

## EasyLyse™ Erythrocyte-Lysing Reagent Nr kat. S2364

### Przeznaczenie

Do badań diagnostycznych *in vitro*.

Odczynnik EasyLyse™ jest przeznaczony do stosowania w cytometrii przepływowej. EasyLyse™ jest buforowanym chlorkiem amonowym do lizy krwinek czerwonych.

### Wstęp

Odczynnik EasyLyse™ zapewnia całkowitą, łagodną lizę erytrocytów po znakowaniu immunofluorescencyjnym komórek krwi pełnej, krwi pępowinowej lub próbek z leukaferazy, przeprowadzanym przed badaniem w cytometrze przepływowym (1). Dzięki właściwościom optycznym EasyLyse™ w większości przypadków nie ma potrzeby odwirowywania z próbki pozostałości rozpadu krwinek czerwonych, dzięki czemu odczynnik nadaje się zarówno do barwienia „z płukaniem”, jak i „bez płukania”. Odczynnik nie zawiera środka utrwalającego.

### Odczynnik dostarczony

EasyLyse™ dostarczany jest w 6 fiolkach po 5 mL **20-krotnie stężonego** roztworu. Jedna fiołka wystarcza do przeprowadzenia 50 oznaczeń (2 mL rozcieńczonego odczynnika na oznaczenie).

### Przechowywanie

Nierozcieńczony odczynnik przechowywać w temperaturze 2–8°C. Nie używać po upływie daty ważności podanej na etykiecie fiołki. Po otwarciu fiołki odczynnik zachowuje stabilność przez cztery miesiące w temperaturze 2–8°C. Nieużywany odczynnik przechowywać w szczelnie zamkniętej fiołce, ponieważ kontakt z powietrzem może skracać dopuszczalny okres przechowywania. Po rozcieńczeniu produkt przechowywany w temperaturze 2–25°C pozostaje stabilny przez 20 dni.

Jeśli produkt jest przechowywany w innych warunkach niż podane powyżej, użytkownik musi zweryfikować te warunki.

UWAGA: Podczas przechowywania może wzrosnąć pH odczynnika, co może wpływać na pozycję komórek na wykresie FSC/SSC. Wartość pH rozcieńczonego odczynnika powinna wynosić od 7,0 do 7,4. W przypadku wartości pH powyżej 7,4 należy je obniżyć do 7,2, dodając 0,2 mol/L  $\text{KHCO}_3$ .

### Środki ostrożności

1. Do stosowania przez wyszkolony personel.
2. Produkt zawiera azyd sodu ( $\text{NaN}_3$ ), substancję chemiczną silnie toksyczną w czystej postaci. Azyd sodu, zastosowany w produkcie w stężeniu, które nie jest sklasyfikowane jako niebezpieczne, może reagować z elementami kanalizacji wykonanymi z ołowiu i miedzi, powodując nagromadzenie silnie wybuchowych azydów metali. Po usunięciu spłukać dużą ilością wody, aby zapobiec nagromadzeniu się azydu metalu w kanalizacji.
3. Niniejszy produkt zawiera  $\geq 10$ – $< 25\%$  chlorek amonu,  $\geq 2$ – $< 3\%$  4-(2-hydroksyetylo) piperazyn-1-ylethansulfonsyre i  $\geq 0,1$ – $< 0,2\%$  azyd sodu. Produkt jest oznaczony:



#### Uwaga

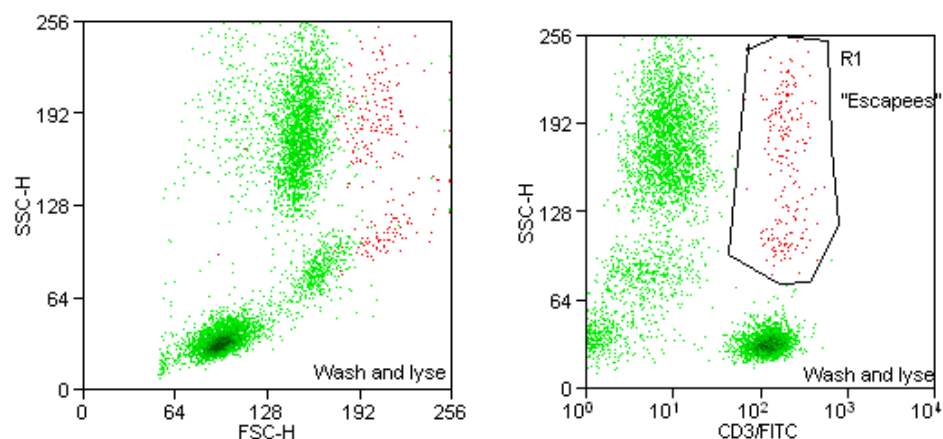
H319	Działa drażniąco na oczy.
H317	Może powodować reakcję alergiczną skóry.
P280	Stosować rękawice ochronne. Nosić okulary ochronne lub ochronę twarzy.
P261	Unikać wdychania pary.
P305 + P351 + P338	W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.
P501	Zawartość pojemnika jak i pojemnik utylizować zgodnie z lokalnymi, regionalnymi, narodowymi oraz międzynarodowymi przepisami.

### „Uciekinierzy”

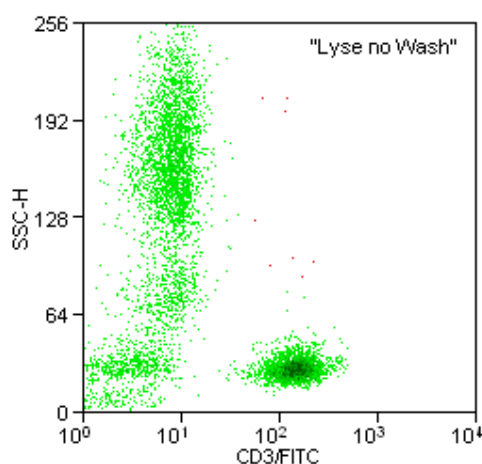
Gdy odczynnik EasyLyse™ używany jest w protokole „lizy i płukania”, limfocyty mogą tworzyć z płytkami krwi i monocytami agregaty, zwane także „uciekierami”. Agregaty charakteryzują się silniejszym rozpraszaniem światła w przód (FSC) i rozpraszaniem bocznym (SSC) niż zawiesiny pojedynczych komórek. Jeśli podczas analizy danych zastosowane zostanie bramkowanie FSC/SSC, agregaty komórek będą uciekały poza bramkę (2). Na stopień nasilenia agregacji ma wpływ kilka parametrów opisanych przez Gratama i in. (2). Po dokładniejszym zbadaniu tego zjawiska stwierdziliśmy, że użycie odczynnika powodującego lizę bez środka utrwalającego w procedurze „lizy i płukania” może powodować zjawisko ucieczki.

Aby uniknąć agregacji komórek zaleca się używanie odczynnika EasyLyse™ w protokole „bez płukania”.





Rysunek 1. Przykład „zjawiska ucieczki”. Krew prawidłowa została wybarwiona Anti-CD3/FITC (nr kat. Dako F0818), zlizowana odczynnikiem EasyLyse™ i dwukrotnie odwirowana. Właściwości FSC i SSC niektórych komórek CD3-dodatnich uległy zmianie w wyniku zagregowania z aktywowanymi monocytami i granulocytami. Jeśli wokół limfocytów zostanie zdefiniowana bramka, odpowiednie zdarzenia dodatnie „uciekają”.



Rysunek 2. Wykres punktowy próbki krwi wybarwionej Anti-CD3/FITC i zlizowanej odczynnikiem EasyLyse™ bez odwirowania. Nie występuje zjawisko ucieczki.

## PROCEDURA LIZY

### Procedura

Lizę należy przeprowadzać w temperaturze pokojowej.

1. Rozcieńczyć odpowiednią ilość S2364 1+19 wodą demineralizowaną<sup>1</sup> o temperaturze pokojowej. Alternatywnie wymieszać zawartość jednej fiołki (5 mL) S2364 z 95 mL wody demineralizowanej o temperaturze pokojowej.
2. Jeśli planuje się znakowanie komórek przeciwciałem, przed rozpoczęciem lizy inkubować próbkę<sup>2</sup> z przeciwciałem skoniugowanym z fluorochromem.
3. Bezpośrednio po zakończeniu inkubacji z przeciwciałem dodać 2 mL rozcieńczonego odczynnika wywołującego lizę do 100 µL próbki (np. krwi) i natychmiast wymieszać.

Postępować dalej w sposób opisany w części A: Procedura lizy bez płukania, lub B: Procedura lizy i płukania.

#### A: Procedura lizy bez płukania

4. Inkubować próbkę z odczynnikiem wywołującym lizę przez 10–15 minut w temperaturze pokojowej, a następnie oznaczyć w cytometrze przepływowym<sup>3</sup>. Jeśli test nie zostanie wykonany w ciągu 45 minut, próbkę należy umieścić w lodzie i oznaczyć w ciągu 2 godzin.

#### B: Procedura lizy i płukania

4. Inkubować próbkę z odczynnikiem wywołującym lizę przez 15 minut w temperaturze pokojowej.
5. Odwirować próbkę z przyspieszeniem 300 × g przez 5 minut i oddzielić nadsącz.
6. Przepłukać próbkę 2 mL soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (PBS).
7. Powtórzyć czynności z punktu 5.
8. Dodać do próbki odpowiednią ilość PBS.
9. Oznaczyć próbkę w cytometrze przepływowym<sup>3</sup>.

#### Uwagi dotyczące procedury:

1. Do rozcieńczania stosować wyłącznie wodę demineralizowaną. Woda z kranu nie jest chemicznie zgodna z odczynnikami wywołującymi lizę.
2. Zalecanym środkiem przeciwwkrzepliwym jest EDTA. Można również stosować heparynę i cytrynian, ale niekiedy środki te są przyczyną większej ilości zanieczyszczeń w próbce.












3. Równocześnie z analizą próbek pacjentów zaleca się oznaczanie próbek prawidłowych, aby zweryfikować poprawność przeprowadzenia procesu lizy.

## Piśmiennictwo

1. Muirhead KA, Wallace PK, Schmitt TC, Frescatore RL, Franco JA, Horan PK. Methodological considerations for implementation of lymphocyte subset analysis in a clinical reference laboratory. Clinical Cytometry. Ann NY Acad Sci 1986; 468:113–27.
2. Gratama JW, van der Linden R, van der Holt B, Bolhuis RLH, van de Winkel JGJ. Analysis of factors contributing to the formation of mononuclear cell aggregates ("Escapees") in flow cytometric immunophenotyping. Cytometry 1997;29:250-60.

## Objaśnienia symboli

 Numer katalogowy	 Ograniczenie temperatury	 Producent
 Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro	 Numer partii	 Piktogram GHS ( <i>dział środki ostrożności</i> )
 Sprawdź w instrukcji stosowania	 Zużyć przed	 Autoryzowany przedstawiciel w Unii Europejskiej



Agilent Technologies Singapore (International) Pte Ltd.  
No. 1 Yishun Avenue 7  
Singapore, 768923  
Tel. +44 161 492 7050  
www.agilent.com

Wersja 11.2020