

 **BD HLA-B27 Kit**

**N° de référence 340183**

23-23284(01)  
2021-09  
Français

**R<sub>x</sub> Only**

<b>IVD</b>
------------

---



---

## TABLE DES MATIÈRES

1. UTILISATION.....	5
2. RÉSUMÉ ET EXPLICATION.....	5
3. PRINCIPES DE LA MÉTHODE.....	5
Préparation des cellules.....	5
Configuration du cytomètre en flux .....	6
Acquisition des échantillons.....	6
Analyse des échantillons .....	7
4. RÉACTIFS .....	13
Réactifs fournis.....	13
Précautions .....	14
Stockage et manipulation.....	18
5. APPAREIL.....	18
Système BD FACSCanto™ ou BD FACSCanto™ II.....	18
Système BD FACSCalibur™ .....	18
6. PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS .....	19
Interférences .....	19
7. PROCÉDURE .....	19
Réactifs fournis.....	19
Réactifs et matériels requis mais non fournis .....	19
Marquage et fixation des cellules.....	20
Cytométrie en flux.....	22

---

Configuration BD® HLA-B27 pour tous les appareils pris en charge .....	22
Acquisition et analyse des échantillons .....	23
Contrôle qualité.....	24
<b>8. RÉSULTATS .....</b>	<b>25</b>
<b>9. LIMITATIONS .....</b>	<b>25</b>
<b>10. CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES.....</b>	<b>26</b>
Systèmes BD FACSCanto™ et BD FACSCanto™ II.....	26
Système BD FACSCalibur™ .....	29
Stabilité du sang total et stabilité du sang marqué .....	32
Caractérisation de la réactivité croisée .....	33
<b>RÉSOLUTION DES PROBLÈMES.....</b>	<b>35</b>
<b>GARANTIE .....</b>	<b>36</b>
<b>RÉFÉRENCES .....</b>	<b>37</b>
<b>MARQUES COMMERCIALES .....</b>	<b>38</b>
<b>GLOSSAIRE DES SYMBOLES.....</b>	<b>39</b>
<b>COORDONNÉES .....</b>	<b>40</b>

---

## 1. UTILISATION

Le système BD® HLA-B27 est une méthode qualitative d'immunofluorescence directe à deux couleurs permettant de détecter rapidement l'expression de l'antigène HLA-B27 dans le sang total lysé par érythrocytes (LWB), à l'aide des cytomètres en flux BD FACSCanto™, BD FACSCalibur™, BD FACSort™ ou BD FACScan™.

À ne pas utiliser pour le typage de tissu.

## 2. RÉSUMÉ ET EXPLICATION

HLA-B27 est une molécule de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les molécules de classe I du CMH sont des glycoprotéines de surface cellulaire qui s'expriment sur la plupart des plaquettes et cellules humaines nucléées.<sup>1</sup>

La présence de l'antigène HLA-B27 est fortement associée à la spondylarthrite ankylosante (SA), une maladie chronique inflammatoire de la colonne vertébrale, et à quelques autres troubles rhumatismaux (syndrome de Reiter, uvéite aigüe antérieure et maladie inflammatoire intestinale).<sup>2</sup> Le test du HLA-B27 est régulièrement utilisé pour dépister la SA puisque 90 % des patients atteints de SA présentent l'antigène de surface HLA-B27 comparé à seulement 8 % des individus en bonne santé.<sup>3</sup>

## 3. PRINCIPES DE LA MÉTHODE

### Préparation des cellules

Lorsqu'un réactif à base d'anticorps monoclonaux Anti-HLA-B27 FITC/CD3 PE est ajouté à du sang total humain, les anticorps couplés au fluorochrome se lient spécifiquement aux antigènes sur la surface des leucocytes. Les échantillons marqués sont traités avec la BD® HLA-B27 Kit FACS™ Lysing Solution afin de lyser les érythrocytes, puis lavés et fixés avant l'analyse par cytomètre en flux.

---

## Configuration du cytomètre en flux

Cette section fournit des instructions de configuration des cytomètres BD qui nécessitent une configuration de l'appareil.

La configuration de l'appareil de la famille de cytomètres en flux BD FACSCanto™ est réalisée à l'aide des BD FACSTM 7-Color Setup Beads et du BD FACSCanto™ Clinical Software. Le cytomètre en flux BD FACSCalibur™ est initialement configuré avec les BD Calibrite™ Beads à l'aide du logiciel BD FACSCComp™.

La tension du détecteur FITC/FL1 est configurée spécialement pour le test à l'aide des BD® HLA-B27 calibration beads. Le suffixe figurant sur l'étiquette du flacon de billes correspond à la valeur cible, en unités de fluorescence moyenne des log (LMF) pour une échelle de 256 canaux. **Le suffixe doit être correctement saisi dans le logiciel au risque de générer de mauvais résultats.** Le logiciel ajuste ensuite la tension du détecteur jusqu'à ce que la bille atteigne la valeur cible LMF. Pour l'appareil BD FACSCalibur™ uniquement, la bille est également utilisée pour définir le gain FSC. Les rapports sont générés par le logiciel approprié afin de vérifier la configuration.

La Figure 1 présente le rapport de configuration de l'application pour la famille de cytomètres en flux BD FACSCanto™. La Figure 2 présente le BD® HLA-B27 Calibration Report (rapport d'étalonnage) pour l'appareil BD FACSCalibur™.

## Acquisition des échantillons

Cette section et la suivante fournissent des instructions d'acquisition et d'analyse des échantillons avec le BD FACSCanto™ Clinical Software pour la famille de cytomètres en flux BD FACSCanto™, en utilisant le logiciel BD® HLA-B27 pour le cytomètre en flux BD FACSCalibur™. Pour obtenir les instructions d'acquisition des échantillons à l'aide d'autres cytomètres, consulter le mode d'emploi correspondant.

Environ 15 000 événements ou 2 000 lymphocytes T sont acquis.

---

## Analyse des échantillons

Le logiciel d'acquisition analyse automatiquement l'échantillon acquis. Les lymphocytes T sont fenêtrés dans des graphes de CD3 PE (détecteur PE ou FL2) en fonction de la diffraction aux grands angles (Figure 3 et Figure 4). La population de lymphocytes T est affichée dans un histogramme FITC/FL1 (Figure 3 et Figure 4), où la LMF est calculée. Les échantillons avec une LMF supérieure ou égale au marqueur de décision doivent être considérés comme positifs pour HLA-B27 (voir Résultats pour plus d'informations) et les échantillons avec une LMF inférieure au marqueur doivent être considérés comme négatifs pour HLA-B27. Le marqueur de décision est défini par le suffixe figurant sur le flacon de réactif pour HLA-B27 FITC/CD3 PE. Le suffixe est exprimé en unités de LMF et doit être correctement saisi dans le logiciel avant l'acquisition des échantillons au risque de générer de mauvais résultats de test.

**Figure 1** Exemple de BD<sup>®</sup> HLA-B27 Setup Report (rapport de configuration) généré par le BD FACSCanto™ Clinical Software pour le système BD FACSCanto™

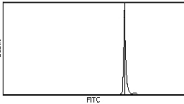
**Application Setup Report  
HLA-B27**

Cytometer:	BD FACSCanto	Installation:	
Serial Number:	V03600234	Director:	
Software:	BD FACSCanto v.2.0	Operator:	RD
Date:	05/27/2005 1:23:00 PM	Overall Result:	PASS

**Cytometer Setup**  
 Cytometer Setup Report: 05/27/2005 1:18:47 PM, Overall Result: PASS  
 Bead Product: BD FACS 7-Color Setup Beads, Catalog Number: 335775  
 Lot Information: Lot ID 21842, Exp.: 2005-11-30

**HLA-B27 Setup**  
 HLA-B27 Bead Lot ID: 16036/141, HLA-B27 Reagent Lot ID: 17616/144

**FITC Histogram**  
 FITC Average: 141, Spec.: 140-142, P/F: PASS



**Detectors**

Detector	Laser	Voltage
FSC	Blue	115
SSC	Blue	410
FITC	Blue	501
PE	Blue	498

**Compensation**

Detector	Fluorophores (applied % spectral overlap)		PASS	spec: all values ≤ 100%
	FITC	PE		
FITC	100.00	0.42		
PE	30.06	100.00		

**Threshold**

Parameter	Value
FSC	20000

**Comments**

Reviewed By: \_\_\_\_\_



**Figure 2** Exemple de BD<sup>®</sup> HLA-B27 Calibration Report (rapport de calibration) généré par le logiciel BD FACSComp<sup>™</sup> pour le système BD FACSCalibur<sup>™</sup>

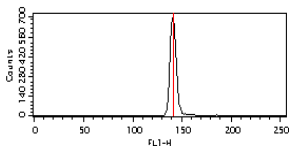
### HLA-B27 Calibration Report

**Institution** BD **Date:** Friday, July 15, 2005 11:15 AM  
**Director:** CW **Software:** FACSComp v5.2.1  
**Operator:** AA **Cytometer:** FACSCalibur E0344

**Bead Lot ID:** 12254/141

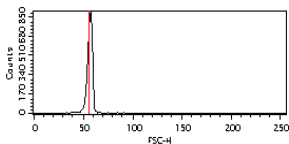
**HLA-B27 Lot ID:** 12330:146

**Average FL1:** 141



**FSC Histogram:**

**Average FSC:** 56



**Instrument Settings:**

Parameter	Detector	Amplifier	Threshold
FSC	E00	1.55	52
SSC	405	1.00	
FL1	697	Log	
FL2	616	Log	
<b>Compensation</b>	<b>FL1 - %FL2</b>	<b>FL2 - %FL1</b>	<b>Laser Power</b>
	0.0	24.9	16.10 mWatts

**Results:** Calibration was successful.

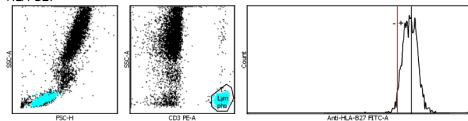
**Comments:**

**Figure 3** Exemple de BD<sup>®</sup> HLA-B27 Laboratory Report (rapport de laboratoire) généré par le logiciel BD FACSCanto<sup>™</sup> Clinical Software pour le système BD FACSCanto<sup>™</sup>

<b>D13</b>		
<b>4085 Rep1</b>	<b>V07300226</b>	
Director:	Panel:	HLA-B27
	Acquired:	06/01/2005 2:43:03 PM
	Analyzed:	06/01/2005 2:43:03 PM
	Bead Lot ID:	16036/141
	Reagent Lot ID:	17616:144
	Status:	OK
	Operator:	RD
	Reviewer:	
	Results:	01062005.csv
Column #1:	Column #2:	Column #3:
BD FACSCanto V07300226		
BD FACSCanto v.2.0		

**HLA-B27**

Total Events: 10108



Reagent Lot ID: 17616:144

Gated Events	2610
Preset HLA-B27 Marker	144
Sample HLA-B27 Median	166
Conclusion	HLA-B27 positive sample

**QC Messages**

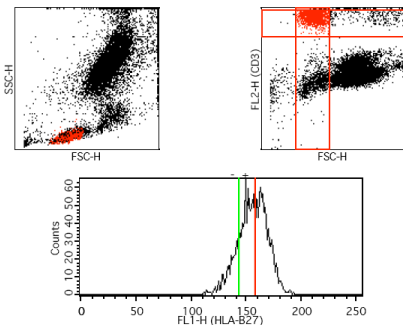
No quality control messages generated.

**Comments**

**Figure 4** Exemple de BD<sup>®</sup> HLA-B27 Laboratory Report (rapport de laboratoire) généré par le logiciel BD<sup>®</sup> HLA-B27 pour le système BD FACSCalibur<sup>TM</sup>

**BD**  
**HLA-B27 Laboratory Report**

Director: CW	Cytometer: FACSCalibur (E0344)
Operator: RS	Software: HLA-B27 v4.0
<hr/>	
Sample Name: HLA/42/T2/G5/L/C	
Sample ID: P30782	
<hr/>	
Date Acquired: Fri, Jul 15, 2005 7:59 PM	
Date Analyzed: Fri, Jul 15, 2005 7:59 PM	
Data File Name: HLA/42/T2/G5/L/C02.01	
Lab Report Name: HLA/42/T2/G5/L/C02.lab	
Bead Lot ID: 16036/141	
Reagent Lot ID: 17616:144	
Events Acquired: 15000	
<hr/>	
Gated Events: 1731	
Preset FL1 Marker: 144	Sample FL1 Median: 158
<b>Conclusion:</b> HLA-B27 positive sample	



Comments:

---



---



---



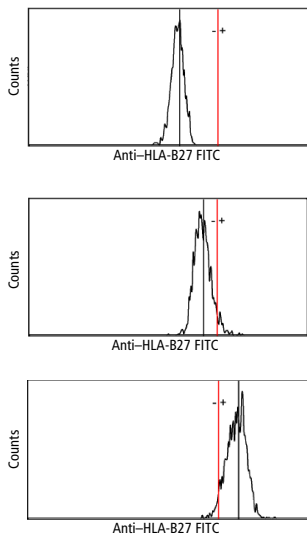
---



---

La Figure 5 présente des exemples d'échantillons positifs pour HLA-B27 (histogramme du bas) et négatifs pour HLA-B27 (histogrammes du haut et du milieu). L'échantillon du milieu est également négatif car la LMF est en dessous du marqueur de décision, mais il est plus brillant que l'échantillon de l'histogramme du haut. Il est plus brillant car l'anticorps Anti-HLA-B27-FITC affiche une certaine réactivité croisée avec d'autres types HLA, notamment HLA-B7.<sup>4,5</sup>

**Figure 5** Exemples d'échantillons négatifs pour HLA-B27 (haut et milieu) et positifs pour HLA-B27 (bas)



---

## 4. RÉACTIFS

### Réactifs fournis

En quantité suffisante pour réaliser 50 tests

Le BD<sup>®</sup> HLA-B27 Kit se compose d'un flacon contenant une combinaison d'anticorps monoclonaux de souris, Anti-HLA-B27, couplé avec FITC et CD3 couplé avec PE ; un flacon de concentré de BD<sup>®</sup> HLA-B27 Kit FACSTM Lysing Solution ; et un flacon de BD<sup>®</sup> HLA-B27 Kit Calibration Beads en quantité suffisante pour 10 étalonnages.

#### Réactif A, BD<sup>®</sup> HLA-B27 Kit Anti-HLA-B27/CD3

Le réactif A, en quantité suffisante pour 50 tests, est fourni en une solution saline tamponnée de 1,5 ml avec de la gélatine et 0,1 % d'azide de sodium. Il contient l'anti-HLA-B27 marqué par FITC, clone GS145.2 (IgG<sub>1</sub>, kappa),<sup>6</sup> pour l'identification de l'antigène HLA-B27 et CD3 marqué par PE, clone SK7 (IgG<sub>1</sub>, kappa),<sup>7-10</sup> pour l'identification des lymphocytes T. Conserver à une température comprise entre 2 °C et 8 °C.

#### Réactif B, BD<sup>®</sup> HLA-B27 Kit FACSTM Lysing Solution

Le réactif B (30 ml) contient la BD<sup>®</sup> HLA-B27 Kit FACSTM Lysing Solution 10X tamponnée avec moins de 50 % de diéthylèneglycol et moins de 15 % de formaldéhyde. Conserver à une température comprise entre 2 °C et 25 °C.

Pour utiliser le réactif, diluer à 1:10 avec de l'eau de qualité réactif à température ambiante (entre 20 °C et 25 °C). Lorsqu'elle est conservée dans un récipient en verre ou en polyéthylène haute densité (PEHD) à température ambiante, la solution préparée est stable pendant 1 mois.

## Réactif C, BD® HLA-B27 Kit Calibration Beads

Le réactif C, en quantité suffisante pour 10 étalonnages, est fourni en une solution saline tamponnée de 1,5 ml avec du Tween® 20, de la gélatine et 0,1 % d'azide de sodium. Les billes sont utilisées pour configurer le cytomètre, notamment pour le test BD® HLA-B27. Conserver à une température comprise entre 2 °C et 8 °C.

Les concentrations sont indiquées dans le tableau suivant :

Réactif	Concentration
CD3	4,2 µg/ml
BD® HLA-B27	5,0 µg/ml
Billes d'étalonnage	2,00 x 10 <sup>7</sup> billes/ml

## Précautions



**ATTENTION** Selon la loi fédérale américaine, ce dispositif ne peut être vendu que sur prescription d'un praticien diplômé.

**ATTENTION** L'opérateur ne doit pas modifier manuellement les paramètres de l'appareil une fois qu'ils ont été établis suivant les procédures de configuration. Pour plus d'informations, voir la section Cytométrie en flux.

- Réservé au diagnostic in vitro.
- À ne pas utiliser pour le typage de tissu.
- Conservés entre 2 °C et 8 °C, les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Ne pas utiliser après la date de péremption.
- Les réactifs ne doivent pas être congelés ni exposés à la lumière directe durant le stockage ou l'incubation avec des cellules. Conserver les flacons de réactif au sec.

- 
- Procéder au marquage dans les délais spécifiés à la section Prélèvement et préparation des échantillons. Conserver le sang à température ambiante (entre 20 °C et 25 °C) avant le marquage. Ne pas utiliser de cellules précédemment fixées. L'utilisation de durées ou de températures autres que celles spécifiées peut générer des résultats erronés. Des échantillons de sang réfrigérés avant le marquage peuvent donner des résultats aberrants.
  - Pour obtenir des résultats optimaux, analyser les échantillons marqués dans les 24 heures suivant le marquage.
  - Un changement d'aspect des réactifs, tel que précipité ou décoloration, indique une instabilité ou une détérioration. Dans ce cas, les réactifs ne doivent pas être utilisés.
  - Le réactif anticorps et les billes d'étalonnage contiennent de l'azide de sodium comme conservateur ; cependant, il convient d'éviter toute contamination microbienne susceptible de fausser les résultats.
  - Le réactif B contient 31,345 % de 2,2'-oxybiséthanol (diéthylèneglycol), numéro CAS 111-46-6 ; 9,77 % de formaldéhyde, numéro CAS 50-00-0 ; et 3,433 % de méthanol, numéro CAS 67-56-1. La solution de lyse est considérée comme dangereuse, conformément au Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (GHS).

Consulter le site [regdocs.bd.com](http://regdocs.bd.com) pour télécharger la fiche de données de sécurité.

	<b>Danger</b>
 	<p>H302+H312+H332 : Nocif en cas d'ingestion, de contact cutané ou d'inhalation.</p> <p>H315 : Provoque une irritation cutanée.</p> <p>H319 : Provoque une sévère irritation des yeux.</p> <p>H317 : Peut provoquer une allergie cutanée.</p> <p>H341 : Susceptible d'induire des anomalies génétiques.</p> <p>H350 : Peut provoquer le cancer.</p> <p>H371 : Risque présumé d'effets graves pour les organes.</p> <p>H335 : Peut irriter les voies respiratoires.</p> <p>H373 : Risque présumé d'effets graves pour les organes à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée.</p> <p>H402 : Nocif pour les organismes aquatiques.</p>
<b>Prévention</b>	<p>P280 : Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.</p> <p>P271 : Utiliser seulement en plein air ou dans un endroit bien ventilé.</p> <p>P264 : Se laver soigneusement après manipulation.</p> <p>P270 : Ne pas manger, boire ou fumer en manipulant ce produit.</p> <p>P272 : Les vêtements de travail contaminés ne devraient pas sortir du lieu de travail.</p> <p>P201 : Se procurer les instructions avant utilisation.</p> <p>P202 : Ne pas manipuler avant d'avoir lu et compris toutes les précautions de sécurité.</p> <p>P281 : Utiliser l'équipement de protection individuel requis.</p> <p>P260 : Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.</p> <p>P273 : Éviter le rejet dans l'environnement.</p>



<b>Intervention</b>	<p>P304+P340 : EN CAS D'INHALATION : Transporter la personne à l'extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer.</p> <p>P305+P351+P338 : EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.</p> <p>P337+P313 : Si l'irritation oculaire persiste : consulter un médecin.</p> <p>P302+P352 : EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : Laver abondamment à l'eau/...</p> <p>P333+P313 : En cas d'irritation ou d'éruption cutanée : consulter un médecin.</p> <p>P301+P312 : EN CAS D'INGESTION : Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise.</p> <p>P330 : Rincer la bouche.</p> <p>P312 : Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise.</p> <p>P321 : Traitement spécifique (voir sur cette étiquette).</p> <p>P363 : Laver les vêtements contaminés avant réutilisation.</p>
<b>Stockage</b>	<p>P405 : Garder sous clef.</p> <p>P403 : Stocker dans un endroit bien ventilé.</p> <p>P233 : Maintenir le récipient fermé de manière étanche.</p>
<b>Élimination</b>	<p>P501 : Éliminer le contenu/récipient dans une installation de traitement et d'élimination des déchets appropriée, conformément aux lois et réglementations en vigueur, ainsi qu'aux caractéristiques du produit au moment de l'élimination.</p>

- Tous les échantillons biologiques et les matières avec lesquels ils sont entrés en contact sont susceptibles de constituer un danger biologique. Ils doivent être manipulés comme des matières pouvant transmettre une infection<sup>11,12</sup> 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.
- Le test a montré que l'expression du BD<sup>®</sup> HLA-B27 diminue avec le temps dans les tubes de prélèvement sanguin de solution acide citrique-citrate-dextrose B (ACD-B). Cette diminution peut générer des résultats incorrects. Par conséquent, l'utilisation de tubes ACD-B n'est pas recommandée pour le prélèvement d'échantillons.

---

## Stockage et manipulation

- Conserver les réactifs A et C en position verticale entre 2 °C et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Conserver le réactif B, non dilué, entre 2 °C et 25 °C. Une fois dilué, conserver à température ambiante (entre 20 °C et 25 °C) au maximum un mois.
- Ne pas congeler les réactifs, ni les exposer à la lumière directe durant le stockage ou l'incubation avec des cellules. Conserver les flacons de réactif au sec.

## 5. APPAREIL

Pour de plus amples informations sur son utilisation, se reporter au mode d'emploi du produit.

### Système BD FACSCanto™ ou BD FACSCanto™ II

- Famille de cytomètres en flux BD FACSCanto™
- BD FACSCanto™ Clinical Software
- Module d'application BD® HLA-B27

### Système BD FACSCalibur™

- Cytomètre en flux BD FACSCalibur™
- Système de gestion des données BD FACStation™ (intégré au système BD FACSCalibur™)
- Logiciel BD® HLA-B27
- Logiciel BD FACSComp™

Toutes les caractéristiques des performances ont été obtenues en utilisant ces appareils et logiciels. D'autres systèmes peuvent comporter des caractéristiques différentes.

---

## 6. PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Prélever du sang de manière aseptique par ponction veineuse, en utilisant des BD Vacutainer® Blood Collection Tubes.<sup>13</sup> Un minimum de 1 ml de sang total est nécessaire pour cette procédure.

Le sang prélevé dans des tubes EDTA, d'héparine ou de solution ACD A (ACD-A) peut être conservé à température ambiante (entre 20 °C et 25 °C) pendant 48 heures maximum jusqu'à ce qu'il soit prêt pour le marquage. Une fois marqués, les échantillons sont stables pendant 24 heures maximum entre 2 °C et 8 °C.

### Interférences

Ne pas utiliser de cellules précédemment fixées et conservées. Des échantillons de leucocytes ou de sang total réfrigérés avant le marquage sont susceptibles de donner des résultats aberrants. Rejeter les échantillons hémolysés ou les échantillons dont le tube de prélèvement comporte moins de 1 ml de sang total.

## 7. PROCÉDURE

### Réactifs fournis

Voir les paragraphes Réactifs fournis et Précautions, section 4, Réactifs.

### Réactifs et matériels requis mais non fournis

- BD Vacutainer® EDTA Blood Collection Tubes ou équivalents
- Tubes à essai jetables en polystyrène Falcon de 12 x 75 mm ou équivalents
- Vortex
- Centrifugeuse faible vitesse (vitesse minimum 200g) avec rotor à godets oscillants et porte-tubes de 12 x 75 mm
- Pompe à vide
- Micropipette avec embouts
- Tampon phosphate salin 1X (PBS)

- 
- BD CellWASH™ (n° de référence 349524) ou tampon de lavage de solution saline à tampon phosphate (PBS) contenant de l'azide de sodium à 0,1 %

**REMARQUE** La solution BD CellWASH™ n'est pas disponible dans tous les pays.

- Solution de fixation (solution de paraformaldéhyde à 1 % [PFA] dans du PBS 1X avec 0,1 % d'azide de sodium)

**REMARQUE** Stocker entre 2 °C et 8 °C dans un flacon en verre ambré pendant 1 semaine maximum.

- Eau (distillée et désionisée) de qualité réactif
- BD FACSTo™ Sheath Fluid (n° de référence 342003) ou équivalent
- Pour le système BD FACSCanto™ ou BD FACSCanto™ II : BD FACSTo™ 7-Color Setup Beads (n° de référence 335775). Pour obtenir des instructions et des mises en garde, consulter le mode d'emploi.
- Pour le système BD FACSCalibur™ : BD Calibrite™ Beads (n° de référence 349502 ou 340486). Pour obtenir des instructions et des mises en garde, consulter le mode d'emploi.

### **Marquage et fixation des cellules**

La procédure suivante doit être réalisée à température ambiante (entre 20 °C et 25 °C) en utilisant des réactifs à température ambiante. Veiller à protéger les tubes de la lumière directe. Voir Précautions.

1. Pour chaque échantillon, étiqueter un tube de 12 x 75 mm avec le numéro d'identification de l'échantillon.
2. Verser 30 µl de réactif A dans le tube.
3. Pour chaque tube échantillon, utiliser un nouvel embout de micropipette et ajouter soigneusement 50 µl de sang total prélevé sur anticoagulant bien mélangé dans le fond de chacun des tubes.

---

Concentration de leucocytes recommandée : 3,5 à  $9,4 \times 10^3$  leucocytes/ $\mu\text{l}$ . Vortexer soigneusement à faible vitesse pendant 3 secondes et incubé pendant 15 à 20 minutes à température ambiante (entre 20 °C et 25 °C) dans l'obscurité.

**REMARQUE** Protéger les échantillons de la lumière directe pendant l'incubation et empêcher le sang de couler sur les parois du tube. Le sang total qui reste sur les parois du tube ne sera pas marqué par le réactif.

4. Diluer la BD<sup>®</sup> HLA-B27 Kit FACSTM Lysing Solution 10X à 1X en respectant les instructions de la section 4, Réactifs. Ajouter 2 ml de solution de lyse 1X à température ambiante (entre 20 °C et 25 °C) dans chaque tube. Vortexer soigneusement et immédiatement à faible vitesse pendant 3 secondes et incubé pendant 10 à 12 minutes à température ambiante (entre 20 °C et 25 °C) dans l'obscurité. Ne pas dépasser 12 minutes d'incubation.

**ATTENTION** Éviter une exposition prolongée des cellules aux réactifs lytiques qui pourraient détruire les leucocytes.

5. Immédiatement après l'incubation, centrifuger les tubes à 300g pendant 5 minutes à température ambiante (entre 20 °C et 25 °C).
6. Aspirer le surnageant, en laissant environ 50  $\mu\text{l}$  de liquide résiduel dans le tube pour éviter de perturber le culot.
7. Vortexer soigneusement les tubes à faible vitesse, afin de remettre en suspension le culot cellulaire dans le liquide résiduel. Ajouter 2 ml de solution BD CellWASH<sup>™</sup> ou de PBS contenant de l'azide de sodium à 0,1 % dans chaque tube. Vortexer soigneusement à faible vitesse pendant 3 secondes et centrifuger à 200g pendant 5 minutes à température ambiante (entre 20 °C et 25 °C).
8. Aspirer le surnageant, en laissant environ 50  $\mu\text{l}$  de liquide résiduel dans le tube pour éviter de perturber le culot.

9. Vortexer soigneusement le tube à faible vitesse, afin de remettre en suspension le culot cellulaire dans le liquide résiduel. Ajouter 0,25 ml de solution de 1 % de paraformaldéhyde dans du PBS 1X avec 0,1 % d'azide de sodium dans chaque tube et vortexer soigneusement à faible vitesse pendant 3 secondes. S'assurer que les cellules sont bien mélangées avec la solution de fixation. Fixer les échantillons pendant 30 minutes avant l'acquisition.
10. Les échantillons sont maintenant prêts à être analysés sur le cytomètre en flux. Boucher ou couvrir les tubes préparés et stocker entre 2 °C et 8 °C dans l'obscurité jusqu'à l'analyse par cytométrie. Analyser les cellules fixées dans les 24 heures suivant le marquage. Vortexer soigneusement les cellules, à faible vitesse, afin de diminuer les agrégats avant de les analyser sur le cytomètre en flux.

### **Cytométrie en flux**

Se reporter à la section Configuration du cytomètre en flux et aux modes d'emploi du logiciel et de l'appareil correspondants pour obtenir des instructions de configuration spécifiques. S'assurer que l'étalonnage du cytomètre avec les BD Calibrite™ Beads, les BD FACST™ 7-Color Setup Beads ou les BD® CS&T Beads remplit les critères de contrôle qualité de l'appareil le même jour avant d'effectuer la procédure d'étalonnage BD® HLA-B27.

Respecter les instructions suivantes pour l'analyse par cytométrie en flux. Voir aussi la section 5, Appareil.

### **Configuration BD® HLA-B27 pour tous les appareils pris en charge**

La configuration BD® HLA-B27 doit être exécutée tous les jours où des échantillons sont analysés. Préparer une aliquote fraîche de BD® HLA-B27 Calibration Beads chaque fois que la procédure de configuration suivante est réalisée. Diluer les billes juste avant la configuration.

1. Vortexer doucement et soigneusement le flacon de BD® HLA-B27 Calibration Beads.

- 
2. Ajouter 2 gouttes de billes à 1 ml de diluant BD FACSTFlow™ dans un tube à essai de 12 x 75 mm.
  3. Vortexer soigneusement la suspension de billes à faible vitesse pendant 3 secondes.
  4. Analyser les billes avec le logiciel BD FACSCComp™ sur le cytomètre en flux BD FACSCalibur™, avec le BD FACSCanto™ Clinical Software sur la famille de cytomètres en flux BD FACSCanto™.

Le taux d'événements doit être d'au moins 400 événements/s avant de poursuivre la configuration. Si le taux d'événements est inférieur à 400 événements/s, ajouter une autre goutte de billes au tube.

Le logiciel va générer un rapport pour confirmer la bonne configuration (voir la Figure 1 et la Figure 2).

**ATTENTION** Le non-respect de l'ensemble de la procédure de configuration peut générer des résultats erronés.

**ATTENTION** Ne pas modifier manuellement les paramètres de l'appareil une fois qu'ils ont été établis suivant ces procédures de configuration.

### **Acquisition et analyse des échantillons**

Procéder à l'acquisition de tous les échantillons sur le cytomètre en flux. Pour la famille de cytomètres en flux BD FACSCanto™, utiliser le BD FACSCanto™ Clinical Software. Pour le cytomètre en flux BD FACSCalibur™, procéder à l'acquisition des données à l'aide du logiciel BD® HLA-B27. Pour obtenir des instructions détaillées, se reporter au mode d'emploi du logiciel. Une fois l'acquisition terminée, chaque logiciel analyse automatiquement l'échantillon et génère un rapport de laboratoire indiquant les détails de l'analyse et si l'échantillon est positif ou négatif pour le HLA-B27.

---

## Contrôle qualité

Pour des résultats optimaux, BD demande l'application de la procédure de configuration décrite dans les manuels suivants :

- *BD® HLA-B27 Software Reference Manual* (Manuel de référence du logiciel BD® HLA-B27) (pour le cytomètre en flux BD FACSCalibur™)
- *BD® HLA-B27 Application Guide* (Guide de l'application BD® HLA-B27) (pour la famille de cytomètres en flux BD FACSCanto™)

Nous recommandons de marquer les échantillons de contrôle positifs pour HLA-B27 et négatifs pour HLA-B27 connus et de les utiliser comme contrôle de qualité du système *chaque fois* que le test BD® HLA-B27 est effectué. Les résultats des sujets positifs pour HLA-B27 et négatifs pour HLA-B27 sont illustrés à la Figure 5.

BD FACSCanto™ Clinical Software identifie les événements des lymphocytes T CD3<sup>+</sup>. Il doit y avoir une séparation adéquate (telle que déterminée par le logiciel) entre les populations CD3 positives et CD3 négatives. Si la fenêtre est mal positionnée, un message de CQ apparaît. Se reporter au manuel du logiciel pour plus d'informations.

Pour le cytomètre en flux BD FACSCalibur™, le logiciel correspondant utilise les critères suivants pour l'évaluation des graphes et l'analyse CQ des données.

- Un minimum de 2 % du total des événements doit concerner les lymphocytes T (événements FL2 brillants) pour permettre au logiciel de positionner la fenêtre sur le graphe FSC vs FL2.
- Il doit y avoir une séparation adéquate (telle que déterminée par le logiciel) entre les populations CD3 positives et CD3 négatives.

Si ces conditions ne sont pas remplies, un message d'erreur apparaît. Voir la section Résolution des problèmes pour plus d'informations. Si les critères de CQ ne sont pas remplis, les résultats générés par le test BD® HLA-B27 peuvent être suspects.



---

Observer le graphe diffraction vs CD3 PE (détecteur PE/FL2) pour vérifier que la fenêtre des lymphocytes T est correctement définie.

## 8. RÉSULTATS

Les systèmes de l'appareil BD affichent automatiquement des résultats pour l'expression de l'antigène HLA-B27 dans l'échantillon, comme indiqué à la Figure 3 et la Figure 4. L'échantillon est rapporté comme positif ou négatif pour HLA-B27.

## 9. LIMITATIONS

Les informations obtenues à partir du test BD® HLA-B27 doivent être combinées avec d'autres informations et interprétées par un médecin qualifié pour établir la présence ou l'absence d'états pathologiques spécifiques.

L'anti-HLA-B27 présente une réactivité croisée avec plusieurs des antigènes HLA-B, le plus souvent avec l'antigène HLA-B7.<sup>4,5</sup> La LMF pour les échantillons positifs pour HLA-B7 dans le détecteur FITC/FL1 peut alors se trouver dans la plage des échantillons positifs pour HLA-B27, générant ainsi des résultats faussement positifs.

Observer le graphe diffraction vs CD3 PE pour vérifier que la fenêtre des lymphocytes T est correctement définie. Si la fenêtre est mal positionnée sur la population de granulocytes, nous recommandons de tester de nouveau l'échantillon.

Les caractéristiques de performances de ce produit n'ont pas été établies sur des échantillons présentant des numérations de leucocytes non comprises dans la plage normale du laboratoire participant. La plage de concentration de leucocytes recommandée est comprise entre 3,5 et 9,4 x 10<sup>3</sup> leucocytes/µl.

## 10. CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES

### Systèmes BD FACSCanto™ et BD FACSCanto™ II

#### Concordance

Le site BD Biosciences a effectué une étude de concordance entre les systèmes BD FACSCanto™ II et BD FACSCanto™. La comparaison a porté sur un total de 125 échantillons, chaque prélèvement d'échantillon étant dupliqué sur les deux systèmes (tableau 1). La concordance est calculée comme suit :

$$100 \% \times \frac{(\text{positif sur les deux plateformes} + \text{négatif sur les deux plateformes})}{(\text{nombre total d'échantillons})}$$

Tableau 1 Étude de concordance<sup>a,b</sup>

Méthode de test (test BD <sup>®</sup> HLA-B27 sur le système BD FACSCanto™ II)	Méthode comparative (test BD <sup>®</sup> HLA-B27 sur le système BD FACSCanto™)		
	Positif	Négatif	Total
Positif	54,5	0	54,5
Négatif	0	70,5	70,5
Total	54,5	70,5	125

- a. La concordance globale est de 100 %.
- b. Les deux mesures répliquées d'un échantillon concordent entre les méthodes de test et de comparaison, mais sont en discordance à l'intérieur de la méthode elle-même (un réplikat positif et un réplikat négatif sur chaque système sur deux canaux).

Un laboratoire de référence a effectué une étude de concordance entre les systèmes BD FACSCanto™ et BD FACSCalibur™. Un total de 397 échantillons a été comparé, parmi lesquels 323 échantillons étaient négatifs pour l'antigène HLA-B27 et 74 échantillons étaient positifs (tableau 2). Aucun échantillon discordant n'a été détecté. La concordance est calculée comme suit :

$$100 \% \times \frac{(\text{positif sur les deux plateformes} + \text{négatif sur les deux plateformes})}{(\text{nombre total d'échantillons})}$$

**Tableau 2 Étude de concordance<sup>a,b</sup>**

Méthode de test (test BD <sup>®</sup> HLA-B27 sur le système BD FACSCanto™)	Méthode comparative (test BD <sup>®</sup> HLA-B27 sur le système BD FACSCalibur™)		
	Positif	Négatif	Total
Positif	74	0	74
Négatif	0	323	323
Total	74	323	397

a. La concordance globale est de 100 %.

b. Résultats calculés en fonction d'un intervalle de confiance inférieur à 95 % = concordance 99 %

## Précision

Une étude portant sur dix échantillons, cinq positifs et cinq négatifs pour l'antigène HLA-B27, a permis d'évaluer la précision du système BD FACSCanto™ II. Les échantillons ont été analysés en double pendant deux jours, à raison de deux acquisitions par jour, sur trois appareils et par trois opérateurs. Pour chacune des variables, l'écart type (ET) pour la moyenne des valeurs pour la LMF de HLA-B27 FITC a été calculé. Voir tableau 3.

**Tableau 3 Étude sur la précision - Résultats généraux**

<b>Précision</b>	<b>ET de la LMF</b>
Intra-analyse	0,62
Inter-analyses	0,99
Entre jours	0,54
Total pour le système	1,18

Une étude portant sur dix échantillons, cinq positifs et cinq négatifs pour l'antigène HLA-B27, a permis d'évaluer la précision du système BD FACSCanto™. Les échantillons ont été analysés en double pendant deux jours, à raison de deux acquisitions par jour, sur trois appareils BD FACSCanto™ et par trois opérateurs. L'écart type (ET) pour la moyenne des valeurs pour la LMF (log mean fluorescence) de HLA-B27 FITC a été calculé pour chacune des variables (tableau 4).

**Tableau 4 Étude sur la précision - Résultats généraux**

<b>Précision</b>	<b>ET de la LMF</b>
Intra-analyse	0,7
Inter-appareils	1,3
Entre jours	0,8
Total pour le système	1,5

## Système BD FACSCalibur™

Les performances du test BD® HLA-B27 sur le système BD FACScan™ ont été établies par des tests effectués dans trois centres cliniques européens et dans des laboratoires BD Biosciences à Erembodegem, en Belgique et à San Jose, en Californie, aux États-Unis. Une étude interne a montré l'équivalence du système BD FACSCalibur™ avec le système BD FACScan™.

### Test BD® HLA-B27 par rapport aux méthodes comparatives

Dans ces études, les échantillons de sang total lysés provenant de 1 418 sujets, notamment 258 sujets positifs pour HLA-B27, ont été analysés sur le système BD FACScan™, à l'aide du test BD® HLA-B27 et de la méthode de microcytotoxicité (tableau 5). La concordance est calculée comme suit :

$$100 \% \times \frac{(\text{positif sur les deux plateformes} + \text{négatif sur les deux plateformes})}{(\text{nombre total d'échantillons})}$$

**Tableau 5** Test BD® HLA-B27 par rapport à la méthode comparative pour la validation du marqueur HLA-B27<sup>a</sup>

Méthode de test (test BD® HLA-B27 sur le système BD FACScan™)	Méthode comparative (méthode de microcytotoxicité)		
	Positif	Négatif	Total
Positif	258	30	288
Négatif	0	1 130	1 130
Total	258	1 160	1 418

a. La concordance globale est de 97,9 %.

---

### Reproductibilité intra-échantillon

Les échantillons de sang total lysés de chacun des cinq individus positifs pour HLA-B27, des cinq individus positifs pour HLA-B7/négatifs pour HLA-B27 et des cinq individus négatifs pour HLA-B27/négatifs pour HLA-B7 ont été obtenus. Chaque échantillon a été divisé en trois parties aliquotes. Chaque partie aliquote a été marquée avec le réactif Anti-HLA-B27 FITC/CD3 PE, lysée, lavée et fixée dans les 6 heures suivant le prélèvement. Une analyse cytométrique a été effectuée sur le cytomètre en flux BD FACScan™ dans les 8 heures suivant le marquage. La variabilité intra-échantillon observée n'a pas altéré les déterminations pour la présence ou l'absence de l'antigène HLA-B27. Les résultats ont démontré une reproductibilité intra-échantillon acceptable.

### Reproductibilité entre appareils

Des échantillons sanguins provenant de deux sujets positifs pour HLA-B27 et de deux sujets négatifs pour HLA-B27 ont été obtenus, aliquotés (trois fois), marqués avec le réactif Anti-HLA-B27 FITC/CD3 PE, lysés, lavés et fixés dans les 6 heures suivant le prélèvement. Une analyse cytométrique a été effectuée sur trois cytomètres en flux BD FACScan™ au sein du même laboratoire dans les 8 heures suivant le marquage. Des cytomètres en flux ont été configurés à l'aide d'une dilution fraîche de BD Calibrite™ Beads avec le logiciel AutoComp™ et étalonnés à l'aide d'une dilution fraîche de billes d'étalonnage HLA-B27 pour le paramètre FL1 et du logiciel BD® HLA-B27 avant de procéder à l'acquisition de chaque échantillon marqué. Aucune différence n'a été observée entre les appareils dans la détermination de la présence ou de l'absence de l'antigène HLA-B27.

### Reproductibilité inter-laboratoire

Des échantillons provenant de 1 418 sujets, notamment 258 sujets positifs pour HLA-B27, ont été évalués dans trois centres européens à Bremen, en Allemagne, à Gent, en Belgique et à Strasbourg, en France.

---

Dans ces centres, les populations positives pour HLA-B27 ont été testées pour évaluer la concordance des valeurs d'intensité de fluorescence moyenne (IFM) par cytométrie en flux. Dans la mesure où la procédure d'analyse requiert une valeur de marqueur spécifique au lot prédéterminée, séparant les résultats positifs des résultats négatifs, la stabilité de l'IFM d'un échantillon marqué est critique pour la reproductibilité. Les déterminations se sont avérées similaires d'un centre à l'autre d'après des estimations de moyenne et d'écart type de l'IFM des échantillons positifs pour HLA-B27 pour les trois centres.

#### Reproductibilité d'un jour à l'autre

La reproductibilité d'un jour à l'autre (longitudinale) a été évaluée dans le centre de Bremen, en Allemagne. Des échantillons de sang ont été prélevés sur cinq donneurs positifs pour HLA-B27, cinq donneurs négatifs pour HLA-B27/positifs pour HLA-B7 et cinq donneurs négatifs pour HLA-B27/négatifs pour HLA-B7. Des échantillons de chaque donneur ont été collectés, puis analysés sur trois jours distincts pour évaluer la variabilité longitudinale de ce test.

Les résultats ont démontré une reproductibilité d'un jour à l'autre acceptable. Aucune variabilité observée dans les échantillons de donneur n'a altéré les déterminations pour la présence ou l'absence de l'antigène HLA-B27.

#### Concentration des leucocytes

Tous les lots du réactif BD<sup>®</sup> HLA-B27 sont testés par rapport aux suspensions cellulaires (échantillon de sang total) pour garantir des performances optimales à 50 µl de sang total. Pour cette étude, la plage normale était comprise entre  $3,5 \times 10^3$  et  $9,4 \times 10^3$  leucocytes/µl. Les résultats se sont avérés précis entre  $3,5 \times 10^3$  et  $9,4 \times 10^3$  leucocytes/µl.

---

Les échantillons de sang ont été prélevés chez quatre donneurs positifs pour HLA-B27. Pour valider le fait qu'un échantillon de sang avec une numération totale de leucocytes dans la plage de concentration normale de  $3,5$  à  $9,4 \times 10^3$  leucocytes/ $\mu\text{l}$  produirait des résultats précis et reproductibles, une plage de concentrations a été testée entre 100 leucocytes/ $\mu\text{l}$  et  $3,3 \times 10^5$  leucocytes/ $\mu\text{l}$  de chaque échantillon et comparée au résultat pour l'échantillon de sang total de ce donneur. Tous les échantillons ont été testés positifs dans la plage de concentration entre 100 leucocytes/ $\mu\text{l}$  et  $4,6 \times 10^4$  leucocytes/ $\mu\text{l}$ . Les résultats valident l'exactitude dans la plage normale de numérations de leucocytes périphériques.

### **Stabilité du sang total et stabilité du sang marqué**

Systèmes BD FACSCanto™ et BD FACSCalibur™

Une étude a été réalisée sur les systèmes BD FACSCanto™ et BD FACSCalibur™ avec 30 donneurs (11 d'entre eux étaient positifs) à l'aide des tubes de prélèvement de sang EDTA et ACD-A. Les résultats ont montré que les échantillons EDTA et ACD-A conservés à température ambiante (entre 20 °C et 25 °C) étaient stables pendant un maximum de 48 heures avant le marquage. Une fois marqués, les échantillons restaient stables pendant 24 heures maximum à une température comprise entre 2 °C et 8 °C. Le test a montré que l'expression du HLA-B27 diminue avec le temps dans les tubes de prélèvement sanguin ACD-B, ce qui pourrait générer des résultats incorrects. Par conséquent, l'utilisation de tubes ACD-B n'est pas recommandée pour le prélèvement d'échantillons.

Une deuxième étude a été réalisée sur le système BD FACSCanto™ avec 16 donneurs (cinq d'entre eux étaient positifs) à l'aide des tubes de prélèvement de sang EDTA et héparine. Les résultats ont montré que les échantillons EDTA et héparine conservés à température ambiante (entre 20 °C et 25 °C) étaient stables pendant un maximum de 48 heures avant le marquage. Une fois marqués, les échantillons



---

restaient stables pendant 24 heures maximum à une température comprise entre 2 °C et 8 °C.

Ces études montrent que l'utilisation d'EDTA, d'héparine et d'ACD-A comme anticoagulants produit des résultats équivalents sur les deux plateformes.

### **Système BD FACScan™**

Une étude a été réalisée sur le système BD FACScan™ avec des échantillons de dix donneurs (cinq d'entre eux étaient positifs) collectés dans des tubes de prélèvement de sang EDTA, héparine ou citrate-phosphate-dextrose (CPD). Les résultats ont montré que les échantillons EDTA, héparine et CPD conservés à température ambiante (20 °C à 25 °C) étaient stables pendant un maximum de 24 heures avant le marquage. Une fois marqués, les échantillons restaient stables pendant 24 heures maximum à une température comprise entre 2 °C et 8 °C.

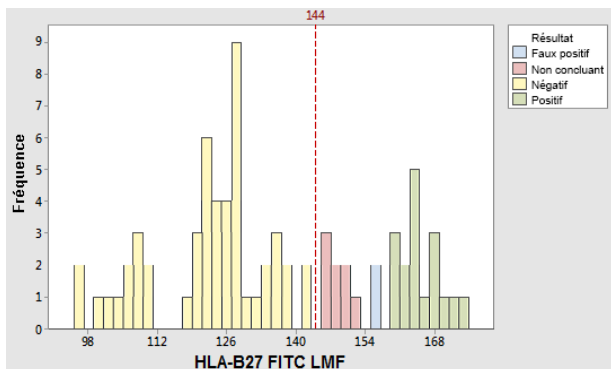
### **Caractérisation de la réactivité croisée**

L'anticorps Anti-HLA-B27, clone GS145.2, utilisé dans le test BD® HLA-B27, s'est avéré présenter une réactivité croisée, le plus souvent avec le HLA-B7.<sup>4</sup> La LMF de certains échantillons ayant présenté une réactivité croisée peut se trouver du côté positif du marqueur de décision, générant ainsi des résultats faussement positifs.<sup>3-5</sup>

Une étude a été réalisée pour caractériser cette réactivité croisée. Elle a permis de comparer les résultats obtenus avec le réactif HLA-B27 avec ceux obtenus en utilisant les méthodes de cytotoxicité ou de test moléculaire. Soixante-dix-sept échantillons ont été marqués en trois exemplaires et acquis chacun par plusieurs opérateurs, sur deux appareils BD FACSCanto™. Les résultats sont présentés dans la figure 6. Les dix-sept échantillons positifs pour HLA-B27 se trouvaient au-dessus du marqueur de décision plus 10 canaux (LMF canal 154). Cinquante échantillons négatifs pour HLA-B27 se trouvaient au-dessous du marqueur de décision (LMF canal 144). Huit échantillons

négatifs pour HLA-B27 étaient compris entre 144 et 154 LMF. Deux échantillons négatifs pour HLA-B27 se trouvaient au-dessus de 154 LMF. D'après notre étude et les données issues de la littérature,<sup>4</sup> une majorité d'échantillons présentant une réaction croisée située du côté positif du marqueur de décision (LMF canal 144) se trouvait entre 144 et 154 LMF. Cette zone est appelée zone grise pour les systèmes BD FACSCalibur™ et BD FACSCanto™. Les résultats inclus dans cette zone doivent être confirmés par une autre méthode. D'autres investigateurs et nous-mêmes avons observé un petit nombre d'échantillons négatifs pour HLA-B27 avec un LMF situé au-dessus de cette zone grise, entraînant donc la production de résultats faussement positifs. Étant donné que la prévalence et la distribution de la réactivité croisée de l'antigène HLA-B peuvent varier,<sup>3-5</sup> nous recommandons aux laboratoires de confirmer cette zone grise (échantillons non concluants) en réalisant leurs propres études.

**Figure 6** Caractérisation de la réactivité croisée



## RÉSOLUTION DES PROBLÈMES

Problème	Causes possibles	Solutions préconisées
Aucune fenêtre acceptable trouvée	Moins de 2 % des événements sont des lymphocytes T, pour les raisons éventuelles suivantes :	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Paramètres de l'appareil incorrects</li> </ul>	Vérifier que tous les paramètres de l'appareil sont conformes au rapport de configuration actuel.
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lyse incomplète des érythrocytes</li> </ul>	Vérifier que toutes les étapes de la procédure ont été respectées. Voir le point 4 de la section Marquage et fixation des cellules.
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Réactifs utilisés incorrects</li> </ul>	Vérifier que des réactifs corrects sont utilisés. Préparer un échantillon frais.
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Panne de l'appareil</li> </ul>	Réétalonner l'appareil.
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Trop peu de lymphocytes T acquis</li> </ul>	Acquérir plus d'événements. Changer les critères d'arrêt du logiciel, si nécessaire.
	L'écart est inapproprié entre les populations CD3 <sup>+</sup> et CD3 <sup>-</sup> pour les raisons suivantes :	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Préparation des échantillons incorrecte</li> </ul>	Préparer un échantillon frais.
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Échantillon de sang trop vieux (voir la section Prélèvement et préparation des échantillons)</li> </ul>	Prélever un échantillon de sang frais sur le sujet et procéder à un nouveau marquage.
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Préparation marquée trop ancienne (&gt; 24 heures après le marquage)</li> </ul>	Préparer et marquer des échantillons frais. Procéder à l'analyse dans les 24 heures suivant le marquage.

<b>Problème</b>	<b>Causes possibles</b>	<b>Solutions préconisées</b>
	Réactif périmé ou non utilisé conformément aux instructions	Vérifier la date de péremption du réactif. S'assurer que le réactif a été conservé et manipulé conformément aux instructions indiquées dans le mode d'emploi.
	Configuration de l'appareil incorrecte	Vérifier que tous les paramètres de l'appareil sont conformes au rapport de configuration actuel. Vérifier que le suffixe des BD <sup>®</sup> HLA-B27 Calibration Beads a été correctement saisi.
Échec des échantillons de contrôle	Configuration non effectuée	Procéder à la configuration de l'appareil.
	Préparation des échantillons incorrecte	Préparer un échantillon frais.
	Saisie incorrecte des suffixes de billes ou de réactifs (ou les deux)	Saisir de nouveau les bons chiffres du suffixe et redéfinir la configuration de BD <sup>®</sup> HLA-B27.

## **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 INDIQUÉS 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-CONTREFAÇON. LA RESPONSABILITÉ DE BD SE LIMITE 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

- 1 Dausset J. The major histocompatibility complex in man. *Science*. 1981;213:1469-1474.
- 2 Lopez-Larrea C, Gonzalez-Roces S, Alvarez V. HLA-B27 structure, function, and disease association. *Curr Opin Rheumatol*. 1996;8:296-308.
- 3 Seipp MT, Erali M, Wies RL, Wittwer C. HLA-B27 typing: evaluation of an allele-specific PCR melting assay and two flow cytometric antigen assays. *Cytometry B Clin Cytom*. 2005;63:10-15.
- 4 Levering WH, Wind H, Sintnicolaas K, Hooijkaas H, Gratama JW. Flow cytometric HLA-B27 screening: cross-reactivity patterns of commercially available anti-HLA-B27 monoclonal antibodies with other HLA-B antigens. *Cytometry B Clin Cytom*. 2003;54:28-38.
- 5 Johnson J, Garbutt J, Nelson KA. A monoclonal antibody specific for HLA-B27. *Hum Immunol*. 1985;14:134-135.
- 6 Taurog JD, el-Zaatari FA. In vitro mutagenesis of HLA-B27. Substitution of an unpaired cysteine residue in the alpha 1 domain causes loss of antibody-defined epitopes. *J Clin Invest*. 1988;82:987-992.
- 7 Haynes BF. Summary of T cell studies performed during the Second International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986;1:3-30.
- 8 Ledbetter JA, Evans RL, Lipinski M, Cunningham-Rundles C, Good RA, Herzenberg LA. Evolutionary conservation of surface molecules that distinguish T-lymphocyte helper/inducer and cytotoxic/suppressor subpopulations in mouse and man. *J Exp Med*. 1981;153:310-323.
- 9 Kan EA, Wang CY, Wang LC, Evans RL. Noncovalently bonded subunits of 22 and 28 kd are rapidly internalized by T cells reacted with Anti-Leu-4 antibody. *J Immunol*. 1983;131:536-539.
- 10 Knowles RW. Immunochemical analysis of the T cell-specific antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986;1:259-288.
- 11 *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Fourth Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014. CLSI document M29-A4.
- 12 Centers for Disease Control (CDC). Update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR*. 1988;37:377-388.
- 13 *Collection of Diagnostic Venous Blood Specimens; Approved Standard—Seventh Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017. CLSI document GP41-Ed7.

---

## **MARQUES COMMERCIALES**

BD, le logo BD, Calibrite, CellWASH, FACS, FACSCalibur, FACScan, FACSCanto, FACSComp, FACSFlow, FACSort, FACStation et Vacutainer sont des marques commerciales de Becton, Dickinson and Company ou ses filiales. Toutes les autres marques commerciales sont la propriété de leurs détenteurs respectifs. © 2021 BD. Tous droits réservés.

# GLOSSAIRE DES SYMBOLES

## GLOSSAIRE DES SYMBOLES [L006715(06) 2021-08]

Certains symboles répertoriés ci-dessous peuvent ne pas s'appliquer à ce produit.

Clients aux États-Unis seulement : Pour le glossaire des symboles, visiter le site [bd.com/symbols-glossary](http://bd.com/symbols-glossary)

Symbole	Signification	Symbole	Signification
	Fabricant		Numéro du patient
	Représentant autorisé dans la Communauté européenne		Vers le haut
	Représentant autorisé en Suisse		Ne pas remplir
	Date de fabrication		Système de barrière stérile unique
	Date de péremption		Contient des phtalates ou présence de phtalates : combinaison de phtalate de bis(2-éthylhexyle) (DEHP) et de phtalate de benzyle et de butyle (BBP)
	Code du lot		Collecter séparément
	Numéro de référence		Indique une collecte séparée obligatoire pour les déchets d'équipements électriques et électroniques.
	Numéro de série		Marquage CE : atteste de la conformité technique européenne
	Stérile		Dispositif de diagnostic près du patient
	Stérilisé à l'azide de techniques de traitement azotiques		Dispositif d'autodiagnostic
	Stérilisé avec de l'oxyde d'éthylène		Ceci s'applique uniquement aux États-Unis. « Attention : la loi fédérale limite la vente de cet appareil par ou sur ordonnance d'un praticien agréé. »
	Stérilisé par irradiation		Pays de fabrication
	Stérilisé à la vapeur ou à la chaleur sèche		« CC » est remplacé par le code du pays à deux lettres ou à trois lettres.
	Ne pas restituer		Heure du prélèvement
	Non stérile		Découper
	Ne pas utiliser si l'emballage est endommagé ; consulter le mode d'emploi		Découler ici
	Circuit de passage des liquides stérile		Date du prélèvement
	Circuit de passage des liquides stérile (oxyde d'éthylène)		Conservé à l'abri de la lumière
	Circuit de passage des liquides stérile (irradiation)		Produit de l'hydrogène gazeux
	Fragile, manipuler avec précaution		Percussion
	Conservé à l'abri de la lumière du soleil		Numéro de séquence initial de la galerie
	Garder au sec		Numéro de séquence final de la galerie
	Limite inférieure de température		Numéro de séquence interne
	Limite supérieure de température		Dispositif médical
	Limite de température		Contient des substances dangereuses
	Limite d'humidité		Marque de conformité ukrainienne
	Risques biologiques		Conforme aux exigences de la FCC selon la norme 21 CFR, partie 15
	Ne pas réutiliser		Certification UL du produit pour les États-Unis et le Canada
	Consulter le mode d'emploi ou le mode d'emploi électronique		Identifiant unique du dispositif
	Attention		
	Contient ou présence de latex de caoutchouc naturel		
	Dispositif médical de diagnostic in vitro		
	Contrôle négatif		
	Contrôle positif		
	Contenu suffisant pour <math>n</math> tests		
	Pour l'évaluation des performances DEV uniquement		
	Apyrogène		

---

## COORDONNÉES



**Becton, Dickinson and Company**  
**BD Biosciences**  
2350 Qume Drive  
San Jose, CA 95131 USA

Australian and New Zealand  
Distributors:

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

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

Service et assistance technique :  
contacter votre représentant local  
de BD ou consulter le site  
[bdbiosciences.com](http://bdbiosciences.com).

[ClinicalApplications@bd.com](mailto:ClinicalApplications@bd.com)



[eifu.bd.com](http://eifu.bd.com)