

Global Proficiency Testing

Sommaire

1.0	Introduction	1
1.1	Description du test.....	2
2.0	Test 1- Décongélation, numération et mise en culture.....	3
2.1	Matériel	3
2.1.1	Conservation des produits	4
2.2	Méthode	4
2.2.1	Décongélation des cellules.....	4
2.2.2	Numération des cellules	4
2.2.2.1	Comptage automatique	4
2.2.2.2	Comptage manuel des cellules nucléées	5
2.2.2.3	Comptage des cellules viables (bleu trypan ou autres méthodes).....	5
2.2.3	Préparation de la dilution cellulaire pour le test des colonies	6
2.2.4	Mise en culture	6
3.0	Test 2 - Numération des colonies	7
4.0	Test 3 - Identification des colonies.....	8
4.1	Méthode.....	8
5.0	Instructions pour le logiciel.....	8
5.1	Matériel	8
5.2	Instructions	8
6.0	Formulaires	11
	Formulaire A.....	11
	Formulaire B.....	13
	Formulaire C.....	15

For Research Use Only

In North America
Tel: 1.604.877.0713
Fax: 1.604.877.0704
Toll Free Tel: 1.800.667.0322
Toll Free Fax: 1.800.567.2899
e-mail: info@stemcell.com
e-mail: orders@stemcell.com

In the United Kingdom
Tel: +44.(0).20.7537.7565
Fax: +44.(0).20.7515.5408
Toll free within United Kingdom:
Tel: 0800.731.27.14
Fax: 000.731.27.13
e-mail: info@stemcellgb.com

In Europe
Tel: +33.(0).4.76.04.75.30
Fax: +33.(0).4.76.18.99.63
e-mail: info@stemcellfrance.com

StemCell Technologies Inc

Version 1.1.1
April 2006
28452F

For Research Use Only

In North America
Tel: 1.604.877.0713
Fax: 1.604.877.0704
Toll Free Tel: 1.800.667.0322
Toll Free Fax: 1.800.567.2899
e-mail: info@stemcell.com
e-mail: orders@stemcell.com

In the United Kingdom
Tel: +44.(0).20.7537.7565
Fax: +44.(0).20.7515.5408
Toll free within United Kingdom:
Tel: 0800.731.27.14
Fax: 000.731.27.13
e-mail: info@stemcellgb.com

In Europe
Tel: +33.(0).4.76.04.75.30
Fax: +33.(0).4.76.18.99.63
e-mail: info@stemcellfrance.com

StemCell Technologies Inc

Version 1.1.1
April 2006
28452F

1.0 Introduction

La standardisation du test des colonies hématopoïétiques est un des engagements de StemCell Technologies. En dépit de la disponibilité de milieux standardisés, la variabilité significative des résultats obtenus en fonction des personnes réalisant le test rend la comparaison directe des données générées par différents centres encore très difficile. Cette variabilité est associée à la préparation de l'échantillon¹ et à des différences dans l'identification et la numération des colonies.² Pour aborder ce problème, StemCell Technologies a mis au point un test de compétence, le « Proficiency Testing ». Un premier programme de tests a été proposé de 1998 à 2000. Ces tests visaient exclusivement à tester la capacité des participants à identifier et dénombrer les colonies. La réduction de la variabilité due à la numération des colonies a été atteinte : le coefficient de variation observé pendant ce programme³ était significativement inférieur à ceux publiés dans différents rapports.^{2,4}

StemCell Technologies propose maintenant un deuxième programme. Il comprend l'identification et la numération des colonies mais également la préparation de l'échantillon cellulaire pour la culture (décongélation, dilution et mise en culture). Ce test est proposé deux fois par an (printemps, automne) et assure toujours l'anonymat des participants. Contrairement au premier programme, le jour de mise en culture n'est pas fixé et les résultats regroupent les données de tous les participants quelle que soit leur origine géographique. Nous pensons que ce nouveau programme de Proficiency Testing permettra de réduire encore la variabilité du test des colonies et permettra aux participants de mieux identifier leurs besoins en formation continue ou en apprentissage.

Depuis son introduction il y a plus de 30 ans, le test des colonies a été largement utilisé pour la recherche et pour des applications cliniques (identification de facteurs de croissance, aide au diagnostic des syndromes myéloprolifératifs et des leucémies, évaluation du potentiel prolifératif de la moelle, du sang de cordon et du sang périphérique mobilisé qui sont utilisés dans le cadre de transplantation⁵). Certaines études ont trouvé une corrélation entre le nombre de progéniteurs évalué par le test des colonies et la prise de la greffe^{6,7} alors que d'autres études n'ont pu mettre aucune relation en évidence.^{8,9}

L'expression de l'antigène CD34 est souvent utilisée comme un marqueur des cellules souches hématopoïétiques et le nombre de cellules CD34⁺ a été utilisé pour quantifier le contenu en progéniteurs et cellules souches.¹⁰ Toutefois, cette mesure bien qu'informatrice, ne traduit pas la fonctionnalité des sous-populations cellulaires qui assurent l'hématopoïèse chez le transplanté. D'autre part, le test des colonies est le test de référence pour évaluer la capacité des cellules hématopoïétiques d'origines diverses à proliférer et à se différencier, particulièrement après des manipulations *ex-vivo* comme la déplétion des cellules T, l'enrichissement en CD34⁺, les protocoles de thérapie génique et la congélation. Les informations apportées par les tests fonctionnels sont donc importantes et complémentaires à celle données par la numération des cellules CD34⁺.

Références

1. Burger SR, Kadidlo D, McCullough J: Improved progenitor assay standardization using peripheral blood mononuclear cells from a donor treated with granulocyte-colonystimulating factor. *Transfusion* 39: 451, 1999
2. Lumley MA, Burgess R, Billingham LJ, et al: Colony counting is a major source of variation in CFU-GM results between centres. *Br J Haematol* 97: 481, 1997
3. Clarke E, Mantie D, Miller CL et al: Proficiency Testing of Hematopoietic Colony Enumeration. *Blood* 94 (10):140a, 1999 (abstract)
4. Keever-Taylor CA, Collins NH, Carter S, et al: Report on the standardization of clonogenic hematopoietic precursor assays for the unrelated donor bone marrow transplantation trial *Blood* 90 (10): 368a, 1997 (abstract)
5. Gordon MY: Human haemopoietic stem cell assays. *Blood Rev* 7: 190, 1993
6. Bacigalupo A, Piaggio G, Podesta M, et al: Influence of marrow CFU-GM content on engraftment and survival after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 15: 221, 1995
7. Cancelas JA, Querol S, Canals C, et al: Peripheral blood CD34⁺ cell immunomagnetic selection in breast cancer patients: effect on hematopoietic progenitor content and hematologic recovery after high dose chemotherapy and autotransplantation. *Transfusion* 38: 1063, 1998
8. Torres A, Alonso MC, Gomez-Villagran JL, et al: No influence of number of donor CFU-GM on granulocyte recovery in bone marrow transplantation for acute leukemia. *Blut* 50: 89, 1985
9. Masszi T, Gluckman E: Lack of correlation between the number of donor nucleated bone marrow cells or CFU-GM content and the rapidity of engraftment in allogeneic BMT. *Acta Biomed Atenco Parmense* 64: 221, 1993
10. Sutherland R, Stewart AK, Keating A: CD34 Antigen: Molecular features and potential clinical applications. *Stem Cells* 11 (suppl 3):50, 1993

For Research Use Only

In North America
Tel: 1.604.877.0713
Fax: 1.604.877.0704
Toll Free Tel: 1.800.667.0322
Toll Free Fax: 1.800.567.2899
e-mail: info@stemcell.com
e-mail: orders@stemcell.com

In the United Kingdom
Tel: +44.(0).20.7537.7565
Fax: +44.(0).20.7515.5408
Toll free within United Kingdom:
Tel: 0800.731.27.14
Fax: 000.731.27.13
e-mail: info@stemcellgb.com

In Europe
Tel: +33.(0).4.76.04.75.30
Fax: +33.(0).4.76.18.99.63
e-mail: info@stemcellfrance.com

StemCell Technologies Inc

Version 1.1.1
April 2006
28452F

1.1 Description du test

1. Décongélation, numération et mise en culture

Matériels et réactifs fournis : Cellules de Moelle Humaine Normale congelées*, Iscove's MDM contenant 2% de sérum bovin foetal (SBF) pour la numération cellulaire et les dilutions, logiciel pour le calcul des dilutions, milieu méthylcellulose MethoCult® GF contenant des cytokines recombinantes, seringues et aiguilles à bout franc, boîtes de culture pré-testées pour le test des CFC, matériel plastique.

Test : les participants réaliseront la numération cellulaire et détermineront la viabilité cellulaire puis prépareront une suspension cellulaire de concentration appropriée pour la mise en culture dans le milieu MethoCult® (la concentration optimale d'ensemencement de l'échantillon cellulaire du test sera fournie avec l'ensemble du matériel et les cellules).

Les cultures seront incubées pendant 14 jours à 37°C, 5% CO₂.

*** RISQUE BIOLOGIQUE.** Ce test utilise des cellules de moelle humaine. La moelle est issue d'un donneur normal qui a été testé pour l'antigène de l'hépatite Bs, l'anticorps de l'Hépatite C, l'antigène Hbe, l'anticorps de l'Hépatite Be et l'anticorps HIV. Cependant, elle ne peut être garantie comme exempte de tout agent pathogène. En conséquence, les cellules humaines doivent être considérées comme potentiellement dangereuses et doivent être manipulées avec les précautions d'usage.

2. Numération des colonies

Matériel fourni : boîte de Pétri avec grille de comptage incorporée, logiciel pour l'enregistrement des résultats et leur transmission.

Test : Au terme des 14 jours de culture, les participants compteront les colonies suivantes : CFU-E, BFU-E, CFU-GM et CFU-GEMM. Les résultats peuvent être sauvegardés directement avec le logiciel ou manuellement sur les formulaires se trouvant à la fin de ce manuel.

3. Identification des colonies

Matériel fourni : Planche de photographies de colonies issues de moelle humaine normale.

Test : Les participants seront évalués sur leur capacité à identifier des colonies de granulocytes /macrophages, érythroïdes et mixtes à partir de photographies.

Transmission des résultats pour analyse statistique :

Les participants doivent transmettre leurs résultats à StemCell Technologies avant la date limite spécifiée sur le courrier confirmant l'inscription. Le logiciel fourni, compatible Window® 95, 98 ou NT, peut être utilisé pour l'enregistrement des résultats et leur transmission par fax ou par email. Si le logiciel n'est pas compatible avec le système informatique du laboratoire, les résultats doivent être transmis par fax à StemCell Technologies à l'aide des formulaires se trouvant à la fin de ce manuel.

Analyse des données :

StemCell Technologies compilera et réalisera une analyse statistique des données reçues à la date limite. Un rapport complet comprenant graphes et tableaux sera envoyé à chaque participant qui pourra visualiser ses propres résultats grâce à ses codes d'identification.

Pour toute question, n'hésitez pas à nous contacter par téléphone au +33 4 76 04 75 30 ou par e-mail à info@stemcellfrance.com.

For Research Use Only

In North America
Tel: 1.604.877.0713
Fax: 1.604.877.0704
Toll Free Tel: 1.800.667.0322
Toll Free Fax: 1.800.567.2899
e-mail: info@stemcell.com
e-mail: orders@stemcell.com

In the United Kingdom
Tel: +44.(0).20.7537.7565
Fax: +44.(0).20.7515.5408
Toll free within United Kingdom:
Tel: 0800.731.27.14
Fax: 000.731.27.13
e-mail: info@stemcellgb.com

In Europe
Tel: +33.(0).4.76.04.75.30
Fax: +33.(0).4.76.18.99.63
e-mail: info@stemcellfrance.com

StemCell Technologies Inc

Version 1.1.1
April 2006
28452F

2.0 Test 1- Décongélation, numération et mise en culture

2.1 Matériel

Matériels et réactifs fournis dans le kit :

- Un tube de MethoCult® GF (volume total 5mL)
Contient les produits suivants :
 - 1% Méthylcellulose en IMDM30% Sérum Bovin fœtal
 - 1% Sérum Albumine Bovine
 - 3U/mL rh érythropoïétine
 - 10⁻⁴ M 2-Mercaptoéthanol
 - 2 mM L-Glutamine
 - 50 ng/mL rh Stem Cell Factor
 - 10 ng/mL rh GM-CSF
 - 10 ng/mL rh IL-3
 - 10 ng/mL rh G-CSF
- Un tube de cellules de moelle humaine normale pré-testées (cellules mononucléées issues de Ficoll Hypaque, 5 x 10⁶ cellules partube). Préparées pour StemCell Technologies par Poietic Technologies Inc Gaithersburg, MD, USA **IMPORTANT** :Les cellules de moelle doivent être conservées à une température de -135°C (ou plus basse) ou dans l'azote liquide.
- Un flacon d'IMDM + 2% SBF (100 mL)
- Deux seringues de 3 mL
- Deux aiguilles 16G à bout franc
- Dix boîtes de Pétri stériles de 35 mm
- Deux boîtes de Pétri stériles de 100 mm
- Une boîte de Pétri de 60 mm avec grille de comptage incorporée
- Un manuel technique

Matériels et réactifs non fournis :

- Hotte à flux laminaire de classe II certifiée pour la manipulation des cellules humaines sanguines et de moelle (niveau II)
- Centrifugeuse (type Beckman TJ-6) équipée pour la manipulation d'échantillons à risque biologique
- Incubateur à 37°C avec une humidité contrôlée supérieure à 95% et une atmosphère à 5% de CO₂.
- Vortex
- Microscope inversé avec oculaires et objectifs plan donnant un grossissement total d'environ 20-30X, 40-63X et 100-125X. Note :Grossissement total = oculaire x objectif (ex :25x = 2,5 x 10)
- Microscope droit de routine pour la numération cellulaire à l'hématimètre ou un compteur Coulter
- Hématimètre (pour la numération manuelle) et lamelle planée
- Acide acétique avec bleu de méthylène (pour la numération manuelle)
- Bleu trypan ou autre colorant pour la viabilité cellulaire (ex :bromure d'éthidium/acridine orange à observer sur un microscope en fluorescence)
- Tube 4 mL (type Falcon #2058)
- Tube 13 mL (type Falcon #2057)
- Tube 50 mL (type Falcon #2070)
- Compteur mécanique
- Eau distillée stérile

For Research Use Only

In North America
Tel: 1.604.877.0713
Fax: 1.604.877.0704
Toll Free Tel: 1.800.667.0322
Toll Free Fax: 1.800.567.2899
e-mail: info@stemcell.com
e-mail: orders@stemcell.com

In the United Kingdom
Tel: +44.(0).20.7537.7565
Fax: +44.(0).20.7515.5408
Toll free within United Kingdom:
Tel: 0800.731.27.14
Fax: 000.731.27.13
e-mail: info@stemcellgb.com

In Europe
Tel: +33.(0).4.76.04.75.30
Fax: +33.(0).4.76.18.99.63
e-mail: info@stemcellfrance.com

StemCell Technologies Inc

Version 1.1.1
April 2006
28452F

2.1.1 Conservation des produits

- Les cellules de moelle doivent être conservées à une température de -135°C (ou plus basse) ou dans l'azote liquide. Si les cellules ne sont pas conservées à la bonne température, leur viabilité est altérée.
- Le milieu MethoCult® GF et l'IMDM + 2% SBF doivent être conservés à -20°C .
- Tous les autres matériels et réactifs doivent être conservés à température ambiante.

2.2 Méthode

Etape 1 : Ouvrir le colis immédiatement, dès son arrivée. Mettre le tube de cellules congelées à une température de -135°C (ou plus basse) ou dans l'azote liquide. Mettre le tube de MethoCult® GF et le flacon d'IMDM + 2% SBF à -20°C . Le reste du matériel peut être stocké à température ambiante.

Etape 2 : Noter la date à laquelle a été reçu le colis sur le formulaire A se trouvant à la fin de ce manuel. Remplir les champs situés dans la partie supérieure de la page : nom du laboratoire, le code d'identification de l'institut et du participant et le code de l'échantillon. Si vous utilisez le logiciel, voir les instructions au paragraphe 5.

Etape 3 : Voir le courrier de confirmation d'inscription pour les dates limite de renvoi des résultats. La mise en culture doit être effectuée 14 jours avant cette date limite afin que les données puissent être incluses dans l'analyse statistique.

2.2.1 Décongélation des cellules

Etape 1 : Décongeler l'IMDM + 2% SBF et le milieu MethoCult® GF.

Etape 2 : Décongeler rapidement les cellules dans un bain-marie à 37°C puis nettoyer le tube à l'alcool à 70° .

Etape 3 : Ne jamais vortexer les cellules.

Etape 4 : Sans attendre, transférer délicatement les cellules à l'aide d'une pipette dans un tube de 50 mL.

Etape 5 : Ajouter progressivement et lentement (goutte à goutte) 15 ml d'IMDM + 2% SBF tout en agitant doucement le tube avec la main.

Etape 6 : Compléter jusqu'à 30 mL avec de l'IMDM + 2% SBF. Mélanger délicatement par renversement.

Etape 7 : Centrifuger à 300 g pendant 10 min.

Etape 8 : Éliminer le surnageant puis tapoter le fond du tube pour remettre en suspension le culot.

Etape 9 : Remettre en suspension les cellules dans un volume final de 1 à 2 mL d'IMDM + 2% SBF. Mesurer le volume final de la suspension cellulaire et le noter sur le formulaire A.

2.2.2 Numération des cellules

2.2.2.1 Comptage automatique

Le comptage doit être effectué selon les instructions du fabricant. Noter la méthode de comptage sur le formulaire A se trouvant à la fin du manuel.

For Research Use Only

In North America
Tel: 1.604.877.0713
Fax: 1.604.877.0704
Toll Free Tel: 1.800.667.0322
Toll Free Fax: 1.800.567.2899
e-mail: info@stemcell.com
e-mail: orders@stemcell.com

In the United Kingdom
Tel: +44.(0).20.7537.7565
Fax: +44.(0).20.7515.5408
Toll free within United Kingdom:
Tel: 0800.731.27.14
Fax: 000.731.27.13
e-mail: info@stemcellgb.com

In Europe
Tel: +33.(0).4.76.04.75.30
Fax: +33.(0).4.76.18.99.63
e-mail: info@stemcellfrance.com

StemCell Technologies Inc

Version 1.1.1
April 2006
28452F

2.2.2.2 Comptage manuel des cellules nucléées (ex : cellule de numération de Neubauer)

Etape 1 : Nettoyer l'hématimètre et la lamelle planée avec de l'alcool puis les sécher. Placer la lamelle planée sur l'hématimètre de façon à recouvrir les 2 chambres de l'hématimètre.

Etape 2 : Diluer l'échantillon selon les pratiques du laboratoire. Ex : 20 µL de suspension cellulaire + 380 µL d'IMDM + 2% SBF pour obtenir une dilution au 1 :20.

Etape 3 : Prélever une petite quantité de suspension cellulaire après dilution à l'aide par exemple d'un tube microhématocrite.

Etape 4 : Remplir par capillarité les 2 chambres de l'hématimètre en touchant délicatement le bord de la lamelle planée avec l'extrémité du tube microhématocrite. Attention au remplissage des chambres qui ne doivent être ni trop ni pas assez remplies.

Etape 5 : Compter toutes les cellules dans au moins 2 des carrés majeurs (la cellule de Neubauer en compte 9). Compter le même nombre de carrés dans la chambre opposée. Faire le total des cellules et calculer la moyenne par carré. Si le nombre de cellules est inférieur à 10 par carré, une dilution cellulaire plus concentrée doit être préparée (ex : 20 µL + 180 µL d'IMDM + 2% SBF pour une dilution au 1:10).

Etape 6 : Déterminer la concentration cellulaire : Lorsque la lamelle planée est en place, chacun des 9 carrés majeurs de l'hématimètre représente un volume de 0,1 mm³ (ou 10⁻⁴ cm³, équivalent à 10⁻⁴ mL). Concentration cellulaire par mL = nombre de cellule par carré x le facteur de dilution x 10⁴ Nombre total de cellules = cellules par ml x volume de suspension cellulaire

2.2.2.3 Comptage des cellules viables (bleu trypan ou autres méthodes)

Instructions pour le bleu trypan

Etape 1 : Nettoyer l'hématimètre et la lamelle planée avec de l'alcool puis les sécher. Placer la lamelle planée sur l'hématimètre de façon à recouvrir les 2 chambres de l'hématimètre.

Etape 2 : Placer 100 µL de la suspension cellulaire dans un tube.

Etape 3 : Ajouter 100 µL de bleu trypan.

Etape 4 : Mélanger délicatement et laisser reposer pendant 2 min. Ne pas laisser plus de 5 min car les cellules viables vont commencer à incorporer le colorant.

Etape 5 : Prélever une petite quantité de suspension cellulaire après dilution à l'aide par exemple d'un tube microhématocrite.

Etape 6 : Remplir par capillarité les 2 chambres de l'hématimètre en touchant délicatement le bord de la lamelle planée avec l'extrémité du tube microhématocrite. Attention au remplissage des chambres qui ne doivent être ni trop ni pas assez remplies.

Etape 7 : Dénombrer séparément toutes les cellules nucléées viables (claire, non bleues) et toutes les cellules nucléées bleues (membranes endommagées). Dénombrer un minimum de 100 cellules nucléées.

Etape 8 : Calculer le pourcentage de viabilité :

$$\% \text{ de viabilité} = \frac{\text{nombre total de cellules claires (non bleues)}}{\text{nombre total de cellules claires} + \text{nombre total de cellules}} \times 100$$

Etape 9 : Pour la mise en culture, utiliser le nombre de cellules viables par ml pour déterminer la dilution à effectuer. Si vous n'utilisez pas le logiciel qui calcule automatiquement cette valeur, le nombre de cellules viables par mL est calculé selon la méthode suivante :

Nombre de cellules / mL x % viabilité

$$\begin{aligned} \text{Ex : nombre de cellules viables par mL} &= \text{nombre de cellules / mL} \times \% \text{ viabilité} \\ &= 3,8 \times 10^6 / \text{mL} \quad \times \quad 92\% \\ &= 3,5 \times 10^6 \end{aligned}$$

For Research Use Only

In North America
Tel: 1.604.877.0713
Fax: 1.604.877.0704
Toll Free Tel: 1.800.667.0322
Toll Free Fax: 1.800.567.2899
e-mail: info@stemcell.com
e-mail: orders@stemcell.com

In the United Kingdom
Tel: +44.(0).20.7537.7565
Fax: +44.(0).20.7515.5408
Toll free within United Kingdom:
Tel: 0800.731.27.14
Fax: 000.731.27.13
e-mail: info@stemcellgb.com

In Europe
Tel: +33.(0).4.76.04.75.30
Fax: +33.(0).4.76.18.99.63
e-mail: info@stemcellfrance.com

StemCell Technologies Inc

Version 1.1.1
April 2006
28452F

2.2.3 Préparation de la dilution cellulaire pour le test des colonies

La concentration de la suspension cellulaire doit être 10 fois supérieure à la concentration finale voulue dans les boîtes de culture. Lorsque 0,5 mL de cette suspension est ajouté aux 5 mL de MethoCult®, on réalise une dilution au 1/10. Cette concentration est variable pour chaque test et est fournie à chaque session.

Il est conseillé d'utiliser le logiciel pour préparer la dilution 10X car il diminue les risques d'erreur. Si vous ne pouvez pas utiliser le logiciel, utiliser le formulaire A.

Noter le numéro d'identification de la moelle sur la ligne 1 (coté droit de l'écran). Noter votre concentration cellulaire (ligne 3) et le volume total de suspension cellulaire (ligne 2). Le nombre total de cellules sera automatiquement calculé.

Après avoir déterminé la viabilité (bleu trypan ou autre méthode), noter la valeur de la viabilité sur la ligne 6. Le programme déterminera automatiquement le nombre de cellules viables par mL.

Noter sur la ligne 5 la dilution 10X à utiliser (fournie avec l'ensemble du matériel). La méthode de détection de la viabilité est à spécifier sur la ligne 7.

La valeur apparaissant sur la ligne 8 est le volume de suspension cellulaire à prélever et à placer dans un tube. La valeur sur la ligne 9 indique le volume d'IMDM + 2% SBF à ajouter dans le tube pour obtenir la suspension cellulaire 10X pour la mise en culture.

Le tube ainsi préparé contient 1 mL de cellules à la concentration appropriée (10X) pour la mise en culture.

2.2.4 Mise en culture

Etape 1 : Décongeler le tube de MethoCult® à température ambiante.

Etape 2 : Ajouter 0,5 mL de suspension cellulaire 10X au tube de 5 mL de MethoCult®.

Etape 3 : Vortexer le tube vigoureusement (la méthylcellulose doit monter approximativement au 2/3 de la paroi du tube). Puis laisser le tube au repos pendant 5 min afin que les bulles remontent à la surface.

Etape 4 : Placer 4 boîtes de Pétri de 35 mm par paire dans 2 boîtes de Pétri de 100 mm. Ajouter dans chaque boîte 100 mm une 3ème boîte de Pétri 35 mm sans couvercle qui sera remplie d'eau stérile, ceci pour maintenir une humidité maximale pendant les 14 jours d'incubation. Les boîtes de Pétri utilisées pour le test des CFC sont pré-testées et sélectionnées pour l'absence d'adhérence et de prolifération des fibroblastes.

Etape 5 : Marquer les boîtes de Pétri avec un marqueur indélébile.

Etape 6 : Placer 1,1 mL du mélange milieu-cellules dans chacune des 4 boîtes de Pétri 35 mm stériles. Fixer l'aiguille 16G à bout franc sur la seringue de 3 mL. Prélever environ 2 mL de mélange milieu-cellules puis vider doucement la seringue dans le tube afin d'évacuer la bulle. Puis prélever à nouveau jusqu'au repère 2,6 mL. Déposer 1,1 mL de mélange dans une boîte de Pétri 35 mm (le piston de la seringue est alors à 1,5 mL). Déposer à nouveau 1,1 mL dans la seconde boîte de Pétri (piston à 0,4 mL). Ne pas jeter la seringue ! Prélever à nouveau 2,6 mL de mélange et déposer à nouveau 1,1 mL dans les 2 boîtes restantes.

Etape 7 : Incliner délicatement les boîtes de Pétri afin de répartir la méthylcellulose de façon homogène sur toute la surface de la boîte.

Etape 8 : Ajouter 3 mL d'eau stérile dans les 2 boîtes de Pétri destinées à maintenir l'humidité. Placer les cultures dans un incubateur à 37°C, 5% de CO₂ dans l'air et saturé en humidité. Il est important que la température, le CO₂ et l'humidité (> à 95%) soient maintenus pendant toute la période de culture.

Etape 9 : Noter la date de mise en culture sur le formulaire B ou sur le programme (voir paragraphe 5 pour les instructions).

Etape 10 : Incuber pendant 14 jours à 37°C, 5% CO₂ dans l'air et dans une humidité supérieure à 95%.

For Research Use Only

In North America
Tel: 1.604.877.0713
Fax: 1.604.877.0704
Toll Free Tel: 1.800.667.0322
Toll Free Fax: 1.800.567.2899
e-mail: info@stemcell.com
e-mail: orders@stemcell.com

In the United Kingdom
Tel: +44.(0).20.7537.7565
Fax: +44.(0).20.7515.5408
Toll free within United Kingdom:
Tel: 0800.731.27.14
Fax: 000.731.27.13
e-mail: info@stemcellgb.com

In Europe
Tel: +33.(0).4.76.04.75.30
Fax: +33.(0).4.76.18.99.63
e-mail: info@stemcellfrance.com

StemCell Technologies Inc

Version 1.1.1
April 2006
28452F

3.0 Test 2 - Numération des colonies

Etape 1 : Noter la date de lecture des colonies sur le formulaire B.

Etape 2 : Préparer la boîte de 60 mm avec grille de comptage en traçant au dos les marques de chaque quart (voir atlas des colonies, page 4).

Etape 3 : Sortir les boîtes de culture de l'incubateur. Placer une boîte (en gardant son couvercle en place) dans la boîte de 60 mm afin de compter les colonies au microscope inversé. La numération est en général plus facile quand on compte en rangée verticale plutôt qu'horizontalement.

Etape 4 : Les numérations à J14 doivent inclure les plus petites colonies érythroïdes, issues des progéniteurs érythroïdes les plus matures (CFU-E), les grandes colonies érythroïdes (issues des BFU-E primitives), toutes les colonies granulopoïétiques (CFU-GM) et les colonies contenant des cellules de lignées différentes (CFU-GEMM). Voir l'atlas des colonies pour plus de détails pour l'identification des colonies. CFU-E : Colony-Forming Unit-Erythroid : 1 à 2 amas contenant de 8 à 200 érythroblastes BFU-E : Burst-Forming Unit- Erythroid : un minimum de 3 amas ou un nombre équivalent d'érythroblastes (supérieur à 200 cellules) CFU-GM : Colony-Forming Unit : 40 cellules ou plus de la lignée granulocytes et/ou macrophage CFU-GEMM : Colony-Forming Unit contenant des cellules érythroïdes et 20 cellules ou plus de la lignée granulocytes et / ou macrophage et / ou mégacaryocytes. Conseil : Un filtre bleu permet d'intensifier la couleur rouge des colonies érythroïdes et peut aider à l'identification des CFU-E et BFU-E.

Etape 5 : Observer rapidement toute la boîte au grossissement 20-30X pour s'assurer de l'homogénéité de la répartition des colonies. L'identification et le comptage des colonies sont plus facilement réalisés avec un microscope inversé doté d'objectifs plan de haute qualité et d'oculaires permettant d'obtenir un grossissement total de 20-30X, 40-63X et 100-125X.

(Grossissement total de l'objet = grossissement de l'oculaire multiplié par le grossissement de l'objectif ;
ex : 62,5X = 12,5 x 5)

Etape 6 : Dénombrer les CFU-E avec le grossissement total de 40-63X. Puis dénombrer les BFU-E, CFU-GEMM et CFU-GM avec le grossissement 20-30X. Si l'identification des CFU-GEMM s'avère difficile, utiliser un grossissement plus fort pour confirmer la présence simultanée de cellules issues de lignées différentes (érythroïdes et granulocytes) au sein de la colonie.

Etape 7 : Noter tous les résultats sur le formulaire B se trouvant à la fin du manuel et calculer le nombre moyen de chaque type de colonie ou entrer ces données sur le programme (voir section 5 pour les instructions).

For Research Use Only

In North America
Tel: 1.604.877.0713
Fax: 1.604.877.0704
Toll Free Tel: 1.800.667.0322
Toll Free Fax: 1.800.567.2899
e-mail: info@stemcell.com
e-mail: orders@stemcell.com

In the United Kingdom
Tel: +44.(0).20.7537.7565
Fax: +44.(0).20.7515.5408
Toll free within United Kingdom:
Tel: 0800.731.27.14
Fax: 000.731.27.13
e-mail: info@stemcellgb.com

In Europe
Tel: +33.(0).4.76.04.75.30
Fax: +33.(0).4.76.18.99.63
e-mail: info@stemcellfrance.com

StemCell Technologies Inc

Version 1.1.1
April 2006
28452F

4.0 Test 3 - Identification des colonies

4.1 Méthode

Etape 1 : Observer les photographies de la planche fournie avec le matériel et les cellules. Toutes les colonies sont issues de moelle humaine normale.

Etape 2 : Identifier les colonies et les nommer en utilisant la terminologie suivante :

CFU-Erythroid (CFU-E)

BFU-Erythroid (BFU-E)

CFU-Granulocyte, Erythroid, Macrophage, Megakaryocyte (CFU-GEMM)

CFU-Granulocyte (CFU-G)

CFU-Granulocyte, Macrophage (CFU-GM)

CFU-Macrophage (CFU-M)

Etape 3 : Noter vos réponses directement sur la planche de photos et sur le formulaire C. Vous pouvez également rentrer les réponses sur le programme. Utiliser le menu déroulant à droite des cases pour insérer la réponse voulue. Voir le paragraphe 5 pour les instructions.

5.0 Instructions pour le logiciel Proficiency Testing

Le logiciel Proficiency Testing

StemCell Technologies fournit également un logiciel pour vous permettre d'enregistrer facilement vos résultats. Vous pouvez donc enregistrer vos données et transférer directement vos données par e-mail à StemCell Technologies à l'adresse suivante : proficiency@stemcell.com. Si vous ne pouvez pas les envoyer par e-mail, imprimez le rapport généré par le logiciel et faxez le au +33 4 76 18 99 63.

5.1 Matériel

- Un CD identifiées « Proficiency Testing Software Version 3.0 »

Pour utiliser le logiciel Proficiency Testing, il est nécessaire d'avoir un PC fonctionnant sous Microsoft Windows 95, Windows 98 ou Windows NT. Le PC doit avoir un minimum de 10MB d'espace libre sur le disque dur et 16MB RAM (mémoire vive). Si le logiciel n'est pas compatible avec votre PC, vous pouvez utiliser les formulaires se trouvant au paragraphe 6.0 pour enregistrer vos données et résultats.

Note: Le logiciel est également disponible sous forme de disquettes. Merci de nous contacter si vous devez impérativement utiliser ce format.

5.2 Instructions

5.2.1 Installation

Le logiciel est fourni sous la forme d'un CD. Avant de démarrer l'installation, s'assurer que tous les programmes et applications sont fermés.

Etape 1 : Placer le CD identifié Proficiency Testing Software Version 3.0 dans le lecteur de CD (correspondant en général au lecteur D)

Etape 2 : Cliquer sur « Démarrer (Start) »

Etape 3 : Sélectionner « Exécuter (Run) » du menu Démarrer

Etape 4 : taper D:PT3.EXE dans la boîte de dialogue et cliquer sur « OK ». (si le lecteur de CD n'est pas identifié par la lettre D, taper la lettre correspondant au lecteur de CDt)

NOTE : Vous pouvez aussi placer le CD dans le lecteur de CD, accéder directement au logiciel sur le lecteur D et double cliquer sur le fichier PT3.EXE pour charger et installer le programme sur le disque dur de l'ordinateur.

For Research Use Only

In North America
Tel: 1.604.877.0713
Fax: 1.604.877.0704
Toll Free Tel: 1.800.667.0322
Toll Free Fax: 1.800.567.2899
e-mail: info@stemcell.com
e-mail: orders@stemcell.com

In the United Kingdom
Tel: +44.(0).20.7537.7565
Fax: +44.(0).20.7515.5408
Toll free within United Kingdom:
Tel: 0800.731.27.14
Fax: 000.731.27.13
e-mail: info@stemcellgb.com

In Europe
Tel: +33.(0).4.76.04.75.30
Fax: +33.(0).4.76.18.99.63
e-mail: info@stemcellfrance.com

StemCell Technologies Inc

Version 1.1.1
April 2006
28452F

5.2.2 Démarrer le programme Proficiency Testing

Etape 1 : Cliquer sur le bouton Démarrer de votre programme Windows

Etape 2 : Sélectionner l'option Programmes

Etape 3 : Sélectionner l'option « StemCell Technologies Inc ». Un sous-menu doit apparaître.

Etape 4 : Dans le sous-menu, sélectionner l'option Proficiency Testing.

5.2.3 Utiliser le logiciel

Etape 1 : Cliquer sur Add New Test Scores pour entrer de nouveaux résultats.

Etape 2 : Remplir les champs se trouvant dans la partie supérieure de l'écran comme le nom et le code de votre institut, votre numéro de participant, le numéro de l'échantillon, la date de réception...

Etape 3 : Le déplacement d'un champ à un autre peut se faire à l'aide la souris ou avec la touche de tabulation. Il est important de remplir tous les champs de données.

Etape 4 : cliquer sur un des 3 onglets « Cell Assessment », « Plating and Colony Enumeration », « Colony Identification » se trouvant dans la partie inférieure de l'écran.

Etape 5 : Entrer vos résultats pour les 3 tests.

Etape 6 : Imprimer vos résultats en cliquant sur Print Report. Garder une copie pour votre dossier. Le logiciel sauvegarde automatiquement vos données.

Etape 7 : Lorsqu'il y a plusieurs participants, cliquer sur « Add New Test Scores » et rentrer les nouvelles données d'identification et la nouvelle série de résultats.

5.2.4 Renvoyer les résultats pour analyse

Etape 1 : Pour renvoyer les résultats par e-mail, sauvegarder le dossier en cliquant sur « Save Test Scores to Disk » lorsque tous les résultats ont été entrés. Le logiciel vous demandera un num de fichier et de répertoire pour stocker les données (les noms proposés par défaut sont suffisant pour une bonne sauvegarde). Cliquer sur SAVE.

Etape 2 : Envoyer le fichier que vous venez de créer en fichier attaché d'un e-mail à proficiency@stemcell.com. Si le fichier ne peut être envoyé par e-mail, imprimer le rapport généré par le logiciel our remplir par écrit les formulaires se trouvant à la fin de ce manuel et faxer las au +33 4 76 18 9 63.

For Research Use Only

In North America
Tel: 1.604.877.0713
Fax: 1.604.877.0704
Toll Free Tel: 1.800.667.0322
Toll Free Fax: 1.800.567.2899
e-mail: info@stemcell.com
e-mail: orders@stemcell.com

In the United Kingdom
Tel: +44.(0).20.7537.7565
Fax: +44.(0).20.7515.5408
Toll free within United Kingdom:
Tel: 0800.731.27.14
Fax: 000.731.27.13
e-mail: info@stemcellgb.com

In Europe
Tel: +33.(0).4.76.04.75.30
Fax: +33.(0).4.76.18.99.63
e-mail: info@stemcellfrance.com

StemCell Technologies Inc

Version 1.1.1
April 2006
28452F

For Research Use Only

In North America
Tel: 1.604.877.0713
Fax: 1.604.877.0704
Toll Free Tel: 1.800.667.0322
Toll Free Fax: 1.800.567.2899
e-mail: info@stemcell.com
e-mail: orders@stemcell.com

In the United Kingdom
Tel: +44.(0).20.7537.7565
Fax: +44.(0).20.7515.5408
Toll free within United Kingdom:
Tel: 0800.731.27.14
Fax: 000.731.27.13
e-mail: info@stemcellgb.com

In Europe
Tel: +33.(0).4.76.04.75.30
Fax: +33.(0).4.76.18.99.63
e-mail: info@stemcellfrance.com

StemCell Technologies Inc

Version 1.1.1
April 2006
28452F

6.0 Formulaires

Formulaire A

StemCell Technologies Proficiency Testing		
Institute Name	<input type="text"/>	<input type="button" value="Add New Test Scores"/> <input type="button" value="Delete Test Scores"/> <input type="button" value="Save Test Scores to Disk"/> <input type="button" value="Print Report"/> <input type="button" value="Exit Program"/>
Institute ID	<input type="text"/>	
Participant ID	<input type="text"/>	
Sample ID	<input type="text"/>	
Received Date	<input type="text"/>	
	<input type="button" value="Next Test"/>	
	<input type="button" value="Previous Test"/>	
Cell Assessment	Plating and Colony Enumeration	Colony Identification
Following Thaw		Bone Marrow ID: <input type="text"/>
Volume (mL)	<input type="text"/>	
Cell Count/mL $\times 10^6$:	<input type="text"/>	
Method of Count:	<input type="text"/>	Preparation of working cell solution for CFC
Total Cells $\times 10^6$:		Insert number provided with sample: <input type="text"/> $\times 10^5$
% Viability:	<input type="text"/>	uL of Cell Stock Added:
Method of Assessing Viability:	<input type="text"/>	uL of IMDM with 2% FBS Added:
Total Viable Cells/mL:	<input type="text"/> $\times 10^6$	Volume of working cell solution added to methylcellulose: 500 uL
StemCell Technologies Proficiency Testing		2/22/01 10:32 AM

For Research Use Only

In North America
 Tel: 1.604.877.0713
 Fax: 1.604.877.0704
 Toll Free Tel: 1.800.667.0322
 Toll Free Fax: 1.800.567.2899
 e-mail: info@stemcell.com
 e-mail: orders@stemcell.com

In the United Kingdom
 Tel: +44.(0).20.7537.7565
 Fax: +44.(0).20.7515.5408
 Toll free within United Kingdom:
 Tel: 0800.731.27.14
 Fax: 000.731.27.13
 e-mail: info@stemcellgb.com

In Europe
 Tel: +33.(0).4.76.04.75.30
 Fax: +33.(0).4.76.18.99.63
 e-mail: info@stemcellfrance.com

StemCell Technologies Inc

Version 1.1.1
 April 2006
 28452F

For Research Use Only

In North America
Tel: 1.604.877.0713
Fax: 1.604.877.0704
Toll Free Tel: 1.800.667.0322
Toll Free Fax: 1.800.567.2899
e-mail: info@stemcell.com
e-mail: orders@stemcell.com

In the United Kingdom
Tel: +44.(0).20.7537.7565
Fax: +44.(0).20.7515.5408
Toll free within United Kingdom:
Tel: 0800.731.27.14
Fax: 000.731.27.13
e-mail: info@stemcellgb.com

In Europe
Tel: +33.(0).4.76.04.75.30
Fax: +33.(0).4.76.18.99.63
e-mail: info@stemcellfrance.com

StemCell Technologies Inc

Version 1.1.1
April 2006
28452F

Formulaire B

StemCell Technologies Proficiency Testing		
Institute Name	<input type="text"/>	<input type="button" value="Add New Test Scores"/> <input type="button" value="Delete Test Scores"/> <input type="button" value="Save Test Scores to Disk"/> <input type="button" value="Print Report"/> <input type="button" value="Exit Program"/>
Institute ID	<input type="text"/>	
Participant ID	<input type="text"/>	
Sample ID	<input type="text"/>	
Received Date	<input type="text"/>	
	<input type="button" value="Next Test"/>	
	<input type="button" value="Previous Test"/>	
Cell Assessment	Plating and Colony Enumeration	Colony Identification
Following Thaw		Bone Marrow ID: <input type="text"/>
Volume (mL)	<input type="text"/>	
Cell Count/mL x10 ⁶ :	<input type="text"/>	
Method of Count:	<input type="text"/>	
Total Cells x 10 ⁶ :		Preparation of working cell solution for CFC
% Viability:	<input type="text"/>	Insert number provided with sample: <input type="text"/> x 10 ⁵
Method of Assessing Viability:	<input type="text"/>	uL of Cell Stock Added:
Total Viable Cells/mL:	<input type="text"/> x 10 ⁶	uL of IMDM with 2% FBS Added:
		Volume of working cell solution added to methylcellulose: 500 uL
StemCell Technologies Proficiency Testing		2/22/01 10:32 AM

For Research Use Only

In North America
 Tel: 1.604.877.0713
 Fax: 1.604.877.0704
 Toll Free Tel: 1.800.667.0322
 Toll Free Fax: 1.800.567.2899
 e-mail: info@stemcell.com
 e-mail: orders@stemcell.com

In the United Kingdom
 Tel: +44.(0).20.7537.7565
 Fax: +44.(0).20.7515.5408
 Toll free within United Kingdom:
 Tel: 0800.731.27.14
 Fax: 000.731.27.13
 e-mail: info@stemcellgb.com

In Europe
 Tel: +33.(0).4.76.04.75.30
 Fax: +33.(0).4.76.18.99.63
 e-mail: info@stemcellfrance.com

StemCell Technologies Inc

Version 1.1.1
 April 2006
 28452F

For Research Use Only

In North America
Tel: 1.604.877.0713
Fax: 1.604.877.0704
Toll Free Tel: 1.800.667.0322
Toll Free Fax: 1.800.567.2899
e-mail: info@stemcell.com
e-mail: orders@stemcell.com

In the United Kingdom
Tel: +44.(0).20.7537.7565
Fax: +44.(0).20.7515.5408
Toll free within United Kingdom:
Tel: 0800.731.27.14
Fax: 000.731.27.13
e-mail: info@stemcellgb.com

In Europe
Tel: +33.(0).4.76.04.75.30
Fax: +33.(0).4.76.18.99.63
e-mail: info@stemcellfrance.com

StemCell Technologies Inc

Version 1.1.1
April 2006
28452F

Formulaire C

Cell Assessment						Plating and Colony Enumeration					Colony Identification
Institute Name	<input type="text"/>										Add New Test Scores
Institute ID	<input type="text"/>										Delete Test Scores
Participant ID	<input type="text"/>										Save Test Scores to Disk
Sample ID	<input type="text"/>										Print Report
Received Date	<input type="text"/>										Exit Program
		Next Test									
		Previous Test									
Plate Test Date	<input type="text"/>	Plate 1	Plate 2	Plate 3	Plate 4	Mean					
Read Test Date	<input type="text"/>										
CFU-E		<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>						
BFU-E		<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>						
CFU-GM		<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>						
CFU-GEMM		<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>						
StemCell Technologies Proficiency Testing							2/22/01		10:33 AM		

For Research Use Only

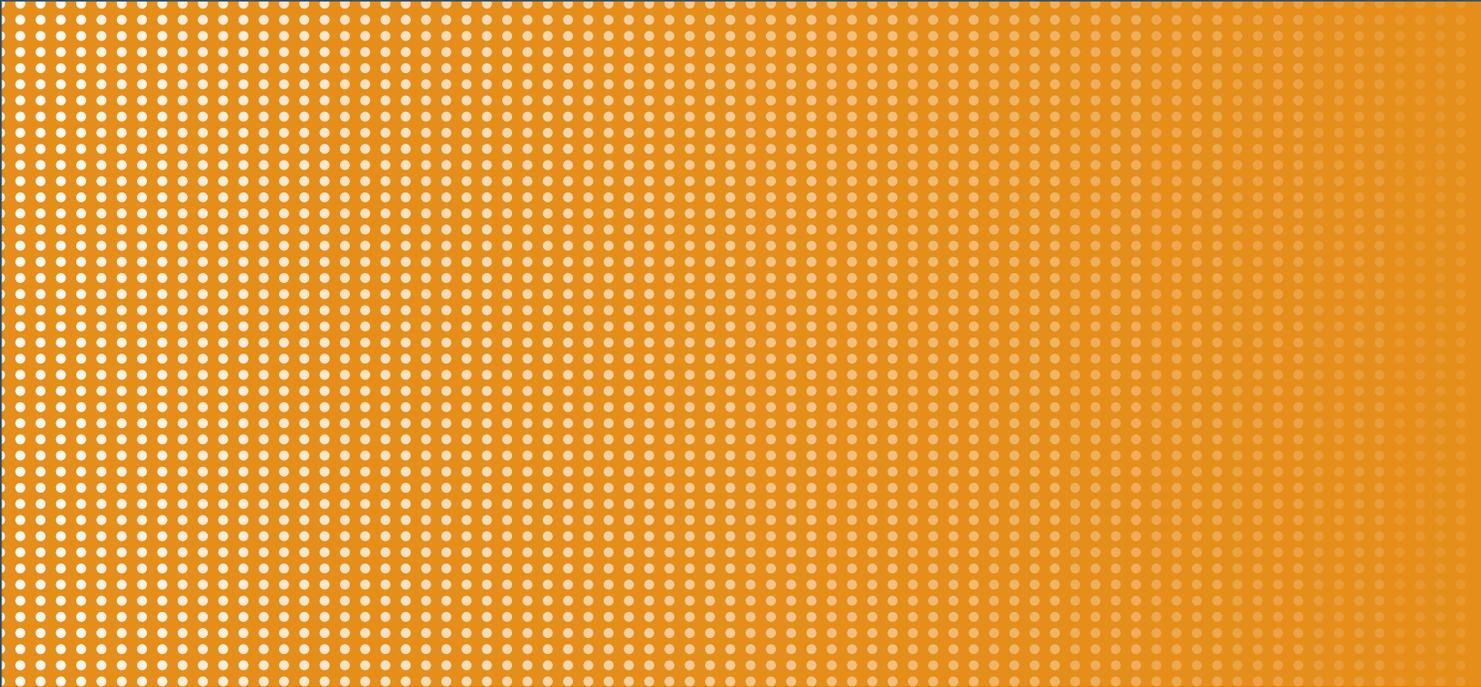
In North America
 Tel: 1.604.877.0713
 Fax: 1.604.877.0704
 Toll Free Tel: 1.800.667.0322
 Toll Free Fax: 1.800.567.2899
 e-mail: info@stemcell.com
 e-mail: orders@stemcell.com

In the United Kingdom
 Tel: +44.(0).20.7537.7565
 Fax: +44.(0).20.7515.5408
 Toll free within United Kingdom:
 Tel: 0800.731.27.14
 Fax: 000.731.27.13
 e-mail: info@stemcellgb.com

In Europe
 Tel: +33.(0).4.76.04.75.30
 Fax: +33.(0).4.76.18.99.63
 e-mail: info@stemcellfrance.com

StemCell Technologies Inc

Version 1.1.1
 April 2006
 28452F



THE CELL EXPERTS™ | WWW.STEMCELL.COM

TOLL-FREE PHONE 1 800 667 0322 • PHONE 1 604 877 0713

TOLL-FREE FAX 1 800 567 2899 • FAX 1 604 877 0704

ORDERS@STEMCELL.COM • INFO@STEMCELL.COM

FOR FULL CONTACT DETAILS WORLDWIDE VISIT OUR WEBSITE

FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR THERAPEUTIC OR DIAGNOSTIC USE. MANUAL CATALOG #28452F VERSION 1.1.1