



BD FACS™ Lysing Solution

100 ml— N° de référence 349202

4/2019

23-3203-09

IVD



BD, le logo BD, FACS, Simultest et Tritest sont des marques commerciales de Becton, Dickinson and Company ou de ses filiales. Toutes les autres marques commerciales sont la propriété de leurs détenteurs respectifs. © 2019 BD.
Tous droits réservés.



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



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

BD Biosciences
European Customer Support
Tel +32.2.400.98.95
Fax +32.2.401.70.94
help.biosciences@europe.bd.com

Australian and New Zealand Distributors:
Becton Dickinson Pty Ltd
4 Research Park Drive,
Macquarie University Research Park,
North Ryde NSW 2113, Australia

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

Symbols glossary website:
<http://www.bd.com/symbols-glossary>

bdbiosciences.com
ClinicalApplications@bd.com

1. UTILISATION

La solution BD FACS™ Lysing Solution est conçue pour lyser les globules rouges après avoir marqué par immunofluorescence directe des cellules de sang périphérique humain avec des anticorps monoclonaux avant de procéder à une analyse par cytométrie en flux.

La solution BD FACS Lysing Solution peut être utilisée avec des réactifs tels que BD Tritest™ ou BD Simultest™ et un cytomètre en flux correctement équipé. Elle peut être utilisée avec des procédures de lyse avec lavage et de lyse sans lavage.

2. RÉSUMÉ ET EXPLICATION

L'efficacité de la détection des lymphocytes dans le sang périphérique dépend de l'élimination des cellules interférentes. La lyse de sang total s'est avérée aussi efficace que la centrifugation à gradient de densité dans la préparation des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) pour l'analyse de sous-populations lymphocytaires.¹⁻⁴ Dans les laboratoires cliniques, les méthodes de lyse de sang total ont essentiellement remplacé la méthode de séparation à gradient de densité Ficoll-Paque™ car le temps de préparation de l'échantillon est plus court et le sang total est moins manipulé.⁵ Des études ont également montré que la méthode de sang total lysé est moins susceptible de montrer une perte de sous-populations lymphocytaires et peut aider à améliorer la reproductibilité de l'analyse par rapport aux méthodes antérieures.⁵⁻⁷

¹ Ficoll-Paque est une marque de GE Healthcare.

3. PRINCIPES DE LA MÉTHODE

Lors de l'adjonction de sang total au réactif à base d'anticorps monoclonaux, les anticorps marqués par les fluorochromes et contenus dans le réactif se lient de manière spécifique aux antigènes de surface des leucocytes. Les échantillons marqués sont ensuite traités avec la solution BD FACS Lysing Solution, ce qui permet de lyser les érythrocytes dans des conditions hypotoniques favorables tout en préservant les leucocytes.

4. RÉACTIF

Réactif fourni

La BD FACS Lysing Solution, concentrée 10X, est fournie sous forme de solution de tampon propriétaire de 100 ml contenant <10 % de formaldéhyde et <50 % de diéthyléneglycol. Cette quantité est suffisante pour 2 000 tests pour des

procédures de lyse sans lavage BD (par exemple, BD Tritest) et pour 500 tests pour des procédures de lyse avec lavage (par exemple, BD Simultest).

Précautions

- Réservé au diagnostic in vitro.
- La BD FACS Lysing Solution contient 25 – <50 % de 2,2'-oxybiséthanol (diéthyléneglycol), numéro CAS 111-46-6 ; 5 – <10 % de formaldéhyde, numéro CAS 50-00-0 ; et 3 – <5 % 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 pour télécharger la fiche de données de sécurité.

Danger
 <p>H302+H312+H332 : Nocif en cas d'ingestion, de contact cutané ou d'inhalation. H315 : Provoque une irritation cutanée. H319 : Provoque une sévère irritation des yeux. H317 : Peut provoquer une allergie cutanée. H341 : Susceptible d'induire des anomalies génétiques. H350 : Peut provoquer le cancer. H371 : Risque présumé d'effets graves pour les organes. H335 : Peut irriter les voies respiratoires. H373 : Risque présumé d'effets graves pour les organes à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée.</p>
 <p>P201 : Se procurer les instructions avant l'utilisation. P202 : Ne pas manipuler avant d'avoir lu et compris toutes les précautions de sécurité. P260 : Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols. P264 : Se laver soigneusement après manipulation. P272 : Les vêtements de travail contaminés ne devraient pas sortir du lieu de travail. P280 : Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. P333+P313 : En cas d'irritation ou d'éruption cutanée : consulter un médecin. P337+P313 : Si l'irritation oculaire persiste : consulter un médecin. P304+P340 : EN CAS D'INHALATION : transporter la personne à l'extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer. P312 : Appeler un CENTRE ANTIPOISON/un médecin en cas de malaise. P308+P313 : EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée : consulter un médecin.</p>

Pour les États-Unis, les avertissements suivants s'appliquent en plus de ceux indiqués précédemment :

Danger	
 	<p>H402 : Toxique pour les organismes aquatiques.</p> <p>P271 : Utiliser seulement en plein air ou dans un endroit bien ventilé.</p> <p>P273 : Éviter le rejet dans l'environnement.</p> <p>P270 : Ne pas manger, boire ou fumer en manipulant ce produit.</p> <p>P281 : Utiliser l'équipement de protection individuel requis.</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>P302+P352 : EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : laver abondamment à l'eau.</p> <p>P301+P312 : EN CAS D'INGESTION : appeler un CENTRE ANTIPOISON/un médecin en cas de malaise.</p> <p>P330 : Rincer la bouche.</p> <p>P321 : Traitement spécifique (voir sur cette étiquette).</p> <p>P363 : Laver les vêtements contaminés avant réutilisation.</p> <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> <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>

AVERTISSEMENT Tous les échantillons biologiques et les matières avec lesquelles ils sont entrés en contact sont susceptibles de constituer un danger biologique. Ils doivent être manipulés comme des matières pouvant transmettre une infection^{8,9} 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.

Instructions de dilution

Diluer le concentré 10X à 1:10 à température ambiante (20–25 °C) avec de l'eau désionisée. La solution préparée est stable pendant 1 mois si elle est conservée dans un récipient en verre ou en polyéthylène haute densité (PEHD) à température ambiante.

5. STOCKAGE ET MANIPULATION

La solution BD FACS Lysing Solution (10X) est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du flacon lorsqu'elle est stockée selon les instructions. Ne pas utiliser ce réactif en cas d'apparition d'un précipité ou d'une décoloration.

6. APPAREIL

La solution BD FACS Lysing Solution est conçue pour les cytomètres en flux équipés du matériel et des logiciels informatiques appropriés. Le cytomètre en flux doit être capable de détecter la lumière diffractée aux petits angles (FSC) et la lumière diffractée aux grands angles (SSC). Nous recommandons le cytomètre en flux BD FACSCalibur™, BD FACSCanto™ ou BD FACSCanto™ II. Il est toutefois également possible d'obtenir des résultats sur

d'autres plateformes. Pour obtenir des informations relatives aux limitations spécifiques à un appareil, consulter le mode d'emploi du réactif correspondant.

7. PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Prélever du sang de manière aseptique par ponction veineuse^{10,11} dans un BD Vacutainer® EDTA Blood Collection Tube (tube de prélèvement sanguin) stérile. Respecter les instructions du fabricant du tube de prélèvement pour connaître le volume minimum de sang à prélever. Conserver le sang anticoagulé à température ambiante (entre 20 et 25 °C) jusqu'à ce qu'il soit prêt pour le marquage et la lyse. Pour obtenir des informations sur les restrictions de conservation, consulter le mode d'emploi du réactif employé. Voir la section 10, Limitations, pour connaître les éventuelles interférences.

8. PROCÉDURE

Réactif fourni

BD FACS Lysing Solution, concentré 10X (N° de référence 349202)

Réactifs et matériel requis mais non fournis

- BD FACS Lysing Solution 1X, diluée comme indiqué à la Section 4, Réactif : Instructions de dilution
- BD Vacutainer EDTA Blood Collection Tubes (tubes de prélèvement sanguin) ou tubes équivalents
- Tubes à essai jetables en polystyrène de 12 x 75 mm avec bouchon
- Anticorps monoclonaux BD pour les antigènes de leucocytes humains (par exemple, réactifs BD Tritest ou BD Simultest)
- Vortex
- Micropipette avec embouts

D'autres matériels peuvent être requis. Pour obtenir des informations complémentaires, consulter le mode d'emploi du réactif employé.

Préparation des échantillons

Marquer des échantillons de sang total conformément aux instructions figurant dans le mode d'emploi du réactif employé. Lyser les globules rouges comme indiqué à l'aide de la solution BD FACS Lysing Solution (1X) diluée. Veiller à protéger les tubes contre la lumière directe. Effectuer le marquage à température ambiante (entre 20 et 25 °C).

1. Pour chaque échantillon, combiner les volumes appropriés de réactif à base d'anticorps monoclonal couplé à des fluorochromes et de sang par tube, comme indiqué dans le mode d'emploi correspondant.
2. Laisser incuber les tubes comme indiqué.
3. Ajouter un volume approprié de BD FACS Lysing Solution 1X aux tubes, comme indiqué. Bien agiter au vortex.
4. Continuer comme indiqué dans le mode d'emploi correspondant jusqu'à ce que les cellules puissent être acquises sur le cytomètre en flux. Boucher les tubes et stocker entre 2 et 8 °C dans l'obscurité jusqu'à l'analyse par cytométrie. Analyser les cellules marquées dans le délai indiqué dans le mode d'emploi correspondant. Bien vortexer les cellules à basse vitesse pour limiter l'agrégation avant l'acquisition.

9. RÉSULTATS

Les données représentatives suivantes ont été obtenues avec des échantillons de sang périphérique traités avec la solution BD FACS Lysing Solution sur un cytomètre en flux BD FACScan™. Le sang total a été marqué avec le réactif BD Tritest™ CD3/CD4/CD45 (Figure 1) ou le réactif BD Simultest™ CD3/CD4 (Figure 2).

Figure 1 Cytogrammes CD45 vs SSC et CD3 vs CD4 obtenus avec le réactif BD Tritest

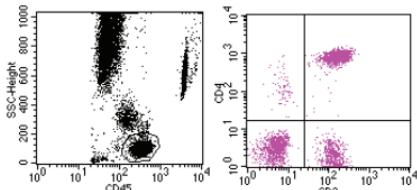
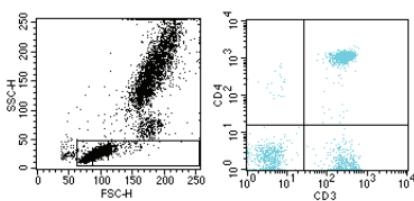


Figure 2 Cytogrammes FSC vs SSC et CD3 vs CD4 obtenus avec le réactif BD Simultest



10. LIMITATIONS

- Les laboratoires doivent définir leur propre intervalle de référence normal pour chaque paramètre de réactif susceptible d'être affecté par le sexe et l'âge du patient, ainsi que par la technique de préparation. L'origine ethnique du patient peut également avoir une influence¹², bien que les données disponibles soient insuffisantes pour le démontrer. Il convient de connaître l'âge, le sexe, les caractéristiques cliniques et l'origine ethnique des sujets lors de la définition d'un intervalle de référence.¹³ Les intervalles de référence sont uniquement fournis à titre d'information.
- BD FACS Lysing Solution est spécialement formulée pour être utilisée avec les cytomètres en flux de la marque BD FACSTM.
- EDTA est l'anticoagulant de choix. BD a restreint les informations concernant l'utilisation d'autres anticoagulants tels que l'héparine.
- Conserver les échantillons dans des tubes BD Vacutainer EDTA Blood Collection Tubes (tubes de prélèvement sanguin) à température ambiante (entre 20 et 25 °C) avant le marquage et la lyse. Pour obtenir des informations sur les délais de conservation maximum après le prélèvement, consulter le mode d'emploi du réactif employé.

- Les échantillons contenant des globules rouges nucléés présentent une lyse incomplète des globules rouges car la BD FACS Lysing Solution ne lyse pas les érythrocytes nucléés. Cette situation peut également se produire lors du dosage d'échantillons sanguins provenant de patients atteints de certains troubles hématologiques rendant les globules rouges difficiles à lyser, notamment la myélofibrose, la drépanocytose, la thalassémie et la sphérocytose.^{7,8}
- En cas d'utilisation de réactifs monoclonaux qui réagissent avec des immunoglobulines sériques, les échantillons de sang doivent être lavés avec une solution saline à tampon phosphate (PBS) 1X ou du sérum physiologique avant le marquage et la lyse.¹⁴
- Un réactif monoclonal sur un antigène de surface cellulaire ou un récepteur, qui est :
 - a) répandu dans le plasma (par exemple, le récepteur IL-2) ou b) occupé par des composants du plasma (par exemple, des récepteurs au complément) peut présenter une réduction de l'intensité de marquage lorsqu'il est analysé avec la méthode de sang total lysé.

11. VALEURS ATTENDUES

Les sujets normaux ont été étudiés dans trois sites cliniques pour établir les intervalles de référence des sous-populations de lymphocytes CD3⁺ et CD3⁺CD4⁺. Les intervalles de référence des paramètres étudiés sont présentés dans le tableau suivant. Les intervalles obtenus ont fait l'objet de tests visant à identifier les différences en

fonction du site, du sexe et de l'âge du patient. Des intervalles de référence séparés ont été fournis lorsque les comparaisons montraient une différence importante.

Sous-population de lymphocytes	Sexe	Âge	n	Moyenne	Intervalle 95 %
% CD3 ⁺	Les deux	18–70	160	72	59–85
% CD3 ⁺ CD4 ⁺	Homme	18–70	84	43	29–57
	Femme	18–70	75	46	31–60

Les intervalles de référence des adultes ne doivent pas être utilisés avec des échantillons de sang prélevés chez des enfants (du nouveau-né à l'enfant de 13 ans). Voir la première limitation pour plus d'informations sur les intervalles de référence.

12. CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES

Précision

Pour le réactif BD Tritest (CD3/CD4/CD45), des échantillons provenant de 17 donneurs normaux et de 61 donneurs anormaux ont été obtenus dans deux sites cliniques. Trois aliquotes de chaque échantillon ont été marquées, lysées et analysées sur des cytomètres en flux BD FACScan.

Sujets	Sous-population de lymphocytes	n	Moyenne	ET ^a	df ^b
Normaux	% CD3 ⁺	17	72	0,72	34
	% CD3 ⁺ CD4 ⁺	17	42	0,79	34
Anormaux	% CD3 ⁺	61	77	0,88	122
	% CD3 ⁺ CD4 ⁺	61	19	0,61	122

a. ET = écart-type

b. df = degrés de liberté : le nombre d'observations (3) moins le nombre de moyennes (1), multiplié par le nombre de sujets (n).

Pour le réactif BD Simultest (CD3/CD4), la reproductibilité intra-échantillon a été évaluée sur un site clinique. Des déterminations ont été réalisées sur des échantillons de sang provenant de six patients en bonne santé et de quatre patients avec pathologies (VIH et transplantation rénale). Deux aliquotes provenant du même échantillon de sang ont été préparées avec le panel de réactifs BD Simultest™ IMK. Lymphocyte et chaque aliquote a été analysée deux fois sur le même cytomètre en flux BD FACScan.

Sujets	Sous-population de lymphocytes	n	Moyenne ^a	ET ^b	df ^c
Normaux	% CD3 ⁺	6	73	0,85	12
	% CD3 ⁺ CD4 ⁺	6	46	1,08	12
Anormaux	% CD3 ⁺	4	83	0,77	8
	% CD3 ⁺ CD4 ⁺	4	32	1,06	8

- a. La moyenne est la moyenne regroupée (correspond à la moyenne des moyennes individuelles).
- b. ET = écart-type
- c. df = degrés de liberté : le nombre d'observations (4) moins le nombre de moyennes (2), multiplié par le nombre de sujets (n).

Isolement des leucocytes

Cinq échantillons de sang ont été traités avec la solution BD FACS Lysing Solution, lavés et analysés pour isoler les leucocytes à l'aide du système Ortho ELT-1500 Clinical Hematology Analyzer. Comparé à la numération totale des leucocytes, l'isolement des leucocytes avec la solution de lyse a atteint une moyenne de 92 %.

Lyse des érythrocytes

Cinq échantillons de sang ont été traités avec la solution BD FACS Lysing Solution, lavés et analysés pour déterminer les érythrocytes résiduels à l'aide du système Ortho ELT-1500 Clinical Hematology Analyzer. Aucun érythrocyte n'a été détecté.

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 INDICUÉS 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 LIMITÉ AU REMPLACEMENT DES PRODUITS OU AU REMBOURSEMENT DU PRIX D'ACHAT. BD NE SAURA ÊTRE TENU RESPONSABLE DES DOMMAGES DÉCOLLANT 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

- de Paoli P, Reitano M, Battistin S, Castiglia C, Santini G. Enumeration of human lymphocyte subsets by monoclonal antibodies and flow cytometry: a comparative study using whole blood or mononuclear cells separated by density gradient centrifugation. *J Immunol Methods*. 1984;72:349-353.
- Ashmore LM, Shopp GM, Edwards BS. Lymphocyte subset analysis by flow cytometry. Comparison of three different staining techniques and effects of blood storage. *J Immunol Methods*. 1989;118:209-215.
- Renzi P, Gimms LC. Analysis of T cell subsets in normal adults: comparison of whole blood lysis technique to Ficoll-Hypaque separation by flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1987;98:53-56.
- Romeu MA, Mestre M, González L, et al. Lymphocyte immunophenotyping by flow cytometry in normal adults: comparison of fresh whole blood lysis technique, Ficoll-Paque separation and cryopreservation. *J Immunol Methods*. 1992;154:7-10.
- Jackson A. Basic phenotyping of lymphocytes: selection and testing of reagents and interpretation of data. *Clin Immunol Newslett*. 1990;10:49-55.
- Kidd PG, Vogt RF, Jr. Report of the workshop on the evaluation of T-cell subsets during HIV infection and AIDS. *Clin Immunol Immunopathol*. 1989;52:3-9.
- Landay AL, Muirhead KA. Procedural guidelines for performing immunophenotyping by flow cytometry. *Clin Immunol Immunopathol*. 1989;52:48-60.
- Centers for Disease Control. Perspectives in disease prevention and health promotion 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.

9. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition.* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005. CLSI document M29-A3.
10. *Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline—Second Edition.* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document H42-A2.
11. *Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture; Approved Standard—Sixth Edition.* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document GP41-A6.
12. Prince HE, Hirji K, Waldbeser LS, Plaege-Marshall S, Kleinman S, Lanier LL. Influence of racial background on the distribution of T-cell subsets and Leu 11-positive lymphocytes in healthy blood donors. *Diagn Immunol.* 1985;3:33-37.
13. *Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline—Third Edition.* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010. CLSI document EP28-A3c.
14. Nicholson JK, Rao PE, Calvelli T, et al. Artifactual staining of monoclonal antibodies in two-color combinations is due to an immunoglobulin in the serum and plasma. *Cytometry.* 1994;18:140-146.