. Porter des lunettes, des gants et des vêtements de protection appropriés.

La solution BD FACSTM Lysing Solution est obligatoire et contient du diéthylène-glycol et du formaldéhyde. Pour obtenir des mises en garde, consulter le mode d'emploi de *BD FACSTM Lysing Solution*.

4. APPAREILS

Les applications BD Trucount™ sont conçues pour les cytomètres en flux équipés du matériel et des logiciels informatiques appropriés. Le cytomètre en flux doit être capable de détecter la fluorescence tricolore, la lumière diffractée aux petits angles (FSC) et la lumière diffractée aux grands angles (SSC). Nous recommandons le cytomètre en flux

BD FACSCalibur™; il est toutefois également possible d'obtenir des résultats sur d'autres plateformes. Pour obtenir des informations relatives aux limitations spécifiques à un appareil, consulter le mode d'emploi du réactif correspondant. Le BD FACSTM Loader peut également être utilisé avec ce produit. BD a développé le logiciel BD Multiset™, à utiliser avec des réactifs spécifiques et des BD Trucount™ Tubes, qui calcule automatiquement les numérations absolues. Cependant, il est également possible d'utiliser un logiciel, tel que BD CellQuest™ Pro pour l'acquisition et l'analyse des données, et de calculer manuellement les numérations absolues.

5. PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Prélever du sang de manière aseptique par ponction veineuse^{4,5} dans un BD Vacutainer® EDTA Blood Collection Tube (tube de prélèvement sanguin) stérile (capuchon lavande). Respecter les instructions du fabricant du tube de prélèvement pour connaître le volume minimum de sang à prélever. Conserver le sang anticoagulé à température ambiante (entre 20 °C et 25 °C) jusqu'à ce qu'il soit prêt pour le marquage.

6. PROCÉDURE

Réactif fourni

Les BD Trucount™ Tubes (n° de référence 663028), à usage unique, contiennent un culot lyophilisé de billes fluorescentes.

Réactifs et matériel requis mais non fournis

- BD FACSComp™ Beads

Pour plus d'informations sur le produit BD FACSComp™ spécifique à votre application, se reporter au catalogue des produits.

- BD FACSTM Lysing Solution (10X), 100 ml (n° de référence 349202)

Pour obtenir des instructions et des mises en garde relatives à la dilution, consulter le mode d'emploi de *BD FACSTM Lysing Solution*.

- Eau (distillée ou désionisée) de qualité réactif
- BD Vacutainer® EDTA Blood Collection Tubes (tubes de prélèvement sanguin) ou équivalents
- Agitateur vortex
- Micropipette avec embouts
- Distributeur en vrac ou multipipette (450 µl) pour distribuer la BD FACSTM Lysing Solution
- Liquide de gaine BD FACSFlow™ Sheath Fluid (n° de référence 342003) ou équivalent
- Contrôles BD Trucount™ (n° de référence 664343)

Marquage des cellules

Marquer des échantillons de sang total conformément aux instructions figurant dans le mode d'emploi du réactif employé. Lyser les globules rouges après les avoir marqués à l'aide de (1X) BD FACSTM

Lysing Solution diluée. Veiller à protéger les tubes contre la lumière directe. Effectuer le marquage à température ambiante (entre 20 et 25 °C).

Pipetage inverse

La précision du volume de sang total est essentielle. Si une pipette qui distribue un volume précis de sang n'est pas utilisée, employer la technique de pipetage inverse. Cette technique met à profit deux butées dans une pipette.

- Pour le pipetage normal, appuyer sur le piston de la pipette jusqu'à la première butée, le relâcher pour aspirer l'échantillon, puis l'enfoncer à nouveau jusqu'à la première butée pour expulser l'échantillon.
- Pour le pipetage inverse, appuyer sur le piston de la pipette jusqu'à la deuxième butée, le relâcher pour aspirer l'échantillon dans l'embout, puis l'enfoncer jusqu'à la première butée pour expulser un volume précis d'échantillon en laissant un excédent d'échantillon dans l'embout.

Marquage

Pour obtenir des instructions détaillées sur la préparation de l'échantillon, consulter le mode d'emploi du réactif employé.

1. Pour chaque échantillon clinique, étiqueter un BD Trucount™ Tube avec le réactif et le numéro d'identification de l'échantillon.

REMARQUE Avant l'utilisation, vérifier que le culot de billes BD Trucount™ est intact et se trouve en dessous de la pièce de retenue métallique, au fond du tube. Si ce n'est pas le cas, jeter le BD Trucount™ Tube et le remplacer par un autre.

2. Pipeter 20 µl du réactif correspondant jusqu'au niveau juste au-dessus de la pièce de retenue en acier inoxydable. Ne pas toucher le culot.

3. Pipeter 50 µl de sang total anticoagulé bien homogénéisé sur la paroi du tube, juste au-dessus de la pièce de retenue.

REMARQUE Éviter d'étaler le sang vers le bas sur la paroi du tube. Le sang total qui reste sur les parois du tube ne sera pas marqué par le réactif.

L'exactitude est essentielle. Utiliser une pipette électronique BD ou employer la technique de pipetage inverse pour pipeter l'échantillon sur la paroi du tube, juste au-dessus de la pièce de retenue.

4. Reboucher le tube et le vortexer doucement pour mélanger. Laisser incuber pendant 15 minutes dans l'obscurité, à température ambiante (entre 20 et 25 °C).

5. Ajouter 450 µl de BD FACS™ Lysing Solution 1X dans le tube.

6. Reboucher le tube et le vortexer doucement pour mélanger. Laisser incuber pendant 15 minutes dans l'obscurité, à température ambiante. L'échantillon est maintenant prêt à être analysé sur le cytomètre en flux.

Cytométrie en flux

Pour obtenir des instructions spécifiques, consulter le mode d'emploi du réactif employé. Vortexer soigneusement les échantillons, à faible vitesse, afin de suspendre à nouveau les billes et de diminuer les agrégats de cellules avant de les analyser sur le cytomètre en flux.⁶ En cas d'utilisation du BD FACS™ Loader pour l'acquisition, vortexer immédiatement les

tubes avant de les placer dans le carrousel du Loader. Effectuer l'acquisition et l'analyse en mode liste à l'aide du logiciel approprié.

Nous recommandons d'utiliser des Calibrite beads et un logiciel approprié, tel que BD FACSComp™, version 2.0 ou ultérieure, pour régler les tensions du tube photomultiplicateur (PMT), régler la compensation de fluorescence et vérifier la sensibilité de l'appareil avant l'utilisation.

Avant d'acquérir les échantillons, ajuster le seuil afin de limiter les débris et s'assurer que les populations d'intérêt sont incluses. Les figures 1, 2 et 3 présentent un exemple d'utilisation de BD Trucount™ Tubes avec le réactif BD Tritest™ CD3/CD4/CD45.

Si un logiciel BD calculant automatiquement les numérations absolues de cellules n'est pas utilisé, il est possible d'obtenir la numération absolue de la population cellulaire (A) en divisant le nombre d'événements cellulaires positifs (X) par le nombre d'événements de billes (Y), puis en multipliant par la concentration de billes BD Trucount™ (N/V, où N = nombre de billes par test* et V = volume du test). A = X/Y × N/V

Fenêtrer la population de lymphocytes (2) sur un dot-plot FL3 vs SSC. Obtenir ensuite le nombre d'événements dans le quadrant ou la région contenant la population de cellules sur un dot-plot FL1 vs FL2 fenêtré (voir figure 2). Obtenir le nombre d'événements dans la région des billes de numération absolue (1) sur un dot-plot FL1 vs FL2 non fenêtré (voir figure 3).

Figure 1 Dot-plot FL3 (CD45) vs SSC

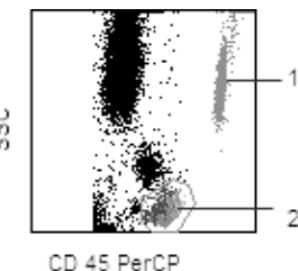


Figure 2 Dot-plot FL1 vs FL2 fenêtré

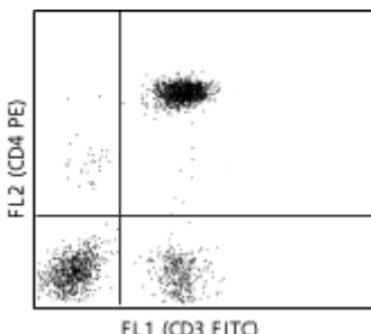
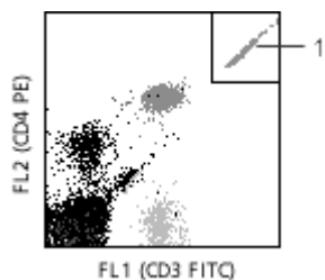


Figure 3 Dot-plot FL1 vs FL2 non fenêtré



* Cette valeur est indiquée sur l'étiquette du sachet de BD Trucount™ Tubes et peut varier d'un lot à un autre.

Contrôle qualité

Analyser chaque jour un échantillon contrôle prélevé sur un sujet adulte sain afin d'optimiser les réglages de l'appareil et d'effectuer un contrôle de qualité du système.⁵

Inspecter visuellement le dot-plot CD45 vs SSC. La population lymphocytaire doit apparaître sous la forme d'un cluster compact et brillant avec un faible SSC. Les monocytes et granulocytes doivent également apparaître sous forme de clusters distincts. Ne pas continuer l'analyse si les populations sont diffuses et que les clusters ne sont que peu ou pas séparés.

7. CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES

Les performances ont été déterminées par comparaison avec le système BD FACSCount™. Ces résultats obtenus avec BD Tritest™ CD3/CD4/CD45 sont représentatifs de ceux obtenus avec d'autres réactifs de phénotypage pour diagnostic in vitro. Se reporter au mode d'emploi des réactifs employés pour plus de détails.

Exactitude

Du sang total a été marqué à l'aide du réactif BD Tritest™ CD3/CD4/CD45 dans des BD Trucount™ Tubes, puis a été acquis et analysé avec le logiciel BD CellQuest™ Pro. Deux échantillons de chaque prélèvement ont été marqués et analysés en parallèle à l'aide du système BD FACSCount™. Les données ont été analysées pour déterminer les différences moyennes entre les résultats obtenus avec BD Tritest™/BD Trucount™ et ceux obtenus avec BD FACSCount™. Les résultats sont présentés sur les figures 4 et 5, et dans les tableaux 1 et 2.

Figure 4 Résultats de BD FACSCount™ vs résultats de BD Tritest™/BD Trucount™

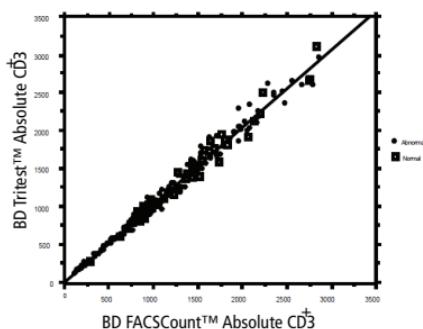


Figure 5 Résultats de BD FACSCount™ vs résultats de BD Tritest™/BD Trucount™

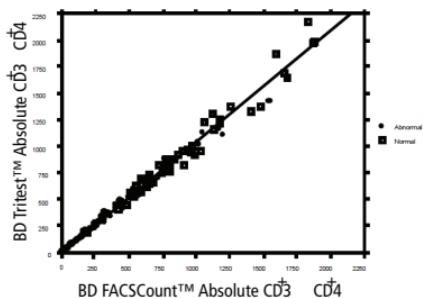


Tableau 1 Analyse de régression : BD Tritest™ CD3+ (cellules/ μ l) vs BD FACSCount™ CD3+

Paramètre	Estimation du paramètre	Limite inférieure de l'intervalle de confiance de 90 %	Limite supérieure de l'intervalle de confiance de 90 %
Y-intercept	-7,0	-28	14
Pente	1,03	1,01	1,04

r = 0,99 ; n = 197

Tableau 2 Analyse de régression : BD Tritest™ CD3+CD4+ (cellules/ μ l) vs BD FACSCount™ CD3+CD4+

Paramètre	Estimation du paramètre	Limite inférieure de l'intervalle de confiance de 90 %	Limite supérieure de l'intervalle de confiance de 90 %
Y-intercept	1,2	-6,7	9,1
Pente	1,04	1,03	1,06
$r = 0,99$; $n = 199$			

Précision

Une étude portant sur dix réplications de trois échantillons (bas, moyen et haut) a été menée pour évaluer la reproductibilité. Les résultats sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 3 Reproductibilité : BD Trucount™ avec BD Tritest™ CD3/CD4/CD45

Échantillon	n	Sous-ensemble	Moyenne	%CV ^a
Bas	10	CD3+	704	7,0
		CD3+CD4+	371	7,1
Moyen	10	CD3+	1 897	4,1
		CD3+CD4+	1 352	3,9
Haut	10	CD3+	2 716	4,4
		CD3+CD4+	2 034	4,2

a. CV = coefficient de variation

Des études de précision ont également été menées sur trois sites cliniques externes pour évaluer la reproductibilité intra-échantillon de la numération absolue pour des échantillons normaux et anormaux. Pour chaque échantillon, trois aliquotes de sang total ont été marquées par des réactifs BD Tritest™ dans des

BD Trucount™ Tubes. Des exemples de résultats sélectionnés de manière aléatoire pour des sujets individuels sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4 Exemples représentatifs de CD3/CD4/CD45 avec BD Trucount™ (cellules/ μ l, n = 3)

Tableau 4a : Site 1						
	Moyenne CD4	ET ^a	%CV ^b	Moyenne CD3	ET ^a	%CV ^b
Bas	10,0	3,8	38,4	287	3,9	1,4
	209	11,1	5,3	1 206	21,3	1,8
	427	32,2	7,5	3 051	181,2	5,9
Moyen	502	34,6	6,9	1 784	97,5	5,5
	701	16,6	2,4	926	15,5	1,7
	961	102,1	10,6	3 319	252,9	7,6
Haut	1 129	42,7	3,8	2 184	71,3	3,3
	1 142	45,1	4,0	1 925	80,8	4,2

a. ET = écart type

b. CV = coefficient de variation

Tableau 4b : Site 2

	Moyenne CD4	ET ^a	%CV ^b	Moyenne CD3	ET ^a	%CV ^b
Bas	86	7,6	8,9	768	29,5	3,8
	266	24,6	9,2	1 047	53,5	5,1
	422	23,3	5,5	3 533	247,6	7,0
Moyen	517	12,3	2,4	1 083	7,0	0,6
	689	27,7	4,0	1 623	126,5	7,8
	903	45,4	5,0	1 589	67,6	4,3
Haut	1 197	93,4	7,8	2 254	149,8	6,6
	1 201	37,4	3,1	1 758	40,5	2,3
	1 363	66,7	4,9	2 330	115,5	5,0

a. ET = écart type

b. CV = coefficient de variation

Tableau 4c : Site 3

	Moyenne CD4	ET ^a	%CV ^b	Moyenne CD3	ET ^a	%CV ^b
Bas	10	1,0	10,4	267	10,5	4,0
	49	3,2	6,4	1 385	80,2	5,8
	236	11,7	5,0	1 748	46,6	2,7
Moyen	715	16,8	2,3	2 214	64,2	2,9
	878	40,3	4,6	1 328	49,9	3,8
	947	61,1	6,4	1 590	120,1	7,6
Haut	1 056	43,5	4,1	2 904	164,5	5,7
	1 299	79,0	6,1	1 970	121,8	6,2
	1 502	65,3	4,3	2 303	63,6	2,8

a. ET = écart type

b. CV = coefficient de variation

Sur ces sites cliniques, l'intervalle des CV pour les cellules CD3+ observé pour tous les échantillons a été de < 1 % (numération de 1 083 cellules/ μ l) à 13 % (numération de 187 cellules/ μ l). L'intervalle des CV pour les cellules CD3+CD4+ observé pour tous les échantillons a été de < 1 % (numération de 271 cellules/ μ l) à 80 % (numération de 24 cellules/ μ l).

Se reporter au mode d'emploi du réactif employé pour plus d'informations sur les performances spécifiques du réactif.

GARANTIE

Sauf mention contraire indiquée dans toute condition générale BD de vente aux clients extérieurs au territoire des États-Unis, la garantie suivante s'applique à l'achat de ces produits.

LES PRODUITS VENDUS ICI NE SONT GARANTIS CONFORMES QU'À LA QUANTITÉ ET AU CONTENU INDICUÉ SUR L'ÉTIQUETTE OU SUR L'EMBALLAGE DU PRODUIT AU MOMENT DE LA LIVRAISON AU CLIENT. BD DÉCLINE TOUTE GARANTIE AUTRE, EXPRESSE OU IMPLICITE, Y COMPRIS LES GARANTIES RELATIVES À LA COMMERCIALISATION, À L'ADAPTATION À UN USAGE PARTICULIER ET À LA NON-CONTREFACON. LA RESPONSABILITÉ DE BD SE LIMITÉ AU REMPLACEMENT DES PRODUITS OU AU REMBOURSEMENT DU PRIX D'ACHAT. BD NE SAURA ÊTRE TENU RESPONSABLE DES DOMMAGES DÉCOULANT DE LA DÉTENTION DU PRODUIT OU DE TOUT DOMMAGE ACCIDENTEL OU CONSÉCUTIF, Y COMPRIS LES BLESSURES DES PERSONNES OU LES PERTES ÉCONOMIQUES, PROVOQUÉS PAR LE PRODUIT.

RÉFÉRENCES

- Brando B, Göhde W Jr Scarpati B, D'Avanzo G. The “vanishing counting bead” phenomenon: effect on absolute CD34+ cell counting in phosphate-buffered saline-diluted leukapheresis samples. *Cytometry*. 2001;43:154-160.
- Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline — Fourth Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014. CLSI document M29-A4.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/isolation/index.html>. Accessed March 12, 2019.
- Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture; Approved Standard—Sixth Edition*; Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document GP41-A6.
- Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline—Second Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document H42-A2.
- Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.