



7-AAD Viability Dye

REF A07704 150 tests; 3 mL, 20 µL / test

TABLE OF CONTENTS

English	2
Français (FR)	6
Deutsche (DE)	11
Italiano (IT)	16
Español (ES)	21
Português Portugal (PT-PT)	26
Dansk (DK)	31
Svenska (SE)	35
Norsk (NO)	39
Suomi (FI)	43
Ελληνικά (GR)	47
日本語 (JP)	52
中文 (中国) (ZH-CN)	56
Lietuvių (LT)	60
Magyar (HU)	64
Polski (PL)	69
Čeština (CZ)	74
Slovák (SK)	78
한국어 (KR)	82
Türkçe (TR)	86
Русский (RU)	90
Eestlane (EE)	95
Hrvatski (HR)	99
Български (BG)	103
中文 (台灣) (ZH-TW)	108
Română (RO)	112
Slovenščina (SI)	116
Srpski (Latinski) (SP)	120
Latviešu (LV)	124
Українська (UA)	128
Português Brasil (PT-BR)	133
Nederlands (NL)	138
Tiếng Việt (VN)	143
Қазақша (KZ)	148
APPENDIX	153
REFERENCES	154

	Specifications 7-AAD Viability Dye
Formulation	Liquid
Volume	3 mL
Calibration	Ready for use
λ excitation	488 nM
Emission peak	655 nm (complex with double strand DNA)

7-AAD Viability Dye

REF A07704 150 tests; 3 mL, 20 μ L / test

For *In Vitro* Diagnostic Use

INTENDED USE

7-AAD Viability Dye is a chemical coloring agent in solution, which is designed for mono- or multiparametric analysis using flow cytometry. It permits non-viable cells to be identified and to be excluded from (viable) cells of interest in the analysis of human leucocytes.

PRINCIPLE

7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) is an analogue of Actinomycin containing an amine group substituted in position 7 of the chromophore. 7-AAD inserts itself between the tops of the Cytosine/Guanine bases of DNA (1).

Staining of the DNA double strand is undertaken by incubating the sample with the 7-AAD Viability Dye. The red cells are then removed by lysis and the leucocytes are analyzed by flow cytometry.

Apoptotic necrotic and/or damaged cells are a source of interference in the analysis of viable cells using flow cytometry. Non-viable cells can be characterized and identified as they are stained by 7-AAD, whilst living cells, retaining their membranous integrity, are impermeable to 7-AAD and are unstained (i.e., they are 7-AAD negative) (2).

The flow cytometer analyzes light diffusion and the fluorescence of cells. It makes possible the localization of cells within the electronic window defined on a histogram, which correlates the orthogonal diffusion of light (Side Scatter or SS) and the fluorescence corresponding to 7-AAD staining. Other histograms combining two of the different parameters available on the cytometer are also used in the gating stage.

The fluorescence of cells thus gated is analyzed in order to exclude the positively stained events (non-viable) from the unstained ones (viable). The results can be expressed as a percentage of non-fluorescent events in relation to all the events taken into account by the gating.

INTENDED USER

This product is intended for laboratory professional use.

SAMPLES

Venous blood must be taken using sterile tubes containing an EDTA salt as the anticoagulant.

The samples should be kept at room temperature (18–25°C) and not shaken. The sample should be homogenized by gentle agitation prior to taking the test sample.

The samples must be analyzed within 24 hours of venipuncture.

WARNING AND PRECAUTIONS

1. Do not use the reagent beyond the expiry date.
2. Do not freeze.
3. Let it come to room temperature (18–25°C) before use.
4. Minimize exposure to light.
5. Avoid microbial contamination of the reagents, or false results may occur.
6. This ready for use reagent contains 0.005% (weight/volume) of 7-AAD and 1% (volume/volume) of Dimethyl Sulfoxide (DMSO).

In pure form, 7-AAD is potentially carcinogenic and DMSO is an irritant.

Though extremely diluted in the present formulation, these constituents may retain all or part of their harmful effects. Never pipet by mouth, and avoid all contact with the skin, mucosa and eyes. Use these reagents following the precautions for use (notably: the wearing of gloves, gown and protective glasses).

7. 7-AAD is a chromophore subject to degradation by exposure to light. It is stored in an opaque vial to protect it from light prior to use.

Avoid continuous exposure to light during the incubation stages and reduce light exposure of the samples once staining has been undertaken.

8. All blood samples must be considered as potentially infectious and must be handled with care (in particular: the wearing of protective gloves, gowns and goggles).
9. Blood tubes and disposable material used for handling should be disposed of in ad hoc containers intended for incineration.

GHS HAZARD CLASSIFICATION

7-AAD Viability Dye

WARNING

H316

P332+P313

Causes mild skin irritation.

If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.

Dimethyl Sulfoxide 0.5 - 1.5%



Safety Data Sheet is available at beckman.com/techdocs

STORAGE AND STABILITY

The 7-AAD Viability Dye must be kept at between 2 and 8°C and protected from light, before and after the vial has been opened.

Closed vial shelf life per stability study: 730 days.

Stability of opened vial: the reagent is stable for 60 days.

See lot specific Certificate of Analysis at www.beckman.com.

EVIDENCE OF DETERIORATION

Any change in the physical appearance of the reagents may indicate deterioration and the reagent should not be used.

For additional information, or if damaged product is received, call Beckman Coulter Customer Service at 800-742-2345 (USA or Canada) or contact your local Beckman Coulter Representative.

MATERIALS NEEDED BUT NOT SUPPLIED WITH KIT:

- Sampling tubes and material necessary for sampling.
- Automatic pipettes with disposable tips for 20, 100 and 500 µL.
- Plastic haemolysis tubes.
- Red cell lysis reagent. For example: IOTest3 Lysing Solution (Ref. A07799).
- Buffer (PBS: 0.01M sodium phosphate; 0.145 M sodium chloride; pH 7.2).
- Centrifuge.
- Automatic agitator (Vortex type).
- Flow cytometer.

PREPARATION OF SAMPLES

The concentration of leucocytes in the sample must be less than 10^4 cells/µL (10^{10} /L). If necessary, dilute in PBS to bring the leucocyte concentration to 5×10^3 cells/µL (5×10^9 /L).

The procedure uses 100 µL of a sample, tube prediluted or otherwise.

NB:

- Adjustment of the intensity of fluorescence corresponding to 7-AAD can be undertaken using the staining of a sample of whole fresh blood and of non-viable stabilized cells in the same tube (see image in appendix). Under these conditions, the voltage corresponding to the detection of 7-AAD must be adjusted such that viable events (i.e., whole fresh blood) appear on the first decade of an SS histogram, depending on the 7-AAD (see example in the appendix).
- Do not use reagents containing permeating or fixating agents during the procedure in order to prevent artifactually positive staining.

PROCEDURE

1. Add 20µL of the 7-AAD Viability Dye solution to each test tube.
2. Add 100µL of the test sample (i.e., the equivalent of approximately 5×10^6 cells).
Vortex the tubes gently.
3. Incubate for 15 to 20 minutes at room temperature (18–25°C), protected from light.

- Then perform lysis of the red cells, if necessary, by following the recommendations of the lysis reagent used.

By way of example, if one wishes to use the IOTest3 Lysing Solution (Ref. A07799) add 2 mL of the working solution (1X), vortex immediately and incubate for 10 minutes at room temperature, protected from light.

If the sample does not contain red cells, do not undertake the lysis stage, but add 0.5 to 1 mL of PBS.

- Preparations should be analyzed within 1 hour.

Note: In all cases, keep the preparations between 2 and 8°C and protected from light.

PERFORMANCE

SPECIFICITY

Actinomycins are the active biological constituents of a chromophore (2-Amino-4,6Dimethylphenoxazone-3) and of cyclic pentapeptides (3). They are antibiotics of bacterial origin characterized historically in soil Ascomycetes. The actinomycins form stable complexes with double strand deoxyribonucleic acid (DNA), but do not form this type of complex either with double strand ribonucleic acid (RNA) or with RNA-DNA hybrids, or with single strand DNA or RNA.

The spectral properties of 7-AAD make it a compound which is particularly well suited to flow cytometry analysis (3). The maximum absorption of the 7-AAD/DNA complex is compatible with the blue excitation wavelength of 488 nm for cytometers fitted with an argon laser (4). The peak fluorescence emission in the deep red band (635 to 675 nm) of the 7-AAD/DNA complex permits optimal use of this probe when it is combined with Fluorescein Isothiocyanate conjugated antibodies (FITC) and with R Phycoerythrin (PE) (3). Indeed, in contrast to Propidium Iodide (PI), which is another fluorescent probe used as a DNA marker, the 7-AAD/DNA complex has a reduced overlapping emission spectrum with FITC and PE.

PRECISION

The percent positive values were determined using Whole Blood spiked with positive cells. Each sample was run 4 times, twice a day for 1 day on 2 instruments using 2 lots of 7-AAD Viability Dye reagent. Measurements (% positive) were made on Navios flow cytometer. Analysis was conducted based on the CLSI method EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods.

Our acceptance criteria is dependent on the number of positive events measured for each population:

- If positive event <1500, CV <15%
- If positive event >1500, CV <10%

IOTest3 Lysing Solution:

Whole Blood spiked with HPBALL Cell line							
Number of positive events (Mean) = 5539							
	Inter-Operator	Inter-cytometer	Intra-lot	Inter-lot	Inter-run	Intra-run	Total
CV (%)	1.48	1.55	4.44	1.41	2.87	3.05	4.91
RESULTS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Versalyse Lysing System:

Whole Blood spiked with HPBALL Cell line							
Number of positive events (Mean) = 4034							
	Inter-Operator	Inter-cytometer	Intra-lot	Inter-lot	Inter-run	Intra-run	Total
CV (%)	3.73	1.85	8.74	1.79	3.63	7.02	9.11
RESULTS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

ACCURACY

The accuracy of 7-AAD Viability Dye was assessed by comparing the results with a reference reagent as the predicate on a set of whole blood samples spiked with positive cells run on a NAVIOS Cytometer. The bias between test and reference reagent was determined based on the difference between test results. If the bias is within the allowable error range or the p-value indicates no significant difference (> 0.05), then test results of the patient samples by the two reagents are considered as equivalent.

The results obtained are summarized in the following table below:

IOTest3 Lysing Solution:

Number of donors = 25				
Positive Target	Mean Δ	Δ % Cell criteria	p-value	RESULTS
Whole Blood spiked with HPBALL Cell line	0.31	<5	0.247	PASS

Versalyse Lysing System:

Number of donors = 25				
Positive Target	Mean Δ	Δ % Cell criteria	p-value	RESULTS
Whole Blood spiked with HPBALL Cell line	-0.34	<5	0.289	PASS

LIMITATIONS

1. Flow cytometry may produce false results if the cytometer has not been aligned perfectly, if fluorescence leaks have not been correctly compensated for and if the regions have not been carefully positioned.
2. Accurate and reproducible results will be obtained as long as the procedures used are in accordance with the technical insert leaflet and compatible with good laboratory practices.
3. 7-AAD, the active substance in this reagent, has been optimized so as to offer the best specific/non-specific signal ratio. Therefore, it is important to adhere to the reagent volume/sample volume ratio in every test.
4. In the case of a hyperleucocytosis, dilute the blood in PBS so as to obtain a value of approximately 5×10^9 leucocytes/L.
5. In certain disease states, such as severe renal failure or haemoglobinopathies, lysis of red cells may be slow, incomplete or even impossible. In this case, it is advisable to isolate mononucleated cells using a density gradient (Ficoll, for example) prior to staining.

See the Appendix for examples and references.

TRADEMARKS

Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service marks mentioned herein are trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States and other countries.

ADDITIONAL INFORMATION

For a patient/user/third party in the European Union and in countries with identical regulatory regime (Regulation 2017/746/EU on In vitro Diagnostic Medical Devices); if, during the use of this device or as a result of its use, a serious incident has occurred, please report it to the manufacturer and/or its authorized representative and to your national authority.

REVISION HISTORY

REVISION AF:	Release date : October 2021
REVISION AW:	Release date : April 2022
Updates to comply with the Beckman Coulter Global labelling Policy and according to IVD-R (EU)2017/746 requirements:	
Added sections	Intended User, Concentration, Precision, Accuracy, Additional Information, Revision History
Added information	See sections Principle
Updated sections	Principle, Warning and Precautions, GHS Hazard Classification, Storage and Stability, Evidence of Deterioration, Limitations, Appendix
Removed sections	Methodology, Examples of Clinical Application, Expected Results, Intra-Laboratory Reproducibility, Linearity
REVISION	Release Date
AX	October 2022
Updated sections	Added Translations
REVISION	Release Date
AY	
Updated sections	Storage and stability

Symbols Key

Glossary of Symbols is available at beckman.com/techdocs (document number B60062)

	Spécifications Marqueur de Viabilité 7-AAD Viability Dye
Forme	Liquide
Volume	3 mL
Calibration	Prêt à l'emploi
Excitation λ	488 nm
Pic d'émission	655 nm (complexe avec l'ADN double brin)

7-AAD Colorant viabilité 7-aminoactinomycine D

REF A07704 150 tests ; 3 mL, 20 μ L / test

Pour une utilisation en Diagnostic *In Vitro*

UTILISATION

Le marqueur de viabilité 7-AAD Viability Dye est un colorant chimique en solution adapté à l'analyse mono- ou multiparamétrique par cytométrie en flux. Il permet d'identifier les cellules non-viables et de les exclure des cellules d'intérêt (viables) lors de l'analyse de leucocytes humains.

PRINCIPE

Le 7-Amino-Actinomycine D (7-AAD) est un analogue de l'Actinomycine contenant un groupement amine substitué en position 7 du chromophore. Le 7-AAD s'intercale entre les plateaux de bases Cytosine/Guanine de l'ADN (1).

Le marquage de l'ADN double brin est réalisé en incubant l'échantillon avec le réactif 7-AAD Viability Dye. Les érythrocytes sont ensuite éliminés par lyse et les leucocytes sont analysés par cytométrie en flux.

Les cellules apoptotiques, nécrotiques et/ou endommagées sont sources d'interférences dans l'analyse des cellules viables par cytométrie en flux. Les cellules non-viables peuvent être caractérisées et identifiées parce que marquées par le 7-AAD alors que les cellules vivantes conservant leur intégrité membranaire sont imperméables au 7-AAD et se retrouvent non marquées (soit 7-AAD négatives) (2).

Le cytomètre en flux analyse la diffusion de la lumière et la fluorescence des cellules. Il permet de localiser des cellules à l'intérieur de la fenêtre électronique définie sur un histogramme, ce qui corrèle la diffusion orthogonale de la lumière (Side Scatter ou diffusion latérale) et la fluorescence correspondant à la coloration 7-AAD. D'autres histogrammes combinant deux des différents paramètres disponibles sur le cytomètre sont également utilisés dans l'étape de déclenchement.

La fluorescence des cellules ainsi fenêtrées est analysée pour exclure les événements positivement marqués (non viables) des événements non marqués (viables). Les résultats peuvent s'exprimer en pourcentage d'événements non fluorescents par rapport à l'ensemble des événements pris en compte par le fenêtrage électronique.

UTILISATEUR PRÉVU

Ce produit est destiné à un usage professionnel en laboratoire.

ÉCHANTILLONS

Le sang veineux doit être prélevé avec des tubes stériles contenant un sel EDTA comme anticoagulant.

Les échantillons se conservent à température ambiante (18–25 °C) et sans agitation. Avant d'effectuer la prise d'essai, il est recommandé d'homogénéiser le prélèvement par agitation douce.

Les échantillons doivent être analysés dans les 24 heures qui suivent la ponction veineuse.

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

1. Ne pas utiliser le réactif au-delà de la date de péremption.
2. Ne pas congeler.
3. Laisser revenir à température ambiante (18–25 °C) avant utilisation.
4. Minimiser l'exposition à la lumière.
5. Éviter la contamination microbienne des réactifs, ou des résultats erronés peuvent se produire.
6. Ce réactif prêt à l'emploi contient 0,005 % (poids/volume) de 7-AAD et 1 % (volume/volume) de diméthylsulfoxyde (DMSO).

À l'état pur, le 7-AAD est potentiellement cancérigène et le DMSO est irritant.

Bien qu'extrêmement dilués dans la présente formulation, ces constituants peuvent conserver l'intégralité ou une partie de leurs effets nocifs. Ne jamais pipetter avec la bouche et éviter tout contact avec la peau, les muqueuses et les yeux. Utiliser ces réactifs en suivant les précautions d'emploi (notamment : le port de gants, de blouses et de lunettes de protection).

7. Le 7-AAD est un chromophore sujet à dégradation par exposition à la lumière. Il est conservé dans un flacon opaque pour le protéger de la lumière avant utilisation.
Eviter une exposition continue à la lumière pendant les étapes d'incubation et réduire l'exposition à la lumière des échantillons une fois le marquage réalisé.
8. Tous les échantillons de sang doivent être considérés comme potentiellement infectieux et doivent être manipulés avec soin (en particulier : port de gants, de blouses et de lunettes de protection).
9. Les tubes de prélèvement sanguin et les matériaux jetables utilisés pour la manipulation doivent être éliminés dans des conteneurs appropriés prévus pour incinération.

CLASSIFICATION DES RISQUES SGH

7-AAD Viability Dye

ATTENTION

H316

P332+P313

Provoque une légère irritation cutanée.

En cas d'irritation cutanée : demander un avis médical/consulter un médecin.

Diméthyle sulfoxyde 0,5 - 1,5 %



La fiche technique santé-sécurité est disponible à l'adresse beckman.com/techdocs

CONSERVATION ET STABILITÉ

Le 7-AAD Viability Dye se conserve entre 2 et 8 °C et à l'abri de la lumière, avant et après ouverture du flacon.

Durée de conservation du flacon fermé selon l'étude de stabilité : 730 jours.

Stabilité du flacon ouvert : le réactif est stable pendant 60 jours.

Voir le certificat d'analyse du lot spécifique sur www.beckman.com.

PREUVE DE DÉTÉRIORATION

Tout changement de l'apparence physique des réactifs peut indiquer une détérioration et le réactif ne doit pas être utilisé.

Pour plus de renseignements ou si un produit défectueux est livré, appeler le service client de Beckman Coulter au 800-742-2345 (USA ou Canada), ou votre représentant de Beckman Coulter local.

MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI AVEC CE COFFRET:

- Les tubes d'échantillonnage et le matériel nécessaires pour l'échantillonnage.
- Pipettes automatiques et embouts jetables pour prélever des quantités de 20, 100 et 500µL.
- Tubes d'hémolyse en plastique.
- Réactif de lyse des érythrocytes. A titre d'exemple : Solution de Lyse IOTest3 (Réf. A07799).
- Tampon (PBS : 0,01M phosphate de sodium; 0,145M chlorure de sodium; pH7,2).
- Centrifugeuse.
- Agitateur automatique (type vortex).
- Cytomètre en flux.

PREPARATION DES SPECIMENS

La concentration de leucocytes dans l'échantillon doit être inférieure à 10⁴cellules/µL (10¹⁰/L). Diluer si nécessaire dans du PBS pour ramener la concentration en leucocytes à 5x 10³cellules/µL (5 x 10⁹/L).

La procédure utilise 100 µL d'un échantillon, tube prédilué ou non.

Nota Bene:

- L'ajustement de l'intensité de la fluorescence correspondant au 7-AAD peut être effectuée en utilisant le marquage d'un échantillon de sang total frais et de cellules stabilisées non-viables dans le même tube (voir image en annexe). Dans ces conditions, le voltage correspondant à la détection du 7-AAD doit être ajusté de telle sorte que les événements viables (c'est-à-dire le sang total frais) apparaissent sur la première décade sur un histogramme SS en fonction de 7-AAD (voir illustration en annexe).
- Ne pas utiliser de réactif contenant des agents perméabilisants ou fixants au cours de la procédure afin de ne pas induire de marquage artéfactuellement positif.

PROCÉDURE

1. Dans chaque tube test, introduire 20µL de la solution de 7-AAD Viability Dye.
2. Ajouter 100µL de l'échantillon à tester, soit l'équivalent d'environ 5x10⁵ cellules.

Vortexer doucement.

3. Incuber 15 à 20 minutes à température ambiante (18–25 °C) et à l'abri de la lumière.
4. Effectuer ensuite une lyse des globules rouges, si nécessaire, en suivant les recommandations du réactif de lyse utilisé.
A titre d'exemple, si l'on souhaite utiliser la Solution de Lyse IOTest3 (Réf. A07799), ajouter 2mL de solution de travail (1X), vortexer immédiatement et incuber 10 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière.
Si l'échantillon ne contient pas de globules rouges, ne pas effectuer l'étape de lyse, mais ajouter 0,5 à 1 mL de PBS.
5. Les préparations doivent être analysées dans l'heure.

Nota Bene: Conserver les préparations entre 2 et 8 °C et à l'abri de la lumière.

PERFORMANCE

SPÉCIFICITÉ

Les actinomycines sont des constituants biologiques actifs composés d'un chromophore (2-Amino-4,6Dimethylphenoxazone-3) et de pentapeptides cycliques (3). Il s'agit d'antibiotiques d'origines bactériennes historiquement caractérisés chez les Ascomycètes du sol. Les actinomycines forment des complexes stables avec l'acide désoxyribonucléique (ADN) double brin mais ne forment ce type de complexe ni avec l'acide ribonucléique (ARN) double brin, ni avec les hybrides ARN-ADN, ni avec l'ADN ou l'ARN simple brin.

Les propriétés spectrales du 7-AAD en font une molécule particulièrement adaptée à l'analyse par cytométrie en flux (3). L'absorption maximale du complexe 7-AAD/ADN est compatible avec la longueur d'onde d'excitation bleue de 488nm des cytomètres équipés de laser argon (4). Le pic d'émission de fluorescence dans le rouge profond (635à675nm) du complexe 7-AAD/ADN permet une utilisation optimale de cette sonde lorsqu'elle est combinée à des anticorps conjugués à l'Isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et à la R Phycoérythrine (PE) (3). En effet, et contrairement à l'Iodure de Propidium (IP) qui est une autre sonde fluorescente utilisée comme marqueur de l'ADN, le complexe 7-AAD/ADN présente un chevauchement réduit du spectre d'émission avec le FITC et la PE.

PRÉCISION

Les valeurs de percentile positives ont été déterminées à l'aide de sang total injecté de cellules positives. Chaque échantillon a été analysé 4 fois, deux fois par jour pendant 1 jour sur 2 instruments à l'aide de 2 lots de réactif à base de colorant de viabilité 7-AAD. Les mesures (% positif) ont été effectuées sur le cytomètre en flux Navios. L'analyse a été effectuée avec la méthode CLSI EP5-A2 : Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Évaluation de la performance de précision des méthodes de mesures quantitatives).

Notre critère d'acceptation est dépendant du nombre d'événements positifs mesurés pour chaque population :

- Si événement positif < 1 500, CV < 15 %
- Si événement positif > 1 500, CV < 10 %

Solution de lyse IOTest 3 :

Sang total injecté de ligne de cellules HPBALL							
Nombre d'événements positifs (Moyenne) = 5539							
	Inter-opérateur	Inter-cytomètre	Intra-lot	Inter-lot	Inter-analyse	Intra-analyse	Total
CV (%)	1,48	1,55	4,44	1,41	2,87	3,05	4,91
RÉSULTATS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Système de lyse VersaLyse :

Sang total injecté de ligne de cellules HPBALL							
Nombre d'événements positifs (Moyenne) = 4034							
	Inter-opérateur	Inter-cytomètre	Intra-lot	Inter-lot	Inter-analyse	Intra-analyse	Total
CV (%)	3,73	1,85	8,74	1,79	3,63	7,02	9,11
RÉSULTATS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

EXACTITUDE

L'exactitude du colorant de viabilité 7-AAD a été évaluée en comparant les résultats avec un réactif de référence comme prédicat sur un ensemble d'échantillons de sang total injecté de cellules positives analysé sur un cytomètre NAVIOS. L'écart systématique entre le test et le réactif de référence a été déterminé en fonction de la différence entre les résultats des tests. Si le biais se trouve dans la plage d'erreurs permise ou si la valeur p n'indique aucune différence significative (> 0,05), les résultats des tests d'échantillons de patient par les deux réactifs sont considérés comme équivalents.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

Solution de lyse IOTest 3 :

Nombre de donneurs = 25				
Cible positive	Moyenne Δ	Critères de cellules Δ %	Valeur-p	RÉSULTATS
Sang total injecté de ligne de cellules HPBALL	0,31	<5	0,247	PASS

Système de lyse VersaLyse :

Nombre de donneurs = 25				
Cible positive	Moyenne Δ	Critères de cellules Δ %	Valeur-p	RÉSULTATS
Sang total injecté de ligne de cellules HPBALL	-0,34	<5	0,289	PASS

LIMITES

1. La cytométrie en flux peut produire des résultats erronés si le cytomètre n'a pas été parfaitement aligné, si les fuites de fluorescence n'ont pas été correctement compensées et si les régions n'ont pas été soigneusement positionnées.
2. Des résultats précis et reproductibles seront obtenus tant que les procédures utilisées sont en conformité avec la notice technique et compatibles avec les bonnes pratiques de laboratoire.
3. Le 7-AAD, principe actif de ce réactif, est calibré de manière à offrir le meilleur rapport signal spécifique/signal non spécifique. C'est pourquoi il est important de respecter le rapport volume du réactif/volume de l'échantillon pour chaque test.
4. En cas d'hyperleucocytose, diluer le spécimen dans du PBS de façon à obtenir une valeur située autour de 5×10^9 leucocytes / L.
5. Au cours de certaines pathologies, comme les insuffisances rénales graves ou les hémoglobinopathies, la lyse des globules rouges peut être ralentie, voire incomplète ou impossible. Dans ce cas, il est recommandé d'isoler les cellules mononucléées par gradient de densité (par exemple: Ficoll) avant marquage.

Voir l'annexe pour des exemples et des références.

MARQUES

Beckman Coulter, le logo stylisé et les marques des produits et des services Beckman Coulter mentionnées ici sont des marques ou des marques déposées de Beckman Coulter, Inc. aux États-Unis et dans d'autres pays.

INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES

Pour un patient/utilisateur/tiers de l'Union européenne et des pays ayant le même régime réglementaire (Règlement 2017/746/UE relatif aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro) ; si, lors de l'utilisation de ce dispositif ou suite à son utilisation, un incident important se produit, veuillez le rapporter au fabricant et/ou à son représentant autorisé et à l'autorité nationale de votre pays.

HISTORIQUE DES RÉVISIONS

RÉVISION AF :	Date de publication : Octobre 2021
RÉVISION AW :	Date de publication : avril 2022
Mises à jour pour se conformer aux exigences de la politique d'étiquetage générale de Beckman Coulter et aux exigences IVD-R (UE)2017/746 :	
Ajout de sections	Utilisateur auquel le dispositif est destiné, Concentration, Précision, Exactitude, Informations supplémentaires, Historique des révisions
Ajout d'informations	Voir les sections Principe
Sections mises à jour	Principe, Avertissements et précautions, Classification des risques SGH, Conservation et stabilité, Preuve de détérioration, Limites, Annexe
Suppression de sections	Méthodologie, Exemples d'applications cliniques, Résultats escomptés, Reproductibilité intra-laboratoire, Linéarité
RÉVISION	Date de publication
AX	Octobre 2022
Sections mises à jour	Ajout de traductions
RÉVISION	Date de publication
AY	
Sections mises à jour	Conservation et stabilité

Légende des symboles

Un glossaire des symboles est disponible sur beckmancoulter.com/techdocs (document numéro B60062)

	Spezifikationen 7-AAD Viability Dye Vitalitätsfarbstoff
Form	Flüssig
Band	3 mL
Kalibrierung	Gebrauchsfertig
λ -Anregung	488 nm
Emissionspeak	655 nm (Komplexe mit doppelsträngiger DNA)

7-AAD-Lebensfähigkeits-Farbstoff

REF A07704 150 Tests; 3 mL, 20 µL/Test

Zur Verwendung als *In vitro*-Diagnostikum

VERWENDUNGSZWECK

Der 7-AAD Viability Dye Vitalitätsfarbstoff ist ein chemischer Lösungsfarbstoff, der sich zur Mono- oder Multiparameteranalyse im Durchflusszytometer eignet. Durch ihn können bei der Analyse von menschlichen Leukozyten nicht vitale Zellen identifiziert und von den relevanten Zellen (vitale) isoliert werden.

PRINZIP

7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) ist ein Analog zu Actinomycin und enthält eine substituierte Aminogruppe an der Position 7 des Chromophors. 7-AAD lagert sich zwischen den Cytosin-/Guaninbasen der DNA ein (1).

Die Markierung der doppelsträngigen DNA erfolgt durch Inkubieren der Probe mit dem 7-AAD Viability Dye Reagenz. Die Erythrozyten werden anschließend durch eine Lyse eliminiert und die Leukozyten werden im Durchflusszytometer untersucht.

Apoptotische, nekrotische und/oder beschädigte Zellen sind Interferenzquellen bei der Analyse der vitalen Zellen in der Durchflusszytometrie. Die nicht vitalen Zellen können dank der 7-AAD-Markierung gekennzeichnet und identifiziert werden, während die vitalen Zellen durch eine intakte Membran gegenüber dem 7-AAD-Farbstoff undurchlässig sind und daher nicht markiert werden (d. h. 7-AAD negativ sind) (2).

Das Durchflusszytometer analysiert die Lichtstreuung und die Fluoreszenz der Zellen. Es ermöglicht die Lokalisierung von Zellen innerhalb des elektronischen Fensters, das auf einem Histogramm definiert wird, welches die orthogonale Lichtstreuung (Seitwärtsstreuung oder SW) und die der 7-AAD-Färbung entsprechende Fluoreszenz in Beziehung zueinander setzt. Weitere Histogramme, die zwei der verschiedenen, auf dem Durchflusszytometer verfügbaren Parameter kombinieren, werden ebenfalls in der Gating-Phase verwendet.

Die Fluoreszenz der so abgegrenzten Zellen wird zur Unterscheidung der positiv markierten Ereignisse (nicht vital) von den nicht markierten Ereignissen (vital) analysiert. Die Ergebnisse können in Prozentzahlen nicht fluoreszierender Ereignisse in Bezug auf alle im elektronischen Fenster berücksichtigten Ereignisse ausgedrückt werden.

VORGESEHENER BENUTZER

Dieses Produkt ist für den Einsatz durch Laborfachkräfte vorgesehen.

PROBEN

Venöses Blut muss mit sterilen Röhrchen entnommen werden, die ein EDTA-Salz als Antikoagulanzen enthalten.

Die Proben müssen bei Raumtemperatur (18–25 °C) und ruhend aufbewahrt werden. Vor Durchführung des Tests wird empfohlen, die Probe durch leichtes Schütteln zu homogenisieren.

Die Proben müssen innerhalb von 24 Stunden analysiert werden.

WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Das Reagenz nicht über das Verfallsdatum hinaus verwenden.
2. Nicht einfrieren.
3. Vor der Anwendung auf Raumtemperatur (18–25 °C) erwärmen lassen.
4. Vor Licht schützen.
5. Eine mikrobielle Kontamination der Reagenzien muss vermieden werden, damit kein falsches Ergebnis erzielt wird.
6. Dieses gebrauchsfertige Reagenz enthält 0,005 % (Masse/Volumen) 7-AAD und 1 % (Volumen/Volumen) Dimethylsulfoxid (DMSO).

In der jeweiligen Reinform ist 7-AAD potenziell krebserregend und DMSO ein Reizstoff.

Obgleich diese Bestandteile in der vorliegenden Zusammensetzung in extrem verdünnter Form vorkommen, können sie ihre schädlichen Wirkungen vollumfänglich oder teilweise beibehalten. Niemals mit dem Mund pipettieren und jeden Kontakt mit Haut, Schleimhäuten und Augen vermeiden. Im Umgang mit diesen Reagenzien die Vorsichtsmaßnahmen für deren Verwendung beachten (insbesondere das Tragen von Handschuhen, Kittel und Schutzbrille).

7. 7-AAD ist ein Chromophor, der bei Exposition gegenüber Licht zerfällt. Der Stoff wird in einem lichtundurchlässigen Fläschchen gelagert, um ihn vor dem Gebrauch vor Licht zu schützen.
Vermeiden Sie beim Inkubieren eine dauernde Lichteinstrahlung und reduzieren Sie die Lichtexponierung der Proben nach dem Markieren so stark wie möglich.
8. Blutproben sind als potenziell infektiös zu betrachten und müssen mit Vorsicht gehandhabt werden (insbesondere durch Tragen von Schutzhandschuhen, -kittel und -brille).
9. Blutröhrchen und Einwegmaterial, das zur Handhabung verwendet wird, müssen in dafür vorgesehenen, für die Verbrennung bestimmten Behältern entsorgt werden.

GHS-GEFAHRSTOFFKLASSIFIZIERUNG

7-AAD Viability Dye

ACHTUNG

H316

P332+P313

Verursacht leichte Hautreizungen.

Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Dimethylsulfoxid 0,5 - 1,5 %



Das Sicherheitsdatenblatt ist auf beckman.com/techdocs verfügbar.

LAGERUNG UND STABILITÄT

Der 7-AAD Vitalitätsfarbstoff wird vor und nach Öffnen des Fläschchens zwischen 2 und 8 °C und vor Lichteinstrahlung geschützt aufbewahrt.

Haltbarkeit der geschlossenen Durchstechflasche gemäß Stabilitätsstudie: 730 Tage.

Stabilität geöffneter Fläschchen: Das Reagenz ist 60 Tage lang stabil.

Siehe das chargenspezifische Analysezertifikat unter www.beckman.com.

VERFALLSANZEICHEN

Ein verändertes Aussehen der Reagenzien kann ein Verfallsanzeichen sein. Entsprechende Reagenzien dürfen nicht verwendet werden.

Wenn Sie weitere Informationen wünschen oder falls das Produkt beschädigt bei Ihnen eintrifft, setzen Sie sich (innerhalb der USA und Kanada) unter der Rufnummer 800-742-2345 mit dem Kundendienst von Beckman Coulter bzw. außerhalb dieser Länder mit dem für Sie zuständigen Beckman Coulter-Mitarbeiter in Verbindung.

BENÖTIGTE, JEDOCH NICHT IM KIT ENTHALTENE ARTIKEL:

- Probenahmeröhrchen und für die Probenahme benötigte Materialien.
- Automatische Pipetten und Einweghülsen zur Entnahme folgender Mengen: 20, 100 und 500µL.
- Hämolyseröhrchen aus Kunststoff.
- Lysereagenz für Erythrozyten. Zum Beispiel: IOTest3 Lyselösung (Art. A07799).
- Puffer (PBS: 0,01M Natriumphosphat; 0,145M Natriumchlorid; pH7,2).
- Zentrifuge.
- Automatisches Mischgerät (Typ Vortex-Mischer).
- Durchflusszytometer.

VORBEREITUNG DER PROBEN

Die Leukozytenkonzentration in der Probe muss unter 10^4 Zellen/µL (10^{10} /L) liegen. Falls erforderlich in PBS verdünnen, um die Leukozytenkonzentration auf 5×10^3 Zellen /µL (5×10^9 /L) zu bringen.

Für das Verfahren werden 100 µL einer Probe verwendet, die zuvor in einem Röhrchen oder anderweitig vorverdünnt wurde.

Hinweis:

- Das Justieren der 7-AAD entsprechenden Fluoreszenzintensität kann unter Anwendung der Markierung einer Probe mit frischem Vollblut und nicht vitalen stabilisierten Zellen im selben Röhrchen erfolgen (siehe Abbildung im Anhang). Unter diesen Bedingungen muss die der 7-AAD-Erfassung entsprechende Spannung derart angepasst werden, dass die vitalen Ereignisse (d. h. das frische Vollblut) in einem 7-AAD abhängigen SS-Histogramm in der ersten Dekade erscheinen (siehe Abbildung im Anhang).
- Während des Verfahrens keine permeabilisierenden oder fixierenden Substanzen anwenden, um keine fälschlicherweise positive Markierung hervorzurufen.

VERFAHREN

1. In jedes Teströhrchen 20µL 7-AAD Viability Dye Lösung geben.
2. In beiden Röhrchen 100µL der zu testenden Probe hinzufügen (entspricht ca. 5×10^5 Zellen).
Beide Röhrchen leicht rütteln.
3. 15 bis 20 Minuten bei Raumtemperatur (18–25 °C) und vor Lichteinstrahlung geschützt inkubieren.
4. Anschließend (falls erforderlich) unter Einhaltung der Empfehlungen für das verwendete Lysereagens die Erythrozyten lysieren.

Zum Beispiel bei Anwendung der IOTest3 Lyselösung (Art. A07799) 2mL Arbeitslösung (1X) hinzufügen. Anschließend sofort rütteln und 10 Minuten bei Raumtemperatur und vor Lichteinstrahlung geschützt inkubieren.

Wenn die Probe keine roten Blutkörperchen enthält, keine Lyse durchführen, sondern 0,5 zu 1mL PBS hinzufügen.

5. Die Präparate müssen innerhalb von 1 Stunde analysiert werden.

HINWEIS: Die Proben müssen zwischen 2 und 8 °C und vor Lichteinstrahlung geschützt aufbewahrt werden.

LEISTUNG

SPEZIFITÄT

Actinomycine sind aktive biologische Bestandteile, die aus einem Chromophor (2-Amino-4,6Dimethylphenoxazon-3) et zyklischen Pentapeptiden bestehen (3). Es handelt sich dabei um Antibiotika bakterieller Herkunft, die historisch gesehen für Boden-Ascomyceten kennzeichnend sind. Actinomycine bilden mit doppelsträngiger Desoxyribonucleinsäure (DNA) stabile Komplexe, jedoch nicht mit doppelsträngiger Ribonucleinsäure (RNA), RNA-DNA-Hybriden oder einsträngiger DNA bzw. RNA.

Durch die Spektraleigenschaften des 7-AAD Vitalitätsfarbstoffs eignet sich dieses Molekül besonders für die Durchflusszytometrie (3). Die maximale Absorption des 7-AAD/DNA-Komplexes ist für die blaue 488nm Anregungswellenlänge der mit Argonlaser (4) ausgestatteten Zytometer geeignet. Die tiefrote Fluoreszenzemission (635bis675nm) des 7-AAD/DNA-Komplexes ermöglicht eine optimale Anwendung dieser Sonde zusammen mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und R-Phycoerythrin (PE)-konjugierten Antikörpern (3). Im Gegensatz zu Propidiumiodid (PI), einer anderen fluoreszierenden Sonde zum Markieren der DNA weist der 7-AAD/DNA-Komplex eine geringere Überlappung des Emissions-spektrums mit FITC und PE auf.

PRÄZISION

Die prozentualen positiven Werte wurden unter Verwendung von mit positiven Zellen angereichertem Vollblut bestimmt. Jede Probe wurde zweimal täglich 1 Tag lang unter Verwendung von 2 Chargen des Reagenzes 7-AAD-Viabilitätsfarbstoff 4 Mal auf 2 Instrumenten analysiert. Messungen (% positiv) wurden mit dem Navios-Durchflusszytometer vorgenommen. Die Analyse erfolgte gemäß CLSI-Methode EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Beurteilung der Präzisionsleistung von quantitativen Messmethoden).

Unsere Akzeptanzkriterien sind abhängig von der Anzahl an positiven Ereignissen, die für jede Population gemessen werden:

- Wenn positives Ereignis < 1 500, VK < 15 %
- Wenn positives Ereignis > 1 500, VK < 10 %

IOTest 3-Lyselösung:

Mit HPBALL-Zelllinie angereichertes Vollblut							
Anzahl der positiven Ereignisse (Mittelwert) = 5539							
	Zwischen Bedienern	Zwischen Durchflusszytometern	Innerhalb einer Charge	Zwischen Chargen	Zwischen Läufen	Innerhalb eines Laufs	Gesamt
VK (%)	1,48	1,55	4,44	1,41	2,87	3,05	4,91
ERGEBNISSE	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

VersaLyse-Lysesystem:

Mit HPBALL-Zelllinie angereichertes Vollblut							
Anzahl der positiven Ereignisse (Mittelwert) = 4034							
	Zwischen Bedienern	Zwischen Durchflusszytometern	Innerhalb einer Charge	Zwischen Chargen	Zwischen Läufen	Innerhalb eines Laufs	Gesamt
VK (%)	3,73	1,85	8,74	1,79	3,63	7,02	9,11
ERGEBNISSE	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

GENAUIGKEIT

Die Genauigkeit des 7-AAD-Viabilitätsfarbstoffs wurde anhand eines Vergleichs der Ergebnisse mit einem Referenzreagenz als Prädikat für einen Satz aus mit positiven Zellen angereicherten Vollblutproben bewertet, die auf einem

NAVIOS-Durchflussszytometer analysiert wurden. Die Abweichung zwischen Test- und Referenzreagenz wurde basierend auf der Differenz zwischen den Testergebnissen bestimmt. Sollte die Abweichung innerhalb des zulässigen Fehlerbereichs liegen oder der p-Wert keine signifikante Differenz ($> 0,05$) nahelegen, gelten die Testergebnisse für die Patientenproben mit den beiden Reagenzien als gleichwertig.

Die erzielten Ergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst:

IOTest 3-Lyselösung:

Anzahl der Spender = 25				
Positives Ziel	Mittelwert Δ	Δ % Zellkriterien	p-Wert	ERGEBNISSE
Mit HPBALL-Zelllinie angereichertes Vollblut	0,31	<5	0,247	PASS

VersaLyse-Lysesystem:

Anzahl der Spender = 25				
Positives Ziel	Mittelwert Δ	Δ % Zellkriterien	p-Wert	ERGEBNISSE
Mit HPBALL-Zelllinie angereichertes Vollblut	-0,34	<5	0,289	PASS

EINSCHRÄNKUNGEN

1. Die Durchflussszytometrie kann falsche Ergebnisse liefern, wenn das Zytometer nicht perfekt ausgerichtet wurde, wenn Fluoreszenzlecks nicht korrekt kompensiert wurden und wenn die Bereiche nicht sorgfältig positioniert wurden.
2. Genaue und reproduzierbare Ergebnisse werden erzielt, sofern die verwendeten Verfahren der technischen Packungsbeilage entsprechen und mit der guten Laborpraxis kompatibel sind.
3. Der Wirkstoff 7-AAD dieses Reagenzes wurde so optimiert, dass das beste Verhältnis zwischen spezifischem und unspezifischem Signal erzielt wird. Deshalb ist es wichtig, das Verhältnis Reagenz-/Probenvolumen in jedem Test einzuhalten.
4. Bei einer Hyperleukozytose die Probe in PBS verdünnen, so dass man einen Wert von ca. 5×10^9 Leukozyten/L erhält.
5. Bei manchen Pathologien wie z.B. schwerer Niereninsuffizienz oder Hämoglobinopathien kann die Lyse der roten Blutkörperchen verlangsamt, unvollständig oder sogar unmöglich sein. In diesem Fall wird empfohlen, die einkernigen Zellen vor dem Markieren durch einen Dichtegradienten (z. B. Ficoll) zu isolieren.

Beispiele und Literaturhinweise siehe Anhang.

MARKEN

Beckman Coulter, das stilisierte Logo und die in diesem Dokument erwähnten Beckman Coulter-Produkt- und Dienstleistungsmarken sind in den USA und anderen Ländern Marken oder eingetragene Marken von Beckman Coulter, Inc.

WEITERE INFORMATIONEN

Für einen Patienten/Benutzer/Dritten in der Europäischen Union und in Ländern mit identischer Regulierungspraxis (Verordnung 2017/746/EU über In-vitro-Diagnostika) gilt Folgendes: Sollte es im Rahmen der Verwendung dieses Produktes oder infolge der Verwendung dieses Produktes zu einem schwerwiegenden Zwischenfall gekommen sein, ist dieser dem Hersteller und/oder dessen Bevollmächtigten sowie der nationalen Behörde zu melden.

REVISIONSVERLAUF

REVISION AF:	Freigabedatum: Oktober 2021
REVISION AW:	Freigabedatum: April 2022
Aktualisierungen vorgenommen, um den Vorgaben der globalen Etikettierungsrichtlinie von Beckman Coulter und den Vorgaben nach IVD-R (EU) 2017/746 zu entsprechen:	
Abschnitte hinzugefügt	Vorgesehener Benutzer, Konzentration, Präzision, Genauigkeit, Weitere Informationen, Revisionsverlauf
Informationen hinzugefügt	Siehe Abschnitt Prinzip
Aktualisierte Abschnitte	Prinzip, Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen, GHS-Gefahrstoffklassifizierung, Lagerung und Stabilität, Verfallsanzeichen, Einschränkungen, Anhang
Abschnitte gestrichen	Methode, Beispiele klinischer Anwendungen, Erwartete Ergebnisse, Reproduzierbarkeit innerhalb eines Labors, Linearität
REVISION	Freigabedatum
AX	Oktober 2022
Aktualisierte Abschnitte	Übersetzungen hinzugefügt

REVISION	Freigabedatum
AY	
Aktualisierte Abschnitte	Lagerung und Stabilität

Liste der Symbole

Das Glossar der Symbole ist auf beckman.com/techdocs (Dokumentnummer B60062) verfügbar.



	Caratteristiche Colorante Vitale 7-AAD Viability Dye
Forma	Liquido
Volume	3 mL
Calibrazione	Pronto all'uso
Eccitazione λ	488 nm
Picco d'emissione	655 nm (complesso con l'ADN a doppio filamento)

7-AAD - Colorante di vitalità cellulare

REF A07704 150 test; 3 mL, 20 μ L/test

Per uso diagnostico *in vitro*

USO PREVISTO

Il Colorante Vitale 7-AAD Viability Dye è un marcatore chimico sotto forma di soluzione indicato per l'analisi mono o multiparametrica in citometria a flusso. Esso consente di identificare le cellule non vitali e di distinguerle da quelle interessate (vitali) durante l'analisi dei leucociti umani.

PRINCIPIO

Il Colorante 7-Amino-Actinomicina D (7-AAD), è un composto analogo all'actinomicina che contiene un gruppo ammino sostituito nel cromoforo alla posizione 7. Il 7-AAD s'intercala tra le basi Citosina / Guanina del DNA (1).

La marcatura del DNA a doppio filamento avviene incubando il campione con il reagente 7-AAD Viability Dye. Successivamente, gli eritrociti vengono eliminati tramite lisi e i leucociti analizzati in citometria a flusso.

Le cellule apoptotiche, necrotiche e/o danneggiate costituiscono fonti d'interferenza nell'analisi delle cellule vitali in citometria a flusso. Le cellule non vitali possono essere caratterizzate e identificate mediante la marcatura con il Colorante 7-AAD, mentre le cellule vitali, che conservano l'integrità di membrana, sono impermeabili al 7-AAD e non risultano marcate (ossia 7-AAD negative) (2).

Il citometro a flusso analizza la diffusione di luce e la fluorescenza delle cellule. Rende possibile la localizzazione delle cellule all'interno della finestra elettronica definita su un istogramma, che mette in relazione la diffusione ortogonale della luce (scatter laterale o SS) e la fluorescenza corrispondente alla colorazione di 7-AAD. Altri istogrammi che uniscono due dei vari parametri disponibili sul citometro vengono usati nella fase di gating.

La fluorescenza delle cellule circoscritte viene analizzata per escludere le cellule marcate (non vitali) da quelle non marcate (vitali). I risultati sono espressi in percentuale di eventi non fluorescenti rispetto all'insieme degli eventi acquisiti dal gating.

UTENTE PREVISTO

Questo prodotto è destinato all'uso professionale in laboratorio.

CAMPIONI

I campioni di sangue venoso devono essere prelevati utilizzando provette sterili contenenti un sale EDTA come anticoagulante.

I campioni vanno conservati a temperatura ambiente (18–25 °C) senza agitare. Prima di effettuare il test, si raccomanda di omogeneizzare il contenuto della provetta agitandola leggermente.

I campioni devono essere analizzati entro 24 ore dalla venipuntura.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Non utilizzare il reagente oltre la data di scadenza.
2. Non congelare.
3. Attendere che il flacone raggiunga la temperatura ambiente (18–25 °C) prima di utilizzarlo.
4. Ridurre al minimo l'esposizione alla luce.
5. Evitare la contaminazione microbica dei reagenti, poiché potrebbe falsare i risultati.
6. Questo reagente pronto all'uso contiene lo 0,005% (peso/volume) di 7-AAD e l'1% (volume/volume) di dimetilsolfossido (DMSO).

In forma pura, il 7-AAD è potenzialmente cancerogeno e il DMSO è irritante.

Anche se estremamente diluiti nella presente formulazione, questi costituenti possono mantenere tutti o parte dei loro effetti nocivi. Non pipettare mai usando la bocca ed evitare il contatto con la pelle, le mucose e gli occhi. Utilizzare questi reagenti seguendo le precauzioni d'uso (in particolare: indossare guanti, camice e occhiali protettivi).

7. 7-AAD è un cromoforo soggetto a degradazione per esposizione alla luce. Viene conservato in una fiala opaca per proteggerlo dalla luce prima dell'uso.

Evitare un'esposizione prolungata alla luce durante le fasi di incubazione e ridurre l'esposizione dei campioni, una volta effettuata la marcatura.

8. Tutti i campioni di sangue devono essere considerati potenzialmente infetti e devono essere maneggiati con cura (in particolare, indossando guanti, camici e occhiali protettivi).
9. Le provette per il sangue e i materiali monouso usati per la manipolazione devono essere smaltiti in appositi contenitori destinati all'inceneritore.

CLASSIFICAZIONE DEI PERICOLI GHS

7-AAD Viability Dye

ATTENZIONE

H316

P332+P313

Provoca leggera irritazione cutanea.

In caso di irritazione della pelle: consultare un medico.

Dimetilsolfossido 0,5 - 1,5%



La scheda tecnica sulla sicurezza è disponibile all'indirizzo beckman.com/techdocs

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Il Colorante 7-AAD Viability Dye si conserva a una temperatura compresa tra i 2 e gli 8 °C e al riparo dalla luce, prima e dopo l'apertura del flacone.

Durata di conservazione della fiala chiusa secondo studi di stabilità: 730 giorni.

Stabilità di una fiala aperta: il reagente è stabile per 60 giorni.

Vedere il Certificato di analisi specifico del lotto sul sito www.beckman.com.

INDICI DI DETERIORAMENTO

Qualsiasi cambiamento dell'aspetto fisico dei reagenti può indicare un deterioramento. In tale caso, non utilizzare il reagente.

Per ulteriori informazioni, o nel caso in cui il prodotto ricevuto risulti danneggiato, rivolgersi all'assistenza clienti Beckman Coulter al numero 800-742-2345 (USA o Canada) o mettersi in contatto con il rappresentante locale Beckman Coulter.

COMPONENTI NECESSARI MA NON FORNITI CON IL KIT:

- Provette per campioni e materiale necessario per il campionamento.
- Pipette automatiche e puntali usa e getta destinati a prelevare quantità di 20, 100 e 500 µL.
- Provette per emolisi in plastica.
- Reagente di lisi degli eritrociti. A titolo di esempio: Soluzione di Lisi IOTest3 (Rif. A07799).
- Tampone (PBS: 0,01 M fosfato di sodio; 0,145 M cloruro di sodio; pH 7,2).
- Centrifugare.
- Agitatore automatico (tipo Vortex).
- Citometro a flusso.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

La concentrazione di leucociti nel campione deve essere inferiore a 10^4 cellule / µL ($10^{10}/L$). Se necessario, diluire in una piccola quantità di PBS per riportare la concentrazione leucocitaria a 5×10^3 cellule / µL ($5 \times 10^9/L$).

La procedura utilizza 100 µL di un campione, prediluito in provetta o in altra forma.

N.B.:

- L'adeguamento dell'intensità della fluorescenza corrispondente al Colorante 7-AAD può essere effettuato utilizzando la marcatura di un campione di sangue intero fresco e di cellule stabilizzate non-vitali nella stessa provetta (vedere la figura nell'allegato). In queste condizioni, il voltaggio corrispondente al rilevamento del Colorante 7-AAD deve essere adeguato in modo tale che le cellule vitali (ovvero il sangue intero fresco) appaiano sulla prima decade dell'istogramma SS in funzione di 7-AAD (vedere l'illustrazione nell'allegato).
- Non utilizzare reagenti contenenti elementi permeabilizzanti o fissanti nel corso della procedura al fine di evitare qualsiasi marcatura positiva dovuta ad artefatto.

PROCEDURA

1. In ogni provetta test, aggiungere 20 µL della soluzione di 7-AAD Viability Dye.
2. Aggiungere 100 µL del campione da testare, ovvero l'equivalente di circa 5×10^5 cellule.
Agitare delicatamente al vortex.

3. Incubare per 15 - 20 minuti a temperatura ambiente (18–25 °C) e al riparo dalla luce.
4. Eseguire quindi la lisi degli eritrociti, se necessario, attenendosi alle seguenti raccomandazioni del reagente per lisi utilizzato.
A titolo di esempio, qualora si desiderasse utilizzare la Soluzione di Lisi IOTest3 (Rif. A07799), aggiungere 2mL di soluzione di lavoro (1X), agitare immediatamente e incubare per 10 minuti a temperatura ambiente e al riparo dalla luce.
Se il campione non contiene globuli rossi, non eseguire la fase di lisi, ma aggiungere 0,5 a 1mL di PBS.
5. I preparati devono essere analizzati entro 1 ora.

N.B.: In ogni caso, conservare i preparati a una temperatura compresa tra i 2 e gli 8 °C e al riparo dalla luce.

PRESTAZIONI

SPECIFICITÀ

Le actinomicine sono sostanze biologicamente attive contenenti un cromoforo (2-Amino-4, 6 Dimetilfenossazone-3) e pentapeptidi ciclici (3). Si tratta di antibiotici di origine batterica storicamente ricavati dagli ascomiceti del suolo. Le actinomicine formano complessi stabili con l'acido desossiribonucleico (DNA) a doppio filamento, ma non con l'acido ribonucleico (RNA) a doppio filamento, né con gli ibridi RNA-DNA o con il DNA o l'RNA a singolo filamento.

Le proprietà spettrali della molecola 7-AAD la rendono particolarmente adatta all'analisi in citometria a flusso (3). L'assorbimento massimo del complesso 7-AAD / DNA è compatibile con la lunghezza d'onda di eccitazione blu di 488nm dei citometri dotati di laser argon (4). Il picco di emissione di fluorescenza del complesso 7-AAD / DNA nel rosso profondo (da 635 a 675nm) consente un utilizzo ottimale della sonda in combinazione con gli anticorpi coniugati all'Isotiocianato di Fluorescina (FITC) e alla R FFicoeritrina (PE) (3). Contrariamente allo ioduro di propidio (IP), un'altra sonda fluorescente utilizzata come marcatore del DNA, il complesso 7-AAD / DNA, presenta un segnale ridotto di sovrapposizione dello spettro di emissione con il FITC e la PE.

PRECISIONE

I valori percentuali positivi sono stati determinati utilizzando sangue intero corretto con cellule positive. Ogni campione è stato analizzato 4 volte, due volte al giorno per 1 giorno su 2 strumenti utilizzando 2 lotti di reagente colorante di vitalità 7-AAD. Le misurazioni (% di positivi) sono state effettuate su un citometro a flusso Navios. L'analisi è stata condotta secondo il metodo EP5-A2 del CLSI: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Valutazione delle prestazioni di precisione dei metodi di misurazione quantitativa).

I nostri criteri di accettazione dipendono dal numero di eventi positivi misurati per ogni popolazione:

- Se evento positivo < 1.500, CV < 15%
- Se evento positivo > 1.500, CV < 10%

Soluzione lisante IOTest 3:

Sangue intero corretto con HPBALL linea cellulare							
Numero di eventi positivi (media) = 5539							
	Inter-operatore	Inter-citometro	Intra-lotto	Inter-lotto	Inter-analisi	Intra-analisi	Totale
CV (%)	1,48	1,55	4,44	1,41	2,87	3,05	4,91
RISULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Sistema di lisi VersaLyse:

Sangue intero corretto con HPBALL linea cellulare							
Numero di eventi positivi (media) = 4034							
	Inter-operatore	Inter-citometro	Intra-lotto	Inter-lotto	Inter-analisi	Intra-analisi	Totale
CV (%)	3,73	1,85	8,74	1,79	3,63	7,02	9,11
RISULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

ACCURATEZZA

L'accuratezza del colorante di vitalità 7-AAD è stata valutata confrontando i risultati con un reagente di riferimento come predicato su una serie di campioni di sangue intero corretto con cellule positive eseguiti su un citometro NAVIOS. La distorsione tra il test e il reagente di riferimento è stata determinata in base alla differenza tra i risultati dei test. Se la distorsione rientra nell'intervallo di errore consentito o il valore p indica che non vi è una differenza significativa (> 0,05), allora i risultati dei test dei campioni paziente per i due reagenti sono considerati equivalenti.

I risultati ottenuti sono riepilogati nella tabella seguente:

Soluzione lisante IOTest 3:

Numero di donatori = 25				
Target positivo	Δ medio	Criteri cellulari Δ %	Valore p	RISULTATI
Sangue intero corretto con HPBALL linea cellulare	0,31	<5	0,247	PASS

Sistema di lisi VersaLyse:

Numero di donatori = 25				
Target positivo	Δ medio	Criteri cellulari Δ %	Valore p	RISULTATI
Sangue intero corretto con HPBALL linea cellulare	-0,34	<5	0,289	PASS

LIMITAZIONI

1. La citometria a flusso può produrre falsi risultati se il citometro non viene allineato perfettamente, le perdite di fluorescenza non vengono correttamente compensate e le regioni non vengono posizionate attentamente.
2. Seguendo le procedure descritte nel foglietto illustrativo con le informazioni tecniche, compatibili con le buone pratiche di laboratorio, è possibile ottenere risultati accurati e riproducibili.
3. Il 7-AAD, principio attivo di questo reagente, è calibrato in modo tale da offrire il miglior rapporto possibile in termini di segnale specifico / segnale non specifico. È dunque importante mantenere per ogni test il rapporto volume del reagente/volume del campione.
4. In caso di iperleucocitosi, diluire il campione in un po' di PBS fino a ottenere un valore intorno a 5×10^9 leucociti/L.
5. Nel corso di determinate patologie, come le insufficienze renali gravi o le emoglobinopatie, la lisi dei globuli rossi può risultare rallentata, se non addirittura incompleta o impossibile. In questo caso, è consigliabile isolare le cellule mononucleate mediante gradiente di densità (ad esempio: Ficoll) prima della marcatura.

Per esempi e riferimenti, vedere l'appendice.

MARCHI COMMERCIALI

Beckman Coulter, il logo stilizzato ed i marchi commerciali dei prodotti e servizi di Beckman Coulter menzionati qui, sono marchi commerciali o marchi commerciali registrati di Beckman Coulter, Inc., negli Stati Uniti e in altri paesi.

INFORMAZIONI AGGIUNTIVE

Per un paziente/utente/terza parte nell'Unione Europea e in paesi con identico regime normativo (Regolamento 2017/746/UE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro): se, durante l'utilizzo di questo dispositivo o in seguito al suo utilizzo, si fosse verificato un incidente grave, si prega di segnalarlo al produttore e/o al suo rappresentante autorizzato e all'autorità nazionale competente.

CRONOLOGIA REVISIONI

REVISIONE AF:	Data di pubblicazione: Ottobre 2021
REVISIONE AW:	Data di pubblicazione: aprile 2022
Aggiornamenti conformi alla politica sull'etichettatura globale di Beckman Coulter e ai requisiti IVD-R (UE)2017/746:	
Sezioni aggiunte	Utilizzatore previsto, Concentrazione, Precisione, Accuratezza, Informazioni aggiuntive, Cronologia revisioni
Aggiunta di informazioni	Vedere le sezioni Principio
Sezioni aggiornate	Principio, Avvertenze e precauzioni, Classificazione pericoli GHS, Conservazione e stabilità, Segni di deterioramento, Limiti, Appendice
Sezioni rimosse	Metodologia, Esempi di applicazione clinica, Risultati attesi, Riproducibilità intralaboratorio, Linearità
REVISIONE	Data di pubblicazione
AX	Ottobre 2022
Sezioni aggiornate	Aggiunta di traduzioni
REVISIONE	Data di pubblicazione
AY	
Sezioni aggiornate	Conservazione e stabilità

Legenda dei simboli

Il Glossario dei simboli è disponibile all'indirizzo beckman.com/techdocs (documento numero B60062)

	Especificaciones Marcador de Viabilidad 7-AAD Viability Dye
Forma	Líquido
Volumen	3 mL
Calibración	Listo para su empleo
Excitación λ	488 nm
Pico de emisión	655 nm (complejo con el ADN bicatenario)

Colorante 7-AAD - Viabilidad celular

REF A07704 150 pruebas; 3 mL,
20 μ L/prueba

Para uso diagnóstico *in vitro*

USO PREVISTO

El Marcador de Viabilidad 7-AAD Viability Dye es un colorante químico en solución adaptado al análisis mono o multiparamétrico por citometría de flujo. Permite identificar las células no viables y excluirlas de las células de interés (viables) en el análisis de leucocitos humanos.

PRINCIPIO

El 7-Amino-Actinomicina D (7-AAD), es un análogo de la actinomicina que contiene una agrupación amina substituida en posición 7 del cromóforo. El 7-AAD se intercala entre las capas de bases citosina / guanina del ADN (1).

El marcaje del ADN bicatenario se realiza incubando la muestra con el reactivo 7-AAD Viability Dye. Los eritrocitos son eliminados a continuación por lisis, y los leucocitos son analizados por citometría de flujo.

Las células apoptóticas, necróticas y/o dañadas son fuente de interferencias en el análisis de células viables por citometría de flujo. Las células no viables pueden caracterizarse e identificarse al estar marcadas por el 7-AAD, mientras que las células vivas que conservan su integridad membranaria son impermeables al 7-AAD y no llegan a marcarse (7-AAD negativas) (2).

El citómetro de flujo analiza la dispersión de la luz y la fluorescencia de las células. Permite localizar las células dentro de una ventana electrónica, definida en un histograma que correlaciona la dispersión lateral de luz (Side Scatter o SS) con la fluorescencia correspondiente a la tinción con 7-AAD. En la fase de selección también se utilizan otros histogramas que combinan dos de los distintos parámetros disponibles en el citómetro.

La fluorescencia de las células así acotadas se analiza para distinguir los eventos con tinción positiva (no viables) de los eventos no marcados (viables). Los resultados se pueden expresar en porcentaje de eventos no fluorescentes con relación al conjunto de los eventos acotados en la selección electrónica por ventanas.

USUARIO PREVISTO

Este producto está diseñado para su uso en un laboratorio profesional.

MUESTRAS

La sangre venosa debe recogerse en tubos de muestra estériles que contengan una sal de EDTA como anticoagulante.

Las muestras se conservan a temperatura ambiente (18–25°C) sin agitación. Antes de efectuar el análisis de la muestra, se recomienda homogeneizarla mediante agitación suave.

Las muestras deben analizarse en el plazo de 24 horas tras la venopunción.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. No use el reactivo después de la fecha de caducidad.
2. No lo congele.
3. Esperar a que esté a la temperatura ambiente (18–25 °C) antes de utilizarlo.
4. Minimice el tiempo de exposición a la luz.
5. Evite la contaminación microbiana de los reactivos, ya que esto puede provocar resultados falsos.
6. Este reactivo listo para usar contiene 0,005 % (peso/volumen) de 7-AAD y 1 % (volumen/volumen) de dimetilsulfóxido (DMSO).

En su forma pura, el 7-AAD es potencialmente cancerígeno y el DMSO es irritante.

Aunque están muy diluidos en la presente formulación, estos componentes pueden conservar todos o parte de sus efectos perjudiciales. No pipetear nunca con la boca y evitar todo contacto con la piel, las mucosas y los ojos. Usar estos reactivos siguiendo las precauciones de uso (especialmente: guantes, bata y gafas protectoras).

7. El 7-AAD es un cromóforo sujeto a degradación por exposición a la luz. Se conserva en un vial opaco para protegerlo de la luz antes de su uso.

Evitar una exposición continua a la luz durante las etapas de incubación y reducir la exposición a la luz de las muestras una vez realizado el marcaje.

8. Todas las muestras sanguíneas deben considerarse posiblemente infecciosas y deben manipularse con cuidado (en especial, hay que llevar guantes, bata y gafas de protección).
9. Los tubos para sangre y el material desechable utilizados para la manipulación deben eliminarse en recipientes especiales previstos para la incineración.

CLASIFICACIÓN DE MATERIAL PELIGROSO SEGÚN EL SGA

7-AAD Viability Dye

ATENCIÓN

H316

P332+P313

Provoca irritación cutánea leve.

En caso de irritación cutánea: consultar a un médico.

Dimetilsulfóxido 0,5 - 1,5 %



La hoja de datos de seguridad está disponible en beckman.com/techdocs

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

El 7-AAD Viability Dye se conserva entre 2 y 8 °C en un lugar protegido de la luz, antes y después de abrir el frasco.

Vida útil del vial cerrado según estudio de estabilidad: 730 días.

Estabilidad del vial abierto: el reactivo es estable durante 60 días.

Consulte el certificado de análisis específico del lote en www.beckman.com.

SIGNOS DE DETERIORO

Cualquier cambio en el aspecto físico de los reactivos puede indicar un deterioro, por lo que no debe utilizarse el reactivo.

Para obtener información adicional o si el producto está dañado, llame al servicio de atención al cliente de Beckman Coulter en el 800-742-2345 (EE. UU. o Canadá) o póngase en contacto con su representante local de Beckman Coulter.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS CON EL KIT:

- Tubos y material de muestras necesarios para el muestreo.
- Pipetas automáticas y puntas desechables para volúmenes de 20,100 y 500µL.
- Tubos de hemólisis de plástico.
- Reactivo de lisis de los eritrocitos. Por ejemplo: Solución de Lisis IOTest3 (Ref. A07799).
- Tampón (PBS: fosfato sódico 0,01M; cloruro sódico 0,145 M; pH 7,2).
- Centrífuga.
- Agitador automático (tipo vórtex).
- Citómetro de flujo.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

La concentración de leucocitos en la muestra debe ser inferior a 10^4 células/µL (10^{10} /L). Diluir si fuera necesario en el PBS para llevar la concentración leucocitaria a 5×10^3 células/µL (5×10^9 /L).

El procedimiento utiliza 100 µL de una muestra, tubo prediluido o de otro modo.

Advertencia:

- El ajuste de la intensidad de la fluorescencia correspondiente al 7-AAD puede efectuarse utilizando el marcaje de una muestra de sangre entera fresca y de células estabilizadas no viables en el mismo tubo (ver la imagen en el anexo). Con estas condiciones, el voltaje correspondiente a la detección del 7-AAD debe ajustarse de modo que los eventos viables (es decir, la sangre entera fresca) aparezcan en la primera década de un histograma SS en función de 7-AAD (ver la ilustración en el anexo).
- No utilizar ningún reactivo que contenga agentes permeabilizantes o de fijación durante el procedimiento, con el fin de no inducir un marcaje aparentemente positivo.

PROCEDIMIENTO

1. En cada tubo determinación, dispensar 20µL de la solución de 7-AAD Viability Dye.
2. Añadir 100µL de la muestra que debe determinarse, es decir el equivalente de 5×10^5 aproximadamente de células. Mezclar suavemente en el Vórtex.
3. Incubar 15 a 20 minutos a temperatura ambiente (18–25 °C) y en un lugar protegido de la luz.

4. A continuación, realice la lisis de los eritrocitos siguiendo las recomendaciones del reactivo de lisis utilizado.
 Por ejemplo, si se desea utilizar la Solución de Lisis IOTest3 (Ref. A07799), añadir 2mL de la solución de trabajo (1X). Mezclar inmediatamente en el Vórtex e incubar 10 minutos a temperatura ambiente y en un lugar protegido de la luz.
 Si la muestra no contiene glóbulos rojos, no efectuar la etapa de lisis y añadir 0,5 a 1mL de PBS.
5. Las preparaciones deben analizarse dentro de 1 hora.

Advertencia: Conservar las preparaciones entre 2–8 °C en un lugar protegido de la luz

RENDIMIENTO
ESPECIFICIDAD

Las actinomicinas son constituyentes biológicos activos compuestos de un cromóforo (2-Amino-4,6Dimetilfenoxazono-3) y de pentapéptidos cíclicos (3). Se trata de antibióticos de origen bacteriano históricamente caracterizados en los ascomicetos del suelo. Las actinomicinas forman complejos estables con el ácido desoxiribonucleico (ADN) bicatenario, pero no forman este tipo de complejo, ni con el ácido ribonucleico (ARN) bicatenario, ni con los híbridos ARN-ADN, ni con el ADN o el ARN monocatenarios.

Las propiedades espectrales del 7-AAD lo convierten en una molécula especialmente adaptada para el análisis por citometría de flujo (3). La absorción máxima del complejo 7-AAD/ADN es compatible con la longitud de onda de excitación azul de 488nm de los citómetros equipados con láser argón (4). El pico de emisión de fluorescencia en el rojo profundo (de 635a675nm) del complejo 7-AAD/ADN permite una utilización óptima de esta sonda cuando se combina con anticuerpos conjugados al Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) y a la R Ficoeritrina (PE) (3). En efecto y contrariamente al yoduro de propidium (IP), que es otra sonda fluorescente utilizada como marcador del ADN, el complejo 7-AAD/ADN presenta una imbricación reducida del espectro de emisión con el FITC y la PE.

PRECISIÓN

Los valores positivos porcentuales se determinaron usando sangre total enriquecida con células positivas. Cada muestra se procesó 4 veces, dos veces al día durante 1 día en 2 instrumentos utilizando 2 lotes de reactivos de colorante de viabilidad 7-AAD. Las mediciones (% de positivos) se realizaron en un citómetro de flujo Navios. El análisis se realizó según el método EP5-A2 del CLSI: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Evaluación del rendimiento de la precisión de los métodos de medición cuantitativos).

Nuestro criterio de aceptación depende del número de eventos positivos determinado en cada población:

- Si el número de eventos positivos es < 1500, CV < 15 %
- Si el número de eventos positivos es > 1500, CV < 10 %

Solución de lisado IOTest 3:

Sangre total enriquecida con la línea celular HPBALL							
Número de eventos positivos (media) = 5539							
	Entre operadores	Entre citómetros	Intralote	Entre lotes	Entre análisis	Intraanálisis	Total
CV (%)	1,48	1,55	4,44	1,41	2,87	3,05	4,91
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Sistema de lisis VersaLyse:

Sangre total enriquecida con la línea celular HPBALL							
Número de eventos positivos (media) = 4034							
	Entre operadores	Entre citómetros	Intralote	Entre lotes	Entre análisis	Intraanálisis	Total
CV (%)	3,73	1,85	8,74	1,79	3,63	7,02	9,11
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

EXACTITUD

La exactitud del colorante de viabilidad 7-AAD se evaluó comparando los resultados con un reactivo de referencia como valor previsto en un conjunto de muestras de sangre total enriquecidas con células positivas procesadas en un citómetro NAVIOS. El sesgo entre la muestra problema y el reactivo de referencia se determinó en función de la diferencia entre los resultados de la prueba. Si el sesgo está dentro del intervalo de error permitido o el valor p indica una diferencia no significativa (> 0,05), entonces los resultados de la prueba de las muestras de los pacientes con los dos reactivos se consideran equivalentes.

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla que se muestra a continuación:

Solución de lisado IOTest 3:

Número de donantes = 25				
Objetivo positivo	Δ medio	Criterios de Δ % de células	Valor p	RESULTADOS
Sangre total enriquecida con la línea celular HPBALL	0,31	<5	0,247	PASS

Sistema de lisis VersaLyse:

Número de donantes = 25				
Objetivo positivo	Δ medio	Criterios de Δ % de células	Valor p	RESULTADOS
Sangre total enriquecida con la línea celular HPBALL	-0,34	<5	0,289	PASS

LIMITACIONES

1. La citometría de flujo puede producir resultados falsos si el citómetro no se ha alineado a la perfección, si las fugas de fluorescencia no se han compensado correctamente y si las regiones no se han colocado con atención.
2. Se obtendrán resultados exactos y reproducibles siempre que los procedimientos utilizados sean conformes al folleto técnico y compatibles con las prácticas correctas de laboratorio.
3. El 7-AAD, principio activo de este reactivo, se ha calibrado para ofrecer la mejor relación señal específica/señal inespecífica. Por ello, es importante respetar la proporción entre el volumen de reactivo y el volumen de muestra en cada determinación.
4. En caso de hiperleucocitosis, se debe diluir la muestra en PBS para obtener un valor situado en torno a 5×10^9 leucocitos/L.
5. En ciertas patologías, como las insuficiencias renales graves o las hemoglobinopatías, la lisis de los eritrocitos puede ser parcial o imposible. En tales casos, se recomienda aislar las células mononucleares por gradiente de densidad (por ejemplo: Ficoll) antes del marcaje.

Consulte el anexo para ver ejemplos y referencias.

MARCAS COMERCIALES

Beckman Coulter, el logotipo estilizado y las marcas de productos y servicios de Beckman Coulter aquí mencionadas son marcas comerciales o marcas comerciales registradas de Beckman Coulter, Inc. en Estados Unidos y otros países.

INFORMACIÓN ADICIONAL

Para pacientes/usuarios/terceros de la Unión Europea y países con el mismo régimen normativo (Reglamento 2017/746/UE sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro); si, durante el uso de este dispositivo o como resultado de su uso, se produjese un incidente grave, informe al fabricante y/o a su representante autorizado y a la autoridad nacional.

HISTORIAL DE REVISIONES

REVISIÓN AF:	Fecha de publicación: Octubre de 2021
REVISIÓN AW:	Fecha de publicación: Abril de 2022
Actualizaciones para cumplir con la política de etiquetado global de Beckman Coulter y conforme a los requisitos del Reglamento (UE)2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro:	
Se han añadido secciones	Usuario previsto, Concentración, Precisión, Exactitud, Información adicional, Historial de revisiones
Información añadida	Véase la sección Principio
Se han actualizado las secciones	Principio, Advertencias y precauciones, Clasificación de material peligroso según el SGA, Conservación y estabilidad, Signos de deterioro, Limitaciones, Anexo
Se han eliminado secciones	Metodología, Ejemplos de aplicaciones clínicas, Resultados esperados, Reproducibilidad intralaboratorio, Linealidad
REVISIÓN	Fecha de publicación
AX	Octubre de 2022
Se han actualizado las secciones	Traducciones añadidas
REVISIÓN	Fecha de publicación
AY	
Se han actualizado las secciones	Conservación y Estabilidad

Lista de símbolos

El glosario de símbolos está disponible en beckman.com/techdocs (número de documento B60062)

	Especificações Corante de Viabilidade 7-AAD Viability Dye
Formulação	Líquido
Volume	3 mL
Calibração	Pronto a usar
λ de excitação	488 nm
Pico da Emissão	655 nm (complexado com DNA de cadeia dupla)

Corante 7-AAD para verificação de viabilidade

REF A07704 150 testes; 3 mL, 20 μ L/teste

Para fins de diagnóstico *in vitro*

UTILIZAÇÃO PREVISTA

O Corante de Viabilidade 7-AAD Viability Dye é um corante químico em solução, utilizado nas análises mono ou multiparamétricas por citometria de fluxo. Permite na análise dos leucócitos humanos, a identificação de células não viáveis e a sua exclusão das células (viáveis) de interesse.

PRINCÍPIO

A 7-Amino-Actinomicina D (7-AAD) é um análogo da Actinomicina contendo um grupo amina substituído na posição 7 do cromóforo. O 7-AAD insere-se entre as bases de ADN Cytosine/Guanine (1).

A coloração da dupla cadeia de ADN é levada a cabo através da incubação da amostra com o Corante de Viabilidade 7-AAD. Os glóbulos vermelhos são então removidos por lise e os leucócitos são analisados por citometria de fluxo.

As células apoptóticas, necróticas e/ou danificadas são uma fonte de interferências na análise de células viáveis por citometria de fluxo. As células não viáveis podem ser identificadas e caracterizadas pela coloração com 7-AAD, enquanto que as células vivas, retendo a integridade da membrana, são impermeáveis ao 7-AAD e assim não são coradas (i.e., são negativas para o 7-AAD) (2).

O citómetro de fluxo analisa a dispersão da luz e a fluorescência das células. Permite a localização de células na janela eletrónica definida num histograma que correlaciona a difusão ortogonal de luz (dispersão lateral ou DL) e a fluorescência correspondente à coloração de 7-AAD. Outros histogramas que combinam dois dos diferentes parâmetros disponíveis no citómetro também são utilizados na etapa de delimitação.

A fluorescência das células é analisada de forma a excluir as células coradas positivamente (não viáveis) das não coradas (viáveis). Os resultados podem ser expressos em percentagem de eventos não fluorescentes em relação a todos os eventos adquiridos pela aquisição eletrónica.

UTILIZADOR PREVISTO

Este produto destina-se a ser utilizado por profissionais de laboratório.

AMOSTRAS

O sangue venoso deve ser recolhido utilizando tubos estéreis que contenham um sal de AEDT como anticoagulante.

As amostras devem ser mantidas à temperatura ambiente (18–25 °C) e não devem ser agitadas. As amostras devem ser homogeneizadas por agitação suave antes de tomar a amostra do ensaio.

As amostras devem ser analisadas no prazo de 24 horas após a punção venosa.

AVISOS E PRECAUÇÕES

1. Não utilize o reagente depois da data de validade.
2. Não congele.
3. Deixe atingir a temperatura ambiente antes de usar (18–25 °C).
4. Evite a exposição à luz.
5. Evite a contaminação microbiana dos reagentes, caso contrário, poderão ocorrer falsos resultados.
6. Este reagente pronto a utilizar contém 0,005% (peso/volume) de 7-AAD e 1% (volume/volume) de dimetilsulfóxido (DMSO).

Em estado puro, o 7-AAD é potencialmente cancerígeno e o DMSO é um irritante.

Embora extremamente diluídos na presente formulação, estes constituintes poderão manter os respetivos efeitos nocivos na totalidade ou em parte. Nunca pipete com a boca e evite qualquer contacto com a pele, as mucosas e os olhos. Utilize estes reagentes de acordo com as precauções de utilização (em especial, o uso de luvas, bata e óculos de proteção).

7. O 7-AAD é um cromóforo sujeito a degradação por exposição à luz. É armazenado num frasco opaco para o proteger da luz antes da utilização.
- Evitar exposição contínua à luz durante os períodos de incubação e reduzir a exposição à luz das amostras após utilização do corante.
8. Todas as amostras de sangue devem ser consideradas potencialmente infecciosas e manuseadas com cuidado (em especial, devem ser usados óculos, batas e luvas de proteção).
9. Os tubos de sangue e os materiais descartáveis utilizados para manuseamento devem ser eliminados em recipientes específicos destinados a incineração.

CLASSIFICAÇÃO DE PERIGO GHS

7-AAD Viability Dye

ATENÇÃO

H316

P332+P313

Provoca irritação cutânea ligeira.

Em caso de irritação cutânea: consulte um médico.

Dimetilsulfóxido 0,5 - 1,5%



A Ficha de dados de segurança está disponível em beckman.com/techdocs

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

O Corante de Viabilidade 7-AAD deve ser mantido entre 2 e 8 °C e protegido da luz, antes e depois do frasco ter sido aberto.

Vida útil em frasco fechado para estudo de estabilidade: 730 dias.

Estabilidade do frasco aberto: o reagente permanece estável durante 60 dias.

Consulte o Certificado de análise específico do lote em www.beckman.com.

EVIDÊNCIA DE DEGRADAÇÃO

Uma alteração no aspeto físico dos reagentes poderá indicar deterioração, pelo que o reagente não deve ser utilizado.

Para obter informações adicionais ou se o produto recebido estiver danificado, contacte a assistência ao cliente da Beckman Coulter através do número 800-742-2345 (EUA ou Canadá) ou contacte o seu representante local da Beckman Coulter.

MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS COM O KIT:

- Tubos de amostras e materiais necessários para amostragem.
- Pipetas automáticas com pontas descartáveis para 20, 100 e 500 µL.
- Tubos de plástico para hemólise.
- Reagente de lise de glóbulos vermelhos. Por exemplo: Solução de Lise IOTest3 (Ref. A07799).
- Tampão (PBS: 0.01 M fosfato de sódio; 0.145 M cloreto de sódio; pH 7.2).
- Centrifugue.
- Agitador automático (tipo vórtex).
- Citómetro de fluxo.

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

A concentração de leucócitos na amostra deve ser inferior a 10^4 células/µL (10^{10} /L). Se necessário, dilua em PBS para ter uma concentração de leucócitos de 5×10^3 células/µL (5×10^9 /L).

O procedimento utiliza 100 µL de uma amostra (tubo pré-diluído ou não).

NB:

- O ajuste da intensidade de fluorescência correspondente ao 7-AAD pode ser feito utilizando a coloração de uma amostra de sangue total fresco e de células não viáveis estabilizadas no mesmo tubo (ver imagem no apêndice). Nestas condições, a voltagem correspondente à deteção de 7-AAD deve ser ajustada de modo a que os eventos viáveis (i.e., sangue total fresco) apareçam na primeira década de um histograma SS, dependendo do 7-AAD (ver exemplo no apêndice).
- Não utilize reagentes contendo agentes permíaveis ou fixadores durante o procedimento de forma a prevenir falsas colorações positivas.

PROCEDIMENTO

1. Adicione 20 µL da solução de Corante de Viabilidade 7-AAD a cada tubo teste.
2. Adicione 100 µL de amostra (i.e., o equivalente a aproximadamente 5×10^5 células).

Agite os tubos no vortex cuidadosamente.

- Incube durante 15 a 20 minutos à temperatura ambiente (18–25 °C), protegido da luz.
- Em seguida, efetue a lise dos glóbulos vermelhos, se necessário, seguindo as recomendações do reagente de lise utilizado.

Como exemplo, se deseja utilizar Solução de Lise IOTest3 (Ref. A07799): Adicione 2mL deste reagente à concentração de trabalho (1X). Agite no vortex imediatamente e incube por 10 minutos, à temperatura ambiente e protegido da luz.

Se a amostra não contem glóbulos vermelhos, não efectue a etapa de lise, mas adicione 0.5 ou 1 mL de PBS.

- As amostras devem ser analisadas dentro de 1 hora.

Nota: Em todos os casos, mantenha as amostras entre 2 e 8 °C e protegidas da luz.

DESEMPENHO

ESPECIFICIDADE

As actinomicinas são o componente biológico activo do cromóforo (2-Amino-4,6Dimetilfenoxazona-3) e de pentapeptidos cíclicos (3). São antibióticos de origem bacteriana caracterizados historicamente nos Ascomycetes do solo. As actinomicinas formam complexos estáveis com o ácido desoxirribonucleico de cadeia dupla (ADN), não formando este tipo de complexos com o ácido ribonucleico de cadeia dupla (RNA) ou com híbridos RNA-DNA, ou DNA ou RNA de cadeia simple.

As propriedades espectrais do 7-AAD tornam-o um composto excelente para a utilização em análise por citometria de fluxo (3). A absorção máxima do complexo 7-AAD/ADN é compatível com a excitação azul de comprimento de onda de 488 nm para citómetros que incluem um laser de argon (4). O pico de emissão de fluorescência na zona mais profunda da banda vermelha (635to675nm) do complexo 7-AAD/ADN permite a utilização ótima deste marcador quando combinado com anticorpos conjugados com o Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) e com a Ficoeritrina R (PE) (3). Em oposição ao Iodeto de Propídeo (PI), que é outro marcador fluorescente utilizado como marcador de ADN, a sobreposição entre o espectro de emissão de complexo 7-AAD/ADN sobreposto ao do FITC e da PE é reduzida.

PRECISÃO

Os valores percentuais positivos foram determinados utilizando sangue total misturado com células positivas. Cada amostra foi executada quatro vezes, duas vezes ao dia, durante um dia, em dois instrumentos, utilizando dois lotes de reagente do marcador de viabilidade 7-AAD. As medições (% de positivos) foram realizadas no citómetro de fluxo Navios. A análise foi realizada com base no método EP5-A2 do CLSI: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Avaliação do desempenho de precisão dos métodos de medição quantitativos).

Os nossos critérios de aceitação estão dependentes do número de eventos positivos medidos para cada população:

- Em caso de eventos positivos <1500, CV <15%
- Em caso de eventos positivos >1500, CV <10%

Solução de lise IOTest 3:

Sangue total misturado com HPBALL linha celular							
Número de eventos positivos (média) = 5539							
	Interoperador	Intercitómetro	Intralote	Interlote	Interprocessamento	Intraprocessamento	Total
CV (%)	1,48	1,55	4,44	1,41	2,87	3,05	4,91
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Sistema de lise VersaLyse:

Sangue total misturado com HPBALL linha celular							
Número de eventos positivos (média) = 4034							
	Interoperador	Intercitómetro	Intralote	Interlote	Interprocessamento	Intraprocessamento	Total
CV (%)	3,73	1,85	8,74	1,79	3,63	7,02	9,11
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

EXATIDÃO

A exatidão do marcador de viabilidade 7-AAD foi avaliada comparando os resultados com um reagente de referência como equivalente num conjunto de amostras de sangue total misturadas com células positivas e executadas num citómetro NAVIOS. A tendência entre o teste e o reagente de referência foi determinada com base na diferença entre os resultados do teste. Se a tendência se encontrar dentro do intervalo de erro permitido ou o valor p não indicar uma diferença significativa (>0,05), os resultados do teste das amostras de pacientes obtidos com ambos os reagentes são considerados equivalentes.

Os resultados obtidos encontram-se resumidos na tabela abaixo:

Solução de lise IOTest 3:

Número de dadores = 25				
Alvo positivo	Δ médio	Crítérios celulares de % Δ	Valor p	RESULTADOS
Sangue total misturado com HPBALL linha celular	0,31	<5	0,247	PASS

Sistema de lise VersaLyse:

Número de dadores = 25				
Alvo positivo	Δ médio	Crítérios celulares de % Δ	Valor p	RESULTADOS
Sangue total misturado com HPBALL linha celular	-0,34	<5	0,289	PASS

LIMITAÇÕES

1. A citometria de fluxo poderá produzir falsos resultados se o citómetro não tiver sido perfeitamente alinhado, se as fugas de fluorescência não tiverem sido compensadas corretamente e se as regiões não tiverem sido cuidadosamente posicionadas.
2. Serão obtidos resultados exatos e reprodutíveis desde que os procedimentos utilizados estejam de acordo com o folheto técnico e cumpram as boas práticas laboratoriais.
3. A substância activa no 7-AAD, foi optimizada de modo a oferecer a melhor razão sinal específico/não específico. Por conseguinte, é importante aderir à razão de volume de reagente/volume da amostra em cada teste.
4. No caso de hiperleucocitose, dilua o sangue em PBS até obter um valor de aproximadamente 5×10^9 leucócitos/L.
5. Em alguns estados de doença, tais como deficiência renal grave ou hemoglobinopatia, a lise dos glóbulos vermelhos pode ser baixa, incompleta ou impossível. Neste caso recomenda-se isolar as células mononucleadas utilizando um gradiente de densidade antes da coloração (por exemplo Ficoll).

Consulte o Anexo para obter exemplos e referências.

MARCAS COMERCIAIS

Beckman Coulter, o logótipo estilizado e as marcas de produtos e serviços da Beckman Coulter mencionadas neste documento são marcas comerciais ou marcas comerciais registadas da Beckman Coulter, Inc. nos Estados Unidos e noutros países.

INFORMAÇÕES ADICIONAIS

Para um paciente/utilizador/terceiro na União Europeia e em países com um regime regulamentar idêntico (Regulamento 2017/746/UE relativo aos dispositivos médicos para diagnóstico in vitro): se, durante a utilização deste dispositivo ou como resultado da sua utilização, ocorrer um incidente grave, comunique-o ao fabricante e/ou ao respetivo representante autorizado e à autoridade nacional.

HISTÓRICO DE REVISÕES

REVISÃO AF:	Data de lançamento: Outubro de 2021
REVISÃO AW:	Data de lançamento: Abril de 2022
Atualizações no sentido de cumprir a política de rotulagem da Beckman Coulter Global e os requisitos do regulamento IVD-R (UE)2017/746:	
Secções adicionadas	Utilizador previsto, Concentração, Precisão, Exatidão, Informações adicionais, Histórico de revisões
Informações adicionadas	Consulte a secção Princípio
Secções atualizadas	Princípio, Avisos e precauções, Classificação de perigo do GHS, Armazenamento e estabilidade, Sinais de deterioração, Limitações, Anexo
Secções removidas	Metodologia, Exemplos de aplicações clínicas, Resultados esperados, Reprodutibilidade intralaboratorial, Linearidade
REVISÃO	Data de lançamento
AX	Outubro de 2022
Secções atualizadas	Traduções adicionadas
REVISÃO	Data de lançamento
AY	
Secções atualizadas	Armazenamento e estabilidade

Legenda dos símbolos

O Glossário de símbolos está disponível em beckman.com/techdocs (número do documento B60062)

	Specifikationer 7-AAD-levedygtighedsfarvestof
Formulering	Væske
Bind	3 mL
kalibrering	Klar til brug
λ -magnetisering	488 nm
Emissionstop	655 nm (kompleks med dobbeltstrenget DNA)

7-AAD levedygtighedsfarvestof

REF A07704 150 test, 3 mL, 20 μ L/test

Til *in vitro*-diagnostisk brug

TILSIGTET BRUG

7-AAD-levedygtighedsfarvestof er et kemisk farvestof i opløsning, som er designet til mono- eller multiparametrisk analyse ved hjælp af flowcytometri. Dette gør det muligt at identificere ikke-levedygtige celler og adskille dem fra (levedygtige) celler af interesse under analysen af humane leukocytter.

PRINCIP

7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) er en analog til actinomycin, der indeholder en amingruppe, der i position 7 er substitueret af kromoforen. 7-AAD placerer sig selv mellem toppene af cytosin/guanin-baserne i DNA'et (1).

Farvning af DNA-dobbeltstrengen foretages ved inkubering af prøven med 7-AAD-levedygtighedsfarvestof. Erythrocytterne fjernes derefter ved lysering, og leukocytterne analyseres ved flowcytometri.

Apoptotiske, nekrotiske og/eller beskadigede celler er kilder til interferens i analysen af levedygtige celler ved brug af flowcytometri. Ikke-levedygtige celler kan karakteriseres og identificeres, idet de er farvet med 7-AAD, mens levende celler bevarer deres membranøse integritet og er impermeable for 7-AAD og er ufarvede (dvs. de er 7-AAD-negative) (2).

Flowcytometeret analyserer lysdiffusion og cellernes fluorescens. Dette muliggør lokalisering af celler inden for det elektroniske vindue, der er defineret på et histogram, som korrelerer med den retvinklede lysdiffusion (sidespredning eller SS) og fluorescensen, der svarer til 7-AAD-farvning. Der anvendes også andre histogrammer i gatingstadiet, der kombinerer to af de forskellige parametre på cytometeret.

Fluorescensen i de celler, der således er gated, analyseres for at udelukke de positivt farvede hændelser (ikke-levedygtige) fra de ikke-farvede (levedygtige). Resultaterne kan udtrykkes som en procentdel ikke-fluorescerende hændelser af alle de hændelser, der er taget i betragtning ved gatingen.

TILSIGTET BRUGER

Dette produkt er beregnet til professionel brug i laboratoriet.

PRØVER

Prøver af venøst blod skal udtages i sterile prøverør, der indeholder et EDTA-salt som antikoagulant.

Prøverne skal opbevares ved stuetemperatur (18–25 °C) og må ikke omrystes. Prøverne skal homogeniseres ved forsigtig omrystning inden udtagelse af testprøven.

Prøverne skal behandles inden for 24 timer efter venepunktur.

ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER

1. Brug ikke reagenset efter udløbsdatoen.
2. Må ikke nedfryses.
3. Lad det nå stuetemperatur (18-25 °C) før brug.
4. Minimér eksponering for lys.
5. Undgå mikrobiel kontaminering reagenserne, idet det kan føre til fejlagtige resultater.
6. Dette brugsklare reagens indeholder 0,005% (vægt/volumen) 7-AAD og 1% (volumen/volumen) dimethylsulfoxid (DMSO).

I ren form er 7-AAD potentielt kræftfremkaldende, og DMSO kan forårsage irritation.

Selvom disse bestanddele er kraftigt fortyndet i den aktuelle formulering, kan de helt eller delvist bevare deres skadelige virkninger. Pipetter aldrig med munden, og undgå al kontakt med hud, slimhinder og øjne. Følg forholdsreglerne ved brug af disse reagenser (herunder navnlig brug af handsker, kittel og beskyttelsesbriller).

7. 7-AAD er en kromofor, der nedbrydes ved eksponering for lys. Det opbevares i et uigennemsigtigt hætteglas for at beskytte det mod lys før brug.

Undgå kontinuerlig eksponering for lys under inkubationsstadierne, og reducer prøvernes eksponering for lys, når farvningen er foretaget.

8. Alle blodprøver skal anses som potentielt smittefarlige og skal behandles forsigtigt (husk især at bruge beskyttelseshandsker, forklæde og beskyttelsesbriller).
9. Blodprøvetagningsrør og engangsmateriale, der bruges i forbindelse med håndteringen, skal bortskaffes i ad hoc-beholdere, der er beregnet til bortskaffelse.

GHS FAREKLASSIFIKATION

7-AAD Viability Dye

ADVARSEL

H316

P332+P313

Forårsager mild hudirritation.

Ved hudirritation: Søg lægehjælp.

Dimethylsulfoxid 0,5 - 1,5%



Sikkerhedsdatablad findes på beckman.com/techdocs

OPBEVARING OG HOLDBARHED

7-AAD-levedygtighedsfarvestoffet skal opbevares ved mellem 2 og 8 °C og beskyttes mod lys, før og efter hætteglasset er blevet åbnet.

Stabilitet i lukket hætteglas: 730 dage.

Stabilitet i åbent hætteglas: Reagenset er stabilt i 60 dage.

Se lottspecifikt analysecertifikat på www.beckman.com.

TEGN PÅ FORRINGELSE

Ændringer i den måde, reagenset ser ud på, kan være tegn på forringelse, og reagenset må ikke anvendes.

Ring til Beckman Coulters kundeservice på 800-742-2345 (USA eller Canada), eller kontakt den lokale Beckman Coulter-repræsentant for at få flere oplysninger, eller hvis du modtager et beskadiget produkt.

PÅKRÆVEDE MATERIALER, SOM IKKE LEVERES MED SÆT:

- Prøvetagningsrør og materiale, der er påkrævet til prøvetagning.
- Automatiske pipetter med engangsspidsen til 20, 100 og 500 µL.
- Plasthæmolyserør.
- Erythrocytlyseringsreagens. For eksempel: IOTest 3-lyseringsopløsning (ref. A07799).
- Buffer (PBS: 0,01 M natriumfosfat; 0,145 M natriumklorid; pH 7,2).
- Centrifuge
- Automatisk omrører (vortextype).
- Flowcytometer.

KLARGØRING AF PRØVER

Koncentrationen af leukocyter i prøven skal være mindre end 10^4 celler/µL (10^{10} /L). Hvis nødvendigt fortyndes i PBS, så leukocytkoncentrationen bringes ned til 5×10^3 /µL (5×10^9 /L).

Proceduren anvender 100 µL af en prøve, fortyndet eller på anden vis.

NB:

- Justering af fluorescensintensiteten svarende til 7-AAD kan foretages ved hjælp af farvning af en frisk fuldblodsprøve og af ikke-levedygtige stabiliserede celler i samme rør (se billedet i tillægget). Under disse betingelser skal den spænding, der svarer til detektion af 7-AAD, justeres således, at levedygtige hændelser (dvs. friskt fuldblod) fremgår i den første dekade af et SS histogram, der er afhængigt af 7-AAD (se eksempel i tillægget).
- Der må ikke anvendes reagenser, der indeholder permeable eller fikserende midler under proceduren, for at forhindre falsk positiv farvning.

PROCEDURE

1. Tilføj 20 µL 7-AAD-levedygtighedsfarvestofopløsning til hvert prøverør.
2. Tilsæt 100 µL af prøven (dvs. det, der svarer til ca. 5×10^5 celler).
Vortex rørene forsigtigt.
3. Inkuber i 15 til 20 minutter ved stuetemperatur (18–25 °C). Beskyt mod lys.
4. Foretag derefter om nødvendigt lysering af de røde celler ved at følge anbefalingerne for det brugte lysisreagens.

Hvis man for eksempel ønsker at bruge IOTest 3-lyseringsopløsning (ref. A07799), tilsættes der 2 mL af arbejdsopløsningen (1X), hvorefter den straks vortexes og inkuberes i 10 minutter ved stuetemperatur, beskyttet mod lys.

Hvis prøven ikke indeholder erythrocytter, må lyseringsstadiet ikke udføres. I stedet tilføjes 0,5 til 1 mL PBS.

5. Præparaterne bør analyseres inden for 1 time.

Bemærk: Præparaterne skal i alle tilfælde beskyttes mod lys og opbevares ved 2-8 °C.

YDEEVNE

SPECIFICITET

Actinomyciner er de aktive biologiske bestanddele af en kromofor (2-amino-4,6-dimethylphenoxazone-3) og af cykliske pentapeptider (3). De er antibiotika af bakteriel oprindelse, der historisk set er opnået fra ascomyceter i jorden. Actinomyciner udgør stabile komplekser med dobbeltstrengt deoxyribonucleinsyre (DNA), men ikke med hverken dobbeltstrengt ribonucleinsyre (RNA) eller med RNA-DNA-hybrider eller med enkeltstrengt DNA eller RNA.

7-AADs spektrale egenskaber gør det til et kompleks, der er særligt velegnet til flowcytometrisk analyse (3). Den maksimale absorption af 7-AAD/DNA-komplekset er kompatibel med den blå eksitationsbølgelængde på 488 nm for cytometre med argonlaser (4). Det fluorescerende emissionsmaksimum for 7-AAD/DNA-kompleksets dybrøde bånd (635 til 675 nm) muliggør optimal brug af denne probe, når den kombineres med fluorescein isothiocyant (FITC)-konjugerede antistoffer og med R-phycoerythrin (PE) (3). Faktisk har 7-AAD/DNA-komplekset et reduceret overlappende emissionsspektrum med FITC og PE, i modsætning til propidiumiodid (PI), som er en anden fluorescerende probe, der anvendes som DNA-markør.

PRÆCISION

De procentvise positive værdier blev bestemt ved anvendelse af fuldblod tilsat positive celler. Hver prøve blev kørt 4 gange, to gange dagligt i 1 dag, på 2 instrumenter med 7-AAD-levedygtighedsfarvestofreagenset fra 2 lots. Målingerne (% positiv) blev foretaget på Navios-flowcytometer. Analysen blev udført i henhold til CLSI-metoden EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Evaluering af kvantitative målemetoders præcisionsevne).

Vores acceptkriterier afhænger af antallet af positive hændelser målt for hver population:

- Hvis positiv hændelse < 1500, CV < 15%
- Hvis positiv hændelse > 1500, CV < 10%

IOTest 3-lyseringsopløsning:

Fuldblod tilsat HPBALL-cellelinje							
Antal positive hændelser (middelværdi) = 5539							
	Inter-operator	Inter-cytometer	Intra-lot	Inter-lot	Inter-kørsel	Intra-kørsel	I alt
CV (%)	1,48	1,55	4,44	1,41	2,87	3,05	4,91
RESULTATER	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

VersaLyse-lyseringssystem:

Fuldblod tilsat HPBALL-cellelinje							
Antal positive hændelser (middelværdi) = 4034							
	Inter-operator	Inter-cytometer	Intra-lot	Inter-lot	Inter-kørsel	Intra-kørsel	I alt
CV (%)	3,73	1,85	8,74	1,79	3,63	7,02	9,11
RESULTATER	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

NØJAGTIGHED

Nøjagtigheden af 7-AAD-levedygtighedsfarvestof blev vurderet ved sammenligning af resultaterne med et referencereagens som prædikat på et sæt fuldblodsprøver tilsat positive celler kørt på et Navioscytometer. Bias mellem test- og referencereagens blev bestemt på baggrund af forskellen mellem testresultaterne. Hvis bias er inden for den tilladte fejlmargen, eller hvis p-værdien ikke indikerer nogen signifikant forskel (> 0,05), anses testresultaterne for patientprøverne med de to reagenser for at være ækvivalente.

De opnåede resultater opsummeres i nedenstående tabel:

IOTest 3-lyseringsopløsning:

Antal donorer = 25				
Positivt mål	Middelværdi Δ	Δ % cellekriterie	p-værdi	RESULTATER
Fuldblod tilsat HPBALL-cellelinje	0,31	<5	0,247	PASS

VersaLyse-lyseringssystem:

Antal donorer = 25				
Positivt mål	Middelværdi Δ	Δ % cellekriterie	p-værdi	RESULTATER
Fuldblod tilsat HPBALL-cellelinje	-0,34	<5	0,289	PASS

BEGRÆNSNINGER

1. Flowcytometri kan give forkerte resultater, hvis cytometeret ikke er perfekt justeret, hvis der ikke er blevet kompenseret korrekt for fluorescenslækager, eller hvis områderne ikke er blevet placeret omhyggeligt.
2. Der genereres nøjagtige og reproducerbare resultater, så længe de anvendte procedurer er i overensstemmelse med de tekniske anvisninger på indlægsedlen og god laboratoriepraksis.
3. 7-AAD, det aktive stof i dette reagens, er optimeret, så det giver det bedste specifikke/ikke-specifikke signalforhold. Det er derfor vigtigt at overholde forholdet mellem reagensvolumen og prøvevolumen i hver enkelt test.
4. I tilfælde af en hyperleukocytose skal prøven fortyndes i PBS så der opnås en værdi på cirka 5×10^9 leukocytter / L.
5. Ved visse sygdomstilstande, såsom alvorligt nyresvigt eller ved hæmoglobinopatier, kan lyseringen af erythrocytter være langsom, ufuldstændig eller endog umulig. I disse tilfælde anbefales det at isolere mononukleære celler ved anvendelse af en densitetsgradient (for eksempel Ficoll) inden farvning.

Se Tillæg for eksempler og referencer.

VAREMÆRKER

Beckman Coulter, det stiliserede logo og de Beckman Coulter produkt- og servicemærker, der er omtalt heri, er varemærker eller registrerede varemærker tilhørende Beckman Coulter, Inc. i USA og andre lande.

YDERLIGERE OPLYSNINGER

For en patient/bruger/tredjepart i Den Europæiske Union og i lande med identisk lovgivningsmæssig reguleringsordning (forordning 2017/746/EU om medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik); hvis der er sket en alvorlig hændelse under brugen af dette apparat eller som et resultat af dens anvendelse, skal du rapportere den til producenten og/eller dennes autoriserede repræsentant og til din nationale myndighed.

REVISIONSHISTORIK

REVISION AF:	Udgivelsesdato: Oktober 2021
REVISION AW:	Udgivelsesdato: April 2022
Opdateringer for at sikre overholdelse af Beckman Coulters globale mærkningspolitik og overensstemmelse med IVD-R (EU)2017/746:	
Tilføjede afsnit	Tilsluttet bruger, Koncentration, Præcision, Nøjagtighed, Yderligere oplysninger, Revisionshistorik
Tilføjet information	Se afsnittene Princip
Opdaterede afsnit	Princip, Advarsler og forholdsregler, GHS-fareklassifikation, Opbevaring og holdbarhed, Tegn på forringelse, Begrænsninger, Tillæg
Fjernede afsnit	Metodologi, Eksempler på kliniske anvendelser, Forventede resultater, Reproducerbarhed inden for laboratoriet, Linearitet
REVISION	Udgivelsesdato
AX	Oktober 2022
Opdaterede afsnit	Oversættelser tilføjet
REVISION	Udgivelsesdato
AY	
Opdaterede afsnit	Opbevaring og holdbarhed

Symbolnøgle

En ordliste over symboler findes på beckman.com/techdocs (dokumentnummer B60062)

	Specifikationer 7-AAD Viability Dye
Formula	Lösning
Volym	3 mL
Kalibrering	Färdig att använda
λ excitering	488 nm
Emissions peak	655 nm (komplext med dubbelsträngat DNA)

7-AAD Viability Dye

REF A07704 150 tester; 3 mL, 20 μ L/test

För *in vitro*-diagnostik

AVSEDD ANVÄNDNING

7-AAD Viability Dye är ett kemiskt färgämne i lösning vilket är designat för mono- eller multiparameter analys med flödescytometri. Det medger identifiering och exkludering av icke viabla celler från (viabla) celler av intresse vid analys av humana leukocyter.

PRINCIP

7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) är en analog till Actinomycin som innehåller en aminogrupp utbytt i position 7 hos chromophoren. 7-AAD infogar sig själv mellan topparna på cytosin/guanin baserna hos DNA (1).

Inmärkning av dubbelsträngat DNA utförs genom inkubering av provet med 7-AAD Viability Dye. De röda blodkropparna avlägsnas sedan med lysering och leukocyterna analyseras med flödescytometri.

Apoptotiska, nekrotiska och/eller skadade celler är en källa till interferens vid analys av viabla celler med användning av flödescytometri. Icke-viabla celler kan karakteriseras och identifieras genom inmärkning med 7-AAD, medan levande celler behåller sitt cellmembran intakt, är impermeabla för 7-AAD och förblir oinmärkta (dvs. de är 7-AAD negativa) (2).

Flödescytometern analyserar ljusdiffusion och fluorescens av celler. Den möjliggör lokalisering av celler inom det elektroniska fönstret definierat i ett histogram, vilket korrelerar den rätvinkliga ljusspridningen (sidospredning eller SS) och fluorescensen som motsvarar 7-AAD-färgning. Andra histogram som kombinerar två av de olika parametrarna som finns tillgängliga på cytometern används också i gating-steget.

Fluorescensen hos sålunda gatade celler analyseras för att exkludera positivt inmärkta events (icke-viabla) från de oinmärkta (viabla). Resultatet kan uttryckas i procent av icke-fluorescerande events i förhållande till alla events som registrerats genom elektronisk gatning.

AVSEDD ANVÄNDARE

Denna produkt är avsedd för yrkesmässig laboratorieanvändning.

PROVER

Venblod måste tas i sterila provrör med EDTA-salt som antikoagulant.

Proverna ska förvaras i rumstemperatur (18–25 °C) och får inte skakas. Provet ska homogeniseras genom varsam blandning innan pipettering.

Proverna måste analyseras inom 24 timmar efter venpunktur.

VARNING OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

1. Använd inte reagenset efter utgångsdatumet.
2. Får ej frysas.
3. Rumstemperera (18–25 °C) före användning.
4. Minimera exponering för ljus.
5. Undvik mikrobiell kontaminering av reagens. Det kan leda till felaktiga resultat.
6. Reagenset är färdigt för användning och innehåller 0,005 % (vikt/volym) 7-AAD och 1 % (volym/volym) dimetylsulfoxid (DMSO).

I ren form är 7-AAD potentiellt cancerframkallande och DMSO är en irritant.

Även om de är extremt utspädda i den formulering som används kan dessa beståndsdelar bibehålla hela eller delar av sina skadliga effekter. Pipettera aldrig med munnen och undvik all kontakt med hud, slemhinnor och ögon. Använd dessa reagens enligt försiktighetsåtgärderna (särskilt: användning av handskar, skyddsrock och skyddsglasögon).

7. 7-AAD är en kromofor som bryts ned genom exponering för ljus. Den förvaras i en ogenomskinlig ampull för att skydda den från ljus innan användning.

Undvik oavbruten exponering av ljus under inkuberingstadierna och reducera ljus-exponering av proverna när väl inmärkningsen är gjord.

8. Alla blodprover måste betraktas som potentiellt smittsamma och ska hanteras med försiktighet (i synnerhet vad gäller användande av skyddshandskar, rockar och skyddsglasögon).
9. Blodprovsrör och engångsmaterial som används för hantering ska kasseras i särskilda behållare avsedda för förbränning.

RISKKLASSIFICERING ENLIGT GHS

7-AAD Viability Dye

VARNING

H316

P332+P313

Orsakar mild hudirritation.

Vid hudirritation: Sök läkarhjälp.

Dimetylsulfoxid 0,5 - 1,5 %



Safety Data Sheet (Säkerhetsdatablad) finns på beckman.com/techdocs

FÖRVARING OCH STABILITET

7-AAD Viability Dye måste förvaras mellan 2 och 8 °C och skyddas för ljus, före och efter ampullen har öppnats.

Hållbarhet för slutna ampuller per stabilitetsstudie: 730 dagar.

Stabilitet i öppna ampuller: reagenset är stabilt i 60 dagar.

Se lotspecifikt analyscertifikat på www.beckman.com.

TECKEN PÅ FÖRSÄMRING

Alla förändringar i reagensens fysiska utseende kan indikera försämring och att reagenset inte ska användas.

För mer information eller om en skadad produkt tas emot, ring Beckman Coulter kundtjänst på 800-742-2345 (USA eller Kanada) eller kontakta din lokala Beckman Coulter-representant.

MATERIAL SOM BEHÖVS MEN INTE FÖLJER MED KITET:

- Provrör och nödvändigt material för provtagning.
- Automatpipetter med tillhörande engångsspetsar för 20, 100 och 500 µL.
- Hemolysrör av plast.
- Erytrocyt lyseringsreagens. Till exempel: IOTest3 Lysing Solution (Ref. A07799).
- Buffert (PBS: 0.01M natriumfosfat; 0.145 M natriumklorid; pH7.2).
- Centrifugera.
- Automatisk omrörare (Vortex-typ).
- Flödescytometer.

PREPARERING AV PROVER

Koncentrationen av leukocyter i provet måste vara mindre än 10⁴ celler/µL (10¹⁰/L). Späda om nödvändigt med PBS för att få en leukocyt koncentration på 5x 10³ celler/µL (5 x 10⁹/L).

Proceduren använder 100 µL av ett prov med ett provrör som är förspädd eller på annat sätt bearbetat.

OBS:

- Justering av fluorescensintensiteten mot-svarande 7-AAD kan utföras genom inmärkning av ett prov med färskt helblod och icke-viabila stabiliserade celler i samma rör (se bild i appendix). Vid dessa förutsättningar måste volttäta motsvarande detektion av 7-AAD justeras så att viabila events (dvs. färskt helblod) hamnar i den första dekaderna i ett SS histogram beroende av 7-AAD (se exempel i appendix).
- Använd inte reagens med permeabiliserande eller fixerande innehåll under proceduren. Detta för att undvika positiv inmärkning av artefakt natur.

PROCEDUR

1. Tillsätt 20µL 7-AAD Viability Dye lösning till varje rör.
2. Tillsätt 100µL av provet (dvs. motsvarande ungefär 5 x 10⁵ celler).
Vortexa rören försiktigt.
3. Inkubera i 15 till 20 minuter vid rumstemperatur (18–25 °C), skyddat för ljus.
4. Utför sedan, vid behov, lysering av de röda blodkropparna genom att följa rekommendationerna för det använda lyseringsreagenset.

Som exempel, om man önskar använda IOTest3 Lysing Solution (Ref. A07799), tillsätt 2mL brukslösning (1X), vortexa omedelbart och inkubera i 10 minuter vid rumstemperatur, skyddat för ljus.

Om provet inte innehåller röda blodkroppar, utför inget lyseringssteg utan tillsätt 0.5 till 1mL PBS.

5. Preparationerna ska analyseras inom 1 timme.

OBS: Preparationerna ska alltid förvaras mellan 2 och 8 °C och skyddade för ljus.

PRESTANDA

SPECIFICITET

Actinomyciner är de aktiva biologiska beståndsdelarna av en chromophore (2-Amino-4,6Dimethylphenoxazone-3) och av cykliska pentapeptider (3). De är antibiotika av bakteriellt ursprung historiskt karakteriserad i Ascomycetes jord. Actinomycinerna bildar stabila komplex med dubbelsträngad deoxiribonukleinsyra (DNA), men bildar inte denna typ av komplex vare sig med dubbelsträngad ribonukleinsyra (RNA), RNA-DNA hybrider, eller med enkelsträngat DNA eller RNA.

De spektrala egenskaperna hos 7-AAD utgör en sammansättning som gör den speciellt väl lämpad för flödescytometrisk analys (3). Den maximala absorptionen hos 7-AAD/DNA komplexet är kompatibelt med den blå excitationsvåglängden 488 nm för cytometrar utrustade med argon laser (4). 7-AAD/DNA komplexets fluorescens emissions peak i det djupt röda bandet (635 till 675 nm) medger optimal användning av denna probe i kombination med Fluorescein Isothiocyanate konjugerade antikroppar (FITC) och med R Phycoerythrin (PE) (3). Faktiskt, har 7-AAD/DNA komplexet, i motsats till Propidium Iodide (PI) vilket är en annan fluorescerande probe använd som DNA markör, ett reducerat överlappnings emissions spektrum med FITC och PE.

PRECISION

Procentvärdet för positiva värden bestämdes med helblod med tillsatta positiva celler. Varje prov kördes 4 gånger, två gånger om dagen under 1 dag på 2 instrument med 2 loter av 7-AAD Viability-färgreagens. Mätningar (% positiva) utfördes på Navios flödescytometer. Analysen utfördes baserat på CLSI-metod EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Utvärdering av precisionsprestanda för kvantitativa mätmetoder).

Våra acceptanskriterier beror på antalet positiva händelser som uppmäts för varje population:

- Om positiv händelse < 1 500, CV < 15 %
- Om positiv händelse > 1 500, CV < 10 %

IOTest 3-lyseringslösning:

Helblod som tillsatts HPBALL cell-linje							
Antal positiva händelse (medelvärde) = 5539							
	Mellan operatörer	Mellan cytometrar	Inom lot	Mellan loter	Mellan körningar	Inom körning	Totalt
CV (%)	1,48	1,55	4,44	1,41	2,87	3,05	4,91
RESULTAT	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Versalyse lyseringssystem:

Helblod som tillsatts HPBALL cell-linje							
Antal positiva händelse (medelvärde) = 4034							
	Mellan operatörer	Mellan cytometrar	Inom lot	Mellan loter	Mellan körningar	Inom körning	Totalt
CV (%)	3,73	1,85	8,74	1,79	3,63	7,02	9,11
RESULTAT	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

NOGGRANHET

Noggrannheten hos 7-AAD Viability-färg bedömdes genom att jämföra resultaten med en referensreagens som predikat på en uppsättning helblodprov som tillförts positiva celler och körts på en NAVIOS-flödescytometer. Bias mellan test- och referensreagens bestämdes baserat på skillnaden mellan testresultaten. Om bias ligger inom tillåtet felintervall eller p-värdet anger att det inte finns någon signifikant skillnad (> 0,05), så anses testresultaten för patientproverna med de två reagenserna vara likvärdiga.

Resultaten som erhålls sammanfattas i följande tabell nedan:

IOTest 3-lyseringslösning:

Antal donatorer = 25				
Positivt mål	Medelvärde Δ	Δ % cellkriterier	p-värde	RESULTAT
Helblod som tillsatts HPBALL cell-linje	0,31	<5	0,247	PASS

Versalyse lyseringssystem:

Antal donatorer = 25				
Positivt mål	Medelvärde Δ	Δ % cellkriterier	p-värde	RESULTAT
Helblod som tillsatts HPBALL cell-linje	-0,34	<5	0,289	PASS

BEGRÄNSNINGAR

1. Flödescytometri kan ge falska resultat om cytometern inte har justerats perfekt, om fluorescensläckor inte har kompenserats korrekt och om regionerna inte har placerats noggrant.
2. Noggranna och reproducerbara resultat kommer att erhållas så länge de förfaranden som används är i enlighet med den tekniska bipacksedeln och förenliga med god laboratoriepraxis.
3. 7-AAD, den aktiva beståndsdel i detta reagens, har optimerats till att ge bästa kvot specifik/icke-specifik signal. Därför är det viktigt att hålla fast vid kvoten: reagensvolym/provvolum vid varje analys.
4. Vid leukocytos, spädd blodet i PBS för att erhålla ett värde på ungefär 5×10^9 leukocyter/L.
5. Vid vissa sjukdomstillstånd, som svår njursjukdom eller hemoglobinopatier, kan hemolys av erythrocyter ta längre tid, vara ofullständig eller till och med omöjlig. I sådana fall är det rekommenderat att isolera mononukleära celler med användning av densitetsgradient (till exempel Ficoll) innan infärgning.

Se bilagan för exempel och referenser.

VARUMÄRKEN

Beckman Coulter, den stiliserade logotypen och Beckman Coulters produkt- och tjänstmärken som nämns här är varumärken eller registrerade varumärken som tillhör Beckman Coulter, Inc. i USA eller andra länder.

YTTERLIGARE INFORMATION

För en patient/användare/tredje part inom EU och i länder med identiskt regelsystem (förordning 2017/746/EU om medicintekniska produkter för in vitro-diagnostik); om, vid användning av denna enhet eller som ett resultat av dess användning, en allvarlig incident inträffat ska den rapporteras till tillverkaren och/eller till dess auktoriserade representant och till den nationella myndigheten.

REVISIONSHISTORIK

REVIDERING AF:	Publiceringsdatum: Oktober 2021
REVIDERING AW:	Publiceringsdatum: april 2022
Uppdateringar för att uppfylla Beckman Coulter globala etiketteringspolicy och kraven i IVD-R (EU)2017/746:	
Tillagda avsnitt	Avsedd användare, Koncentration, Precision, Noggrannhet, Ytterligare information, Revisionshistorik
Tillagd information	Se avsnittet Princip
Uppdaterade avsnitt	Princip, Varning och försiktighetsåtgärder, Riskklassificering enligt GHS, Förvaring och hållbarhet, Tecken på försämring, Begränsningar, Bilaga
Borttagna avsnitt	Metodik, Exempel på klinisk tillämpning, Förväntade resultat, Reproducerbarhet inom laboratoriet, Linearitet
REVISION	Publiceringsdatum
AX	Oktober 2022
Uppdaterade avsnitt	Lade till översättningar
REVISION	Publiceringsdatum
AY	
Uppdaterade avsnitt	Förvaring och hållbarhet

Teckenförklaring för symboler

Ordlista för symboler finns på beckman.com/techdocs (dokumentnummer B60062)

	Spesifikasjoner 7-AAD Viability Dye vitalfarging
Formulering	Væske
Volum	3 mL
Kalibrering	Bruksklar
λ-eksitasjon	488 nm
Emisjonstopp	655 nm (kompleks med dobbeltrådet DNA)

7-AAD Viabilitetsfargestoff

REF A07704 150 tester; 3 mL, 20 µL/test

For *in vitro*-diagnostisk bruk

TILTENKT BRUK

7-AAD Viability Dye vitalfarging er et kjemisk middel i oppløsning, utviklet til mono- og multiparametrisk analyse med flowcytometri. Den gjør at ikke-levedyktige celler kan påvises og utelukkes blant (levedyktige) celler som er aktuelle for analysen av humane leukocytter.

PRINSIPP

7-amino-aktinomycin D (7-AAD) er en analog av aktinomycin og inneholder en amingruppe substituert i posisjon 7 på kromoforen. 7-AAD setter seg selv inn blant toppene til baseparene Cytosin / Guanin i DNA (1).

Fargingen av dobbeltråden i DNA skjer ved at prøven inkuberer med vitalfargingen 7-AAD Viability Dye. De røde cellene fjernes deretter ved lyse og leukocytene analyseres med flowcytometri.

Apoptotiske, nekrotiske og/eller skadede celler vil utgjøre kilder til interferens i en flowcytometrisk analyse av levedyktige celler. Ikke-levedyktige celler kan karakteriseres og identifiseres da de er farget med 7-AAD, mens levende celler, som fortsatt har sine membranegenskaper intakt, er impermeable for 7-AAD og er ufargede (dvs. de er 7-AAD-negative) (2).

Flytcytometeret analyserer lysdiffusjon og fluorescensen til celler. Da blir det mulig å lokalisere celler innenfor det elektroniske vinduet definert på et histogram, som korrelerer den ortogonale diffusjonen av lys (Side Scatter eller SS) med fluorescensen for 7-AAD farging. Andre histogrammer som kombinerer to av de ulike parameterne tilgjengelig på cytometeret, brukes også i gating-trinnet.

Fluorescensen til cellene som gate's på denne måten analyseres for å skille de positivt fargede hendelsene (ikke-levedyktige) fra de ufargede (levedyktige). Resultatene kan uttrykkes som prosentandelen av ikke-fluorescerende hendelser i forhold til alle hendelser som gating'en tar hensyn til.

TILTENKT BRUKER

Dette produktet skal brukes av profesjonelle brukere på laboratorier.

PRØVER

Veneblod må tas ved bruk av sterile rør som inneholder EDTA-salt som antikoagulant.

Prøvene skal oppbevares ved romtemperatur (18 °C–25 °C) og skal ikke rystes. Prøven skal homogeniseres ved lett bevegelse før testprøven tas.

Prøvene må analyseres innen 24 timer etter venepunksjon.

ADVARSEL OG FORHOLDSREGLER

1. Reagenset må ikke brukes etter utløpsdatoen.
2. Må ikke fryses.
3. La den nå romtemperatur (18 °C–25 °C) før bruk.
4. Bør ikke utsettes for lys.
5. Unngå mikrobiell kontaminering av reagensene, ellers kan det gi feil resultater.
6. Reagenset som er klart til bruk inneholder 0,005 % (vekt/volum) av 7-AAD og 1 % (volum/volum) av dimetylsulfoksid (DMSO).

I ren form er 7-AAD potensielt kreftfremkallende, og DMSO er et irriterende stoff.

Selv om disse bestanddelene er ekstremt fortynnet i den foreliggende formuleringen, kan de beholde alle eller deler av de skadelige virkningene. Pipetter aldri med munnen, og unngå kontakt med huden, slimhinnene og øynene. Følg forholdsreglene ved bruk disse reagensene i henhold til forholdsreglene for bruk (bruk hansker, frakk og vernebriller).

7. 7-AAD er en kromofor som nedbrytes ved eksponering for lys. Den oppbevares i en opak flaske for å beskytte den mot lys før bruk.

Unngå kontinuerlig eksponering for lys under inkuberingsstrinnene og sørg for at prøvene utsettes minst mulig for lys så snart fargingen er satt i gang.

8. Alle blodprøver må betraktes som potensielt smittefarlige og må håndteres med forsiktighet (gjelder spesielt: bruk av vernehansker, laboratoriefrakk og vernebriller).
9. Blodprøverør og engangsmateriale som brukes til håndtering, skal kastes i beholdere beregnet for forbrenning.

GHS-FAREKLASSIFISERING

7-AAD Viability Dye

ADVARSEL

H316

P332+P313

Forårsaker mild hudirritasjon.

Ved hudirritasjon: Søk legehjelp.

Dimetyl Sulfoksyd 0,5 - 1,5 %



Sikkerhetsdatablad er tilgjengelig på beckman.com/techdocs

OPPBEVARING OG STABILITET

7-AAD Viability Dye vitalfarging må oppbevares ved temperatur mellom 2 °C og 8 °C, beskyttet mot lys, før og etter at hetteglasset er åpnet.

Holdbarhet i lukket flaske ifølge stabilitetsstudie: 730 dager.

Stabilitet for åpnet flaske: reagenset er stabilt i 60 dager.

Se lot-spesifikt analysesertifikat på www.beckman.com.

TEGN PÅ FORRINGELSE

Endringer i reagensenes fysiske utseende kan være tegn på redusert kvalitet, og slike reagenser skal ikke brukes.

For ytterligere informasjon eller hvis produktet mottas skadet, kan Beckman Coulter kundeservice 800-742-2345 (USA og Canada) eller den lokale Beckman Coulter-representanten kontaktes.

NØDVENDIGE MATERIALER SOM IKKE FØLGER MED SETTET:

- Prøvetakingsrør og materiale nødvendig for prøvetaking.
- Automatiske pipetter med engangsspisser til 20, 100 og 500 µL.
- Hemolyserør av plast.
- Lysereagens for røde blodceller. For eksempel: IOTest3 lyseoppløsning (Ref. A07799).
- Buffer (PBS: 0,01M natriumfosfat; 0,145M natriumklorid; pH 7,2).
- Sentrifuger.
- Automatisk omrører (vortekstype).
- Flytcytometer.

FREMSTILLING AV PRØVER

Leukocyttkonsentrasjonen i prøven må være lavere enn 10^4 celler / µL (10^{10} /L). Fortynn om nødvendig i PBS for å bringe leukocyttkonsentrasjonen til 5×10^3 cells / µL (5×10^9 /L). Prosedyren bruker 100 µL prøvemateriale, forhåndsfortynnet i prøveglass eller på annen måte.

Prosedyren bruker 100 µL av en prøve i et rør, fortynnet eller lignende på forhånd.

MERK:

- Justering av intensiteten av fluorescens som tilsvarer 7-AAD kan gjøres ved å bruke farging av en prøve friskt fullblod og ikke-levedyktige stabiliserte celler i samme glass (se bildet i vedlegget - Appendix). Under disse betingelsene må spenningen som tilsvarer deteksjon av 7-AAD justeres slik at levedyktige hendelser (dvs. friskt fullblod) viser seg i den første dekadene i et SS-histogram, avhengig av 7-AAD (se eksempelet i vedlegget - Appendix).
- Reagenser som inneholder gjennom-tengende eller fikserende midler skal ikke brukes under prosedyren for at artefaktisk positiv farging skal unngås.

PROSEDYRE

1. Tilsett 20 µL 7-AAD Viability Dye vitalfargingsoppløsning til hvert prøveglass.
2. Tilsett 100 µL av prøvematerialet (dvs., tilsvarende omtrent 5×10^5 celler). Bland glassene varsomt med Vortex-blander. Bland glassene varsomt med Vortex-blander.
3. Inkuberes i 15 til 20 minutter ved romtemperatur (18 °C–25 °C), beskyttet mot lys.
4. Utfør deretter lysring av de røde blodcellene ved behov, i henhold til anbefalingene for lyseringsreagenset som benyttes.

Som et eksempel, hvis man ønsker å bruke IOTest3 Lyseoppløsning (Ref.A07799) tilsettes 2mL av arbeidsoppløsningen (1X), blandes umiddelbart med vortex-blander og inkuberes i 10 minutter ved romtemperatur, beskyttet mot lys.

Hvis prøven ikke inneholder røde celler skal lysetrinnene ikke igangsettes, men det tilsettes 0,5 til 1mL PBS.

5. Prøvene må analyseres i løpet av 1 time.

MERK: I alle tilfeller skal preparatene oppbevares mellom 2 °C og 8 °C , beskyttet mot lys.

YTELSE

SPESIFISITET

Aktinomyciner er de biologiske virkestoffene i en kromofor (2-amino-4,6 dimetylphenoksazon-3) og i sykliske pentapeptider (3). De er antibiotika av bakteriell opprinnelse som historisk er karakterisert i sekksporesopp (ascomycetes) Aktinomyciner danner stabile komplekser med dobbeltrådet deoksyribonukleinsyre (DNA), men danner ikke slike komplekser verken med dobbeltrådet ribonukleinsyre (RNA) eller med RND-DNA hybrider, eller med enkelttrådet DNA eller RNA.

De spektrale egenskapene til 7-AAD gjør den til en forbindelse som er særlig godt egnet til flowcytometriske analyser (3). Maksimal absorpsjon for 7-AAD / DNA-komplekset er overensstemmende med den blå eksitasjonsbølglengden på 488 nm i cytometere som er utstyrt med argonlaser (4). Toppfluorescenseemisjonen i det dype røde båndet (635 til 675 nm) til 7-AAD / DNA-komplekset tillater optimal bruk av denne proben når den kombineres med fluorescein isotiocyanatkonjugerte antistoffer (FITC) og med R-fykoerytrin (PE) (3). Faktisk har 7-AAD / DNA-komplekset, i motsetning til propidiumiodid (PI), som er en annen fluorescensprobe som benyttes som DNA-markør, et redusert overlappende spektrum med FITC og PE.

PRESISJON

Prosentandelen positive verdier ble bestemt med fullblod tilsatt positive celler. Hver prøve ble kjørt 4 ganger, to ganger om dagen i 1 dag på 2 instrumenter med 2 partier 7-AAD Viability Dye-reagens. Målinger (% positiv) ble foretatt på et Navios-flytcytometer. Analyse ble utført basert på CLSI-metoden EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Evaluering av presisjonsytelse ved kvantitative målemetoder).

Våre godkjenningsskriterier er avhengige av antall positive hendelser som måles for hver populasjon:

- Hvis positiv hendelse < 1 500, VK < 15 %
- Hvis positiv hendelse > 1 500, VK < 10 %

IOTest 3 lyseringsløsning:

Fullblod tilsatt HPBALL-cellelinje							
Antall positive hendelser (gjennomsnitt) = 5539							
	Mellom operatører	Mellom cytometere	Innenfor samme lot	Mellom loter	Mellom kjøring	Innenfor samme kjøring	Total
VK (%)	1,48	1,55	4,44	1,41	2,87	3,05	4,91
RESULTATER	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

VersaLyse-lyseringssystem:

Fullblod tilsatt HPBALL-cellelinje							
Antall positive hendelser (gjennomsnitt) = 4034							
	Mellom operatører	Mellom cytometere	Innenfor samme lot	Mellom loter	Mellom kjøring	Innenfor samme kjøring	Total
VK (%)	3,73	1,85	8,74	1,79	3,63	7,02	9,11
RESULTATER	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

NØYAKTIGHET

Nøyaktigheten til 7-AAD Viability Dye ble vurdert ved å sammenligne resultatene med et referansereagens som predikat på et sett med fullblodsprøver tilsatt positive celler analysert på et NAVIOS-cytometer. Skjevheten mellom test- og referansereagens ble bestemt basert på forskjellen mellom testresultater. Hvis skjevheten er innenfor det tillatte feilområdet eller p-verdien indikerer ingen signifikant forskjell (> 0,05), anses testresultatene for pasientprøvene for de to reagensene som ekvivalente.

De oppnådde resultatene er oppsummert i den følgende tabellen:

IOTest 3 lyseringsløsning:

Antall donorer = 25				
Positivt mål	Gjennomsnittlig Δ	Δ % cellekriterier	p-verdi	RESULTATER
Fullblod tilsatt HPBALL-cellelinje	0,31	<5	0,247	PASS

VersaLyse-lyseringssystem:

Antall donorer = 25				
Positivt mål	Gjennomsnittlig Δ	Δ % cellekriterier	p-verdi	RESULTATER
Fullblod tilsatt HPBALL-cellelinje	-0,34	<5	0,289	PASS

BEGRENSNINGER

1. Flowcytometri kan gi falske resultater hvis cytometeret ikke har blitt justert nøyaktig, hvis fluorescenslekkasjer ikke er kompensert riktig, og hvis regionene ikke er nøyte plassert.
2. Nøyaktige og reproduerbare resultater vil oppnås så lenge de anvendte prosedyrene er i samsvar med det tekniske pakningsvedlegget og god laboratoriepraksis.
3. 7-AAD, det aktive innholdsstoffet i denne reagensen er optimalisert for å kunne gi best mulig spesifikt/ikke-spesifikt signalforhold. Derfor er det viktig å overholde forholdstallet mellom reagentvolum/prøvevolum i alle tester.
4. I tilfelle av hyperleukocytose fortynnes blodet i PBS slik at det finnes en verdi på omkr. 5×10^9 leukocytter / L.
5. Ved visse sykdomstilstander, som alvorlig nyresvikt eller hemoglobinopati, vil lyse av røde celler kunne gå langsomt, ufullstendig eller endog være umulig å gjennomføre. I dette tilfellet anbefales det å isolere mononukleære celler ved hjelp av tetthetsgradient (for eksempel Ficoll) før farging.

Se vedlegget for eksempler og referanser.

VAREMERKER

Beckman Coulter, den stiliserte logoen og vare- og servicemerkene til Beckman Coulter som er omtalt her, er varemerker eller registrerte varemerker som tilhører Beckman Coulter, Inc. i USA og andre land.

TILLEGGSINFORMASJON

For pasient/bruker/tredjepart i EU og land med identisk regelverk (EUs forordning nr. 2017/746 om in vitro-diagnostisk medisinsk utstyr); hvis det har oppstått en alvorlig hendelse under bruk av dette utstyret, eller som et resultat av bruken, skal dette rapporteres til produsenten og/eller den autoriserte representanten samt til nasjonal myndighet.

REVISJONSHISTORIE

REVISJON AF:	Utgivelsesdato: Oktober 2021
REVISJON AW:	Utgivelsesdato: April 2022
Oppdateringer skal overholde de globale merkingsreglene til Beckman Coulter og være i samsvar med krav iht. IVD-R (EU)2017/746:	
Innsatte avsnitt	Tiltenkt bruker, Konsentrasjon, Presisjon, Nøyaktighet, Tilleggsinformasjon, Revisjonshistorie
Innsatt informasjon	Se avsnittet Prinsipp
Oppdaterte avsnitt	Prinsipp, Advarsler og forholdsregler, GHS-fareklassifisering, Oppbevaring og stabilitet, Tegn på forringelse, Begrensninger, Vedlegg
Fjernede avsnitt	Metodologi, Eksempel på kliniske bruksområder, Forventede resultater, Reproduktibilitet innenfor laboratoriet, Linearitet
REVISJON	Utgivelsesdato
AX	Oktober 2022
Oppdaterte avsnitt	Oversettelser lagt til
REVISJON	Utgivelsesdato
AY	
Oppdaterte avsnitt	Oppbevaring og stabilitet

Symbolforklaring

Symbolordliste er tilgjengelig på beckman.com/techdocs (dokumentnummer B60062)

	Eritelmät 7-AAD-viabiliteettiväriaine
Koostumus	Neste
Tilavuus	3 ml
Kalibrointi	Käyttövalmis
λ -viritys	488 nM
Säteilyhuippu	655 nm (kompleksi, jossa kaksisäikeinen DNA)

7-AAD viabiliteettiväriaine

REF A07704 150 testiä; 3 ml, 20 μ l / testi

Diagnostiseen *In Vitro* -käyttöön

KÄYTTÖTARKOITUS

7-AAD-viabiliteettiväriaine on kemiallinen väriaine liuoksessa, joka on tarkoitettu yksi- tai moniparametriseen analyysiin virtausytometrian avulla. Sen avulla elinkelvottomat solut voidaan tunnistaa ja sulkea pois kiinnostuksen kohteena olevista (elinkelpoisista) soluista ihmisen leukosyyttejä koskevassa analyysissä.

PERIAATE

7-amino-aktinomyysiini D (7-AAD) on aktinomyysiinin analogi, joka sisältää kromoforin paikassa 7 korvatus aminiiniryhmän. 7-AAD työntyy DNA:n sytosiini-/guaniiniemästen huippujen väliin (1).

DNA:n kaksoisäikeen värjäys tehdään inkuboimalla näyte 7-AAD-viabiliteettiväriaineella. Tämän jälkeen punasolut poistetaan lyysaamalla ja leukosyytit analysoidaan virtausytometrialla.

Apoptoottiset nekroottiset ja/tai vaurioituneet solut aiheuttavat häiriöitä analysoitaessa elinkykyisiä soluja virtausytometrian avulla. Elinkelvottomat solut voidaan karakterisoida ja tunnistaa sen perusteella, että ne värjäytyvät 7-AAD:llä, kun taas elävissä soluissa kalvot säilyvät eheinä, jolloin 7-AAD ei läpäise niitä ja ne eivät värjydy (ts. ne ovat 7-AAD-negatiivisia) (2).

Virtausytometri analysoi valonhajonnan ja solujen fluoresenssin. Sen avulla on mahdollista paikantaa solut pylväskaavioon määritetyssä elektronisessa ikkunassa, joka vastaa ortogonaalista valonhajontaa (sivusironta tai SS) ja 7-AAD-värjäytymistä vastaavaa fluoresenssiä. Rajausvaiheessa käytetään myös muita pylväskaavioita, joissa yhdistetään kaksi eri sytometriassa saatavilla olevaa parametria.

Rajattujen solujen fluoresenssi analysoidaan, jotta positiivisesti värjäytyneet (elinkelvottomat) tapahtumat voidaan erottaa värjäytymättömistä (elinkelpoisista) tapahtumista. Tulokset ilmaistaan fluoresoimattomien tapahtumien prosenttimääränä suhteessa kaikkiin rajauksessa huomioituihin tapahtumiin.

KÄYTTÖTARKOITUKSEN MUKAINEN KÄYTTÄJÄ

Tämä tuote on tarkoitettu ammattimaiseen laboratoriokäyttöön.

NÄYTTEET

Laskimoverinäytteet on otettava käyttäen steriilejä putkia, joissa on antikoagulanttina EDTA-suolaa.

Näytteet on säilytettävä huoneenlämmössä (18–25 °C), eikä niitä saa ravistaa. Näyte on homogenoitava sekoittamalla hellävaraisesti ennen testinäytteen ottamista.

Näytteet on analysoitava 24 tunnin sisällä laskimopunktiosta.

VAROITUS JA VAROTOIMET

1. Älä käytä reagenssia viimeisen käyttöpäivän jälkeen.
2. Ei saa jäätyä.
3. Anna sen lämmetä huoneenlämpöiseksi (18–25 °C) ennen käyttöä.
4. Minimoi altistuminen valolle.
5. Vältä reagenssien mikrobikontaminaatiota, muutoin vaarana ovat virheelliset tulokset.
6. Tämä käyttövalmis reagenssi sisältää 0,005 % (paino/tilavuus) 7-AAD:tä ja 1 % (tilavuus/tilavuus) dimetyylisulfoksidia (DMSO).

Puhtaassa muodossa 7-AAD on mahdollisesti karsinogeeninen ja DMSO ärsyttävä.

Vaikka nämä ainesosat ovat runsaasti laimennettuna nykyisessä koostumuksessa, ne voivat säilyttää kaikki haitalliset vaikutuksensa tai osan niistä. Älä koskaan pipetoi suulla ja vältä kaikkea kosketusta ihoon, limakalvoihin ja silmiin. Käytä näitä reagensseja noudattamalla varotoimia (erityisesti suojakäsineiden, -puvun ja -lasien käyttöä koskevia).

7. 7-AAD on kromofori, joka voi heikentyä, jos se altistuu valolle. Se säilytetään läpinäkymättömässä ampullissa, joka suojaa sitä valolta ennen käyttöä.

Vältä jatkuvaa valolle altistumista inkubointivaiheissa ja vähennä näytteiden valolle altistumista värjäyksen jälkeen.

8. Kaikkia verinäytteitä on pidettävä mahdollisesti tartuntavaarallisina, ja niitä on käsiteltävä varovaisesti (erityisesti on muistettava suojakäsineiden, -pukujen ja -lasien käyttö).
9. Veriputket ja käsittelyyn käytetyt kertakäyttöiset materiaalit on hävitettävä poltettaviksi tarkoitetuissa ad hoc -astioissa.

GHS-VAARALUOKITUS

7-AAD Viability Dye

VAROITUS

H316

P332+P313

Ärsyttää ihoa lievästi.

Jos ilmenee ihoärsytystä: Hakeudu lääkäriin.

Dimetyylisulfoksidi 0,5 - 1,5 %



Käyttöturvallisuustiedote on saatavana osoitteessa beckman.com/techdocs

SÄILYTYS JA STABILITEETTI

7-AAD-viabiliteettiväriaine on säilytettävä 2–8 °C:n lämpötilassa ja suojattava valolta ennen ampullin avaamista ja sen jälkeen.

Suljetun ampullin säilyvyysaika stabiliteettitutkimuksen mukaan: 730 päivää.

Avatun ampullin stabiliteetti: reagenssi on stabiili 60 päivän ajan.

Katso eräkohtainen analyysitodistus osoitteesta www.beckman.com.

MERKIT PILAANTUMISESTA

Mahdolliset muutokset reagenssin fyysisessä ulkonäössä voivat viitata huonontumiseen, eikä reagenssia saa tällöin käyttää.

Jos tarvitset lisätietoja tai jos sait vahingoittuneen tuotteen, soita Beckman Coulter -asiakaspalveluun numeroon 800 742 2345 (USA ja Kanada) tai ota yhteyttä Beckman Coulterin paikalliseen edustajaan.

TARVITTAVAT MATERIAALIT, JOITA EI TOIMITETA SARJAN MUKANA:

- Näytteenottoon tarvittavat näytteenottoputket ja materiaalit.
- Automaattiset pipetit, joissa kertakäyttökärjet 20, 100 ja 500 µl.
- Muoviset hemolyytiputket.
- Punasolujen lyysireagenssi. Esimerkiksi: IOTest 3 -lyysiliuos (viite A07799).
- Puskuri (PBS: 0,01 M natriumfosfaattia, 0,145 M natriumkloridia, pH 7,2).
- Sentrifugi.
- Automaattinen sekoitin (Vortex-/pyörretyyppinen).
- Virtaussytometri.

NÄYTTEIDEN VALMISTELU

Näytteen leukosyyttipitoisuuden on oltava pienempi kuin 10^4 solua/µl (10^{10} /l). Laimenna tarvittaessa PBS:ään siten, että saat leukosyyttipitoisuudeksi 5×10^3 solua/µl (5×10^9 /l).

Toimenpiteessä käytetään 100 µl näytettä, putkessa tai muutoin laimennettua.

Huom.

- 7-AAD:tä vastaavan fluoresenssin voimakkuutta voidaan säätää käyttämällä tuoretta kokoveria ja elinkelvottomia stabiiloituja soluja sisältävän näytteen värjäystä samassa putkessa (ks. liitteessä oleva kuva). Näissä olosuhteissa 7-AAD:n havaitsemista vastaavaa jännitettä on säädettävä siten, että elinkelvoiset tapahtumat (ts. tuore kokoveri) näkyy sivusirontapylväskaavion ensimmäisellä dekadilla, 7-AAD:stä riippuen (ks. liitteessä oleva esimerkki).
- Älä käytä toimenpiteen aikana läpäiseviä tai kiinnittyviä reagensseja artefaktisen positiivisen värjäytymisen estämiseksi.

MENETTELY

- Lisää jokaiseen testiputkeen 20 µl 7-AAD-viabiliteettiväriainetta.
- Lisää 100 µl testinäytettä (mikä vastaa noin 5×10^5 solua).
Sekoita putkia pyörresekoittimella varovaisesti.
- Inkuboi 15–20 minuuttia huoneenlämmössä (18–25 °C), valolta suojattuna.
- Suorita sitten tarvittaessa punasolujen lyysi noudattamalla käytetyn lyysireagenssin suosituksia.

Jos esimerkiksi halutaan käyttää IOTest3-lyysiliuosta (viite A07799), tällöin on lisättävä 2 ml työskentelyliuosta (1-kertainen), sekoitettava välittömästi sen jälkeen pyörresekoittimella ja inkuboitava 10 minuuttia huoneenlämmössä, valolta suojattuna.

Jos näyte ei sisällä punasoluja, älä suorita lyysiä, vaan lisää 0,5–1 ml PBS:ää.

5. Valmisteet on analysoitava yhden tunnin kuluessa.

Huomautus: Pidä valmisteet kaikissa tapauksissa 2–8 °C:n lämpötilassa ja valolta suojattuna.

SUORITUSKYKY

SPESIFISYYS

Aktinomyysiinit ovat kromoforin (2-amino-4,6dimetyylifenoksatsoni-3) ja syklisten pentapeptidien aktiivisia biologisia ainesosia (3). Ne ovat bakteeriperäisiä antibiootteja, joita on karakterisoitu historiallisesti maaperän kotelosienissä. Aktinomyysiinit muodostavat stabiileja komplekseja kaksisäikeisen deoksiribonukleiinihapon (DNA) kanssa, mutta ne eivät muodosta tällaista kompleksia kaksisäikeisen ribonukleiinihapon (RNA) tai RNA-DNA-hybridien eivätkä yksisäikeisen DNA:n tai RNA:n kanssa.

Spektristen ominaisuuksiensa ansiosta 7-AAD on yhdistelmä, joka soveltuu erityisen hyvin virtausytometriseen analyysiin (3). 7-AAD/DNA-kompleksin enimmäisabsorptio on yhteensopiva 488 nm:n sinisen viritysaallonpituuden kanssa sytometreissä, joissa on argonlaser (4). Fluoresoiva huippusäteily 7-AAD/DNA-kompleksin syvän punaisessa nauhassa (635–675 nm) mahdollistaa tämän sondin optimaalisen käytön, kun se yhdistetään fluoreseiini-isotiosyanaattikonjugoituihin vasta-aineisiin (FITC) ja R-fykoerytriiniin (PE) (3). Toisin kuin propidiumiodidilla (PI), joka on toinen DNA-markkerina käytetty fluoresoiva sondi, 7-AAD/DNA-kompleksilla on pienempi päällekkäinen säteilyspektri FITC:n ja PE:n kanssa.

TARKKUUS

Prosentuaaliset positiiviset arvot määritettiin käyttämällä kokoveria, johon oli lisätty positiivisia soluja. Jokainen näyte käsiteltiin 4 kertaa: kahdesti päivässä 1 päivänä 2:ssa eri laitteessa käyttämällä 2:ta eri erää 7-AAD-viabiliteettiväriainereagenssia. Mittaukset (% positiivisia) tehtiin Navios-virtausytometrillä. Analyysi tehtiin perustuen CLSI-menetelmään EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Kvantitatiivisten mittausmenetelmien tarkkuussuorituskyvyn arviointi).

Hyväksyntäkriteerimme on riippuvainen kussakin populaatiossa mitattujen positiivisten tapahtumien määrästä:

- Jos tapahtuma on positiivinen < 1 500, CV < 15 %
- Jos tapahtuma on positiivinen > 1 500, CV < 10 %

IOTest 3 -lyysiliuos:

Kokoveri, johon on lisätty HPBALL -solulinja							
Positiivisten näytteiden lukumäärä (keskiarvo) = 5539							
	Käyttäjien välinen	Sytometrin sisäinen	Erän sisäinen	Erien välinen	Ajojen välinen	Ajon sisäinen	Yhteensä
CV (%)	1,48	1,55	4,44	1,41	2,87	3,05	4,91
TULOKSET	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Versalyse-lyysijärjestelmä:

Kokoveri, johon on lisätty HPBALL -solulinja							
Positiivisten näytteiden lukumäärä (keskiarvo) = 4034							
	Käyttäjien välinen	Sytometrin sisäinen	Erän sisäinen	Erien välinen	Ajojen välinen	Ajon sisäinen	Yhteensä
CV (%)	3,73	1,85	8,74	1,79	3,63	7,02	9,11
TULOKSET	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

ULKONEN TARKKUUS

7-AAD-viabiliteettiväriaineen ulkoinen tarkkuus arvioitiin vertaamalla tuloksia viitereagenssiin, joka toimi NAVIOS-sytometrillä käsitellyn kokoverinäytesarjan, johon oli lisätty positiivisia soluja, predikaattina. Testin ja vertailureagenssin välinen poikkeama määritettiin testitulosten välisen eron perusteella. Jos poikkeama on sallitun virhealueen sisällä tai p-arvo ei osoita merkittävää eroa (> 0,05), tällöin kahdella reagenssilla saatujen potilasnäytteiden testituloksia pidetään vastaavina.

Saadut tulokset esitetään seuraavassa taulukossa:

IOTest 3 -lyysiliuos:

Luovuttajien määrä = 25				
Positiivinen kohde	Keskiarvo Δ	Δ % -solukriteeri	p-arvo	TULOKSET
Kokoveri, johon on lisätty HPBALL -solulinja	0,31	<5	0,247	PASS

Versalyse-lyysijärjestelmä:

Luovuttajien määrä = 25				
Positiivinen kohde	Keskiarvo Δ	Δ % -solukriteeri	p-arvo	TULOKSET
Kokoveri, johon on lisätty HPBALL -solulinja	-0,34	<5	0,289	PASS

RAJOITUKSET

1. Virtauscytometrialla saadut tulokset voivat olla virheellisiä, jos sytometri on kohdistettu epätarkasti, jos fluoresenssivuotoja ei ole kompensoitu oikein ja jos alueita ei ole sijoitettu tarkasti.
2. Tulokset oivat tarkkoja ja toistettavissa, kunhan käytetyt menetelmät ovat teknisen selosteen mukaisia ja noudattavat hyviä laboratoriokäytäntöjä.
3. 7-AAD, tämän reagenssin vaikuttava aine, on optimoitu siten, että saadaan paras spesifisen ja epäspesifisen signaalin suhde. Siksi on tärkeää noudattaa reagenssin tilavuuden / näytteen suhdetta jokaisessa testissä.
4. Jos kyseessä on hyperleukosytoosi, laimenna veri PBS:ään siten, että saat arvoksi noin 5×10^9 leukosyyttiä/l.
5. Tietyissä sairaustiloissa, kuten vaikeassa munuaisten vajaatoiminnassa tai hemoglobiinopatioissa, punasolujen hajoaminen voi olla hidasta, epätäydellistä tai jopa mahdotonta. Tässä tapauksessa yksitumaiset solut on suositeltavaa eristää käyttämällä tiheysgradienttia (esimerkiksi Ficoll) ennen värjäystä.

Katso esimerkkejä ja viitteitä liitteestä.

TAVARAMERKIT

Beckman Coulter, tyylitelty logo ja tässä mainitut Beckman Coulter -tuotteiden ja palveluiden merkit ovat Beckman Coulter, Inc:in tavaramerkkejä tai rekisteröityjä tavaramerkkejä Yhdysvalloissa ja muissa maissa.

LISÄTIETOJA

Potilaalle / käyttäjälle / kolmannelle osapuolelle Euroopan unionin alueella ja maissa, joissa on samanlainen sääntelyjärjestelmä (in vitro -diagnostiikkaan tarkoitettuja lääkinällisiä laitteita koskeva asetus 2017/746/EU): jos tämän laitteen käytön aikana tai sen käytön seurauksena on tapahtunut vakava tapahtuma, ilmoita siitä valmistajalle ja/tai valmistajan valtuutetulle edustajalle sekä kansalliselle viranomaiselle.

TARKISTUSHISTORIA

VERSIO AF:	Julkaisupäivä: Lokakuu 2021
VERSIO AW:	Julkaisupäivä: Huhtikuu 2022
Päivitetty noudattamaan Beckman Coulterin maailmanlaajuisia merkintämenettelyä ja IVD-R (EU)2017/746 -standardin vaatimuksia:	
Lisätyt osat	Käyttötarkoituksen mukainen käyttäjä, Pitoisuus, Tarkkuus, Ulkoinen tarkkuus, Lisätietoja, Tarkistushistoria
Lisätyt tiedot	Katso osio Periaate
Päivitetyt osat	Periaate, Varoitus ja varotoimet, GHS-vaaraluokitus, Säilytys ja stabiiliteetti, Merkit pilaantumisesta, Rajoitukset, Säilytys ja stabiiliteetti, Liite
Poistettut osat	Metodologia, Esimerkkejä kliinisestä sovelluksesta, Odotetut tulokset, Laboratorionsisäinen toistettavuus, Lineaarisuus
VERSIO	Julkaisupäivä
AX	Lokakuu 2022
Päivitetyt osat	Käännökset lisätty
VERSIO	Julkaisupäivä
AY	
Päivitetyt osat	Säilytys ja stabiiliteetti

Symboliluettelo

Symbolisanasto on saatavana osoitteessa beckman.com/techdocs (asiakirjan numero B60062)

	Χαρακτηριστικά Δείκτης Βιωσιμότητας 7-AAD Viability Dye
Μορφή	Υγρή
ΤΟΜΟΣ	3 mL
Βαθμονόμηση	Έτοιμο για χρήση
διέγερση λ	488 nm
Κορυφή εκπομπής	655 nm (σύμπλοκο με το δίκλωνο DNA)

Χρωστική βιωσιμότητας 7-AAD

REF A07704 150 εξετάσεις: 3 mL,
20 µL/εξέταση

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση

ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Ο Δείκτης Βιωσιμότητας 7-AAD Viability Dye είναι μια χημική χρωστική ουσία σε διάλυμα προσαρμοσμένη στην μονο- ή πολυ-παραμετρική ανάλυση μέσω κυτταρομετρίας ροής. Επιτρέπει την ταυτοποίηση των μη βιώσιμων κυττάρων και τον αποκλεισμό τους από τα κύτταρα στόχους (βιώσιμα) κατά την ανάλυση των ανθρώπινων λευκοκυττάρων.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η 7-Αμινο-Ακτινομυκίνη D (7-AAD), είναι ένα ανάλογο της Ακτινομυκίνης που περιέχει μια ομάδα αμίνης υποκατάστατο στη θέση 7 του χρωμοφόρου. Η 7-AAD παρεμβάλλει μεταξύ των δίσκων βάσεων Κυτοσίνης/Γουανίνης του DNA (1).

Η σήμανση του δίκλωνου DNA πραγματοποιείται επωάζοντας το δείγμα με το αντιδραστήριο 7-AAD Viability Dye. Στη συνέχεια τα ερυθροκύτταρα εξαλείφονται με λύση και τα λευκοκύτταρα αναλύονται μέσω κυτταρομετρίας ροής.

Τα αποπτωτικά κύτταρα, νεκρωτικά ή/και τραυματισμένα είναι πηγές παρεμβολών στην ανάλυση μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα μη βιώσιμα κύτταρα μπορούν να χαρακτηριστούν και να ταυτοποιηθούν αφού είναι σεσημασμένα με το 7-AAD ενώ τα ζωντανά κύτταρα που διατηρούν την μεμβρανική τους ακεραιότητα είναι μη διαπερατά στο 7-AAD και μένουν μη σεσημασμένα (δηλαδή 7-AAD αρνητικά) (2).

Το κυτταρόμετρο ροής αναλύει τη διάχυση φωτός και τον φθορισμό των κυττάρων. Καθιστά δυνατό τον εντοπισμό κυττάρων εντός του ηλεκτρονικού παραθύρου που ορίζεται σε ένα ιστόγραμμα, το οποίο συσχετίζει την ορθογώνια διάχυση του φωτός (πλάγια σκέδαση ή SS) και τον φθορισμό που αντιστοιχεί στη χρώση 7-AAD. Κατά το στάδιο της οριοθέτησης, χρησιμοποιούνται και άλλα ιστογράμματα που συνδυάζουν δύο από τις διαφορετικές παραμέτρους που διατίθενται στο κυτταρόμετρο.

Ο φθορισμός των περιορισμένων κυττάρων αναλύεται για τον αποκλεισμό των θετικά σηματοδοτούμενων συμβάντων (μη βιώσιμα) από τα μη σηματοδοτούμενα συμβάντα (βιώσιμα). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως το ποσοστό των μη φθορίζοντων κυττάρων σε σχέση με το σύνολο των αποκλεισθέντων συμβάντων κατά τον ηλεκτρονικό περιορισμό.

ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΟΣ ΧΡΗΣΤΗΣ

Αυτό το προϊόν προορίζεται για επαγγελματική εργαστηριακή χρήση.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Τα δείγματα φλεβικού αίματος πρέπει να διατηρούνται σε αποστειρωμένα σωληνάρια που περιέχουν άλας EDTA ως αντιπηκτικό.

Τα δείγματα διατηρούνται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (18–25 °C) και χωρίς ανακίνηση. Πριν από τη δοκιμαστική λήψη συνίσταται η ομογενοποίηση του δείγματος μέσω ήπιας ανακίνησης.

Τα δείγματα πρέπει να αναλύονται εντός 24 ωρών από τη φλεβοκέντηση.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

1. Μη χρησιμοποιείτε το αντιδραστήριο μετά την ημερομηνία λήξης.
2. Μην καταψύχετε.
3. Αφήστε το αντιδραστήριο να επανέλθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (18–25 °C) πριν από τη χρήση.
4. Ελαχιστοποιήστε την έκθεση στο φως.
5. Αποφύγετε τη μικροβιακή μόλυνση των αντιδραστηρίων, διαφορετικά ενδέχεται να προκύψουν ψευδή αποτελέσματα.
6. Αυτό το έτοιμο προς χρήση αντιδραστήριο περιέχει 0,005% (βάρος/όγκος) 7-AAD και 1% (όγκος/όγκος) διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO).

Σε καθαρή μορφή, το 7-AAD είναι δυνητικά καρκινογόνο και το DMSO είναι ερεθιστικό.

Παρόλο που είναι υπερβολικά αραιωμένα στην παρούσα σύνθεση, αυτά τα συστατικά μπορεί να διατηρούν το σύνολο ή μέρος των επιβλαβών επιπτώσεών τους. Μην εκτελείτε ποτέ αναρρόφηση μέσω πιπέτας από το στόμα και αποφεύγετε

κάθε επαφή με το δέρμα, τους βλεννογόνους και τα μάτια. Χρησιμοποιήστε αυτά τα αντιδραστήρια ακολουθώντας τις προφυλάξεις κατά τη χρήση (κυρίως: τη χρήση γαντιών, ποδιών και προστατευτικών γυαλιών).

7. Το 7-AAD είναι χρωμοφόρο που υπόκειται σε αποικοδόμηση λόγω έκθεσης στο φως. Πριν από τη χρήση, φυλάσσεται σε αδιαφανές φιαλίδιο για να προστατεύεται από το φως.

Αποφεύγετε τη συνεχή έκθεση στο φως κατά τα στάδια επώασης και ελαττώστε την έκθεση στο φως των δειγμάτων αφού πραγματοποιηθεί η σήμανση.

8. Πρέπει να θεωρείτε όλα τα δείγματα αίματος δυνητικά μολυσματικά και να τα χειρίζεστε με προσοχή (ειδικότερα: να φοράτε προστατευτικά γάντια, ποδιές και γυαλιά).
9. Τα σωληνάρια αίματος και το υλικό μίας χρήσης που χρησιμοποιούνται για τον χειρισμό πρέπει να απορρίπτονται σε ειδικά δοχεία που προορίζονται για αποτέφρωση.

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑΣ ΚΑΤΑ GHS

7-AAD Viability Dye

ΠΡΟΣΟΧΗ

H316

P332+P313

Προκαλεί ήπιο ερεθισμό του δέρματος.

Εάν παρατηρηθεί ερεθισμός του δέρματος:

συμβουλευθείτε/επισκεφθείτε γιατρό.

Διμεθυλσουλφοξίδιο 0,5 - 1,5%



Το Φύλλο Δεδομένων Ασφάλειας είναι διαθέσιμο στη διεύθυνση
beckman.com/techdocs

ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ

Το 7-AAD Viability Dye διατηρείται σε θερμοκρασίες μεταξύ 2 και 8 °C προστατευμένο από το φως, πριν και μετά από το άνοιγμα του φιαλιδίου.

Διάρκεια ζωής κλειστού φιαλιδίου ανά μελέτη σταθερότητας: 730 ημέρες.

Σταθερότητα ανοιχτού φιαλιδίου: το αντιδραστήριο παραμένει σταθερό για 60 ημέρες.

Δείτε το ειδικό για την παρτίδα πιστοποιητικό ανάλυσης στη διεύθυνση www.beckman.com.

ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ

Οποιαδήποτε μεταβολή στην εμφάνιση των αντιδραστηρίων είναι πιθανό να υποδεικνύει αλλοίωση και το αντιδραστήριο δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται.

Για επιπλέον πληροφορίες ή σε περίπτωση παραλαβής ελαττωματικού προϊόντος, επικοινωνήστε με την υπηρεσία εξυπηρέτησης πελατών της Beckman Coulter στο 800-742-2345 (για ΗΠΑ και Καναδά) ή με τον τοπικό αντιπρόσωπο της Beckman Coulter.

ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΑ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟ ΚΙΤ:

- Σωλήνες δειγματοληψίας και υλικό που είναι απαραίτητο για τη δειγματοληψία.
- Αυτόματες πιπέττες και ειδικά ρύγχη μιας χρήσης για τη λήψη ποσοτήτων όγκου 20, 100 και 500μL.
- Πλαστικά σωληνάρια αιμόλυσης.
- Αντιδραστήριο λύσης των ερυθροκυττάρων. Για παράδειγμα: Διάλυμα Λύσης IOTest3 (Κωδ. A07799).
- Ρυθμιστικό διάλυμα (PBS: 0,01M φωσφορικό νάτριο, 0,145M χλωριούχο νάτριο, pH7,2).
- Φυγόκεντρος.
- Αυτόματος αναδευτήρας (τύπου περιδίνησης).
- Κυτταρόμετρο ροής.

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Η συγκέντρωση των λευκοκυττάρων στο δείγμα πρέπει να είναι κατώτερη των 10⁴κυττάρων/μL (10¹⁰/L). Αραιώστε εάν χρειάζεται με PBS για να ξαναφέρετε τη συγκέντρωση σε λευκοκύτταρα στα 5x 10³κύτταρα/μL (5 x 10⁹/L).

Στη διαδικασία χρησιμοποιούνται 100 μL δείγματος, σωληναρίου προαραιωμένου ή άλλως.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ:

- Η ρύθμιση της έντασης του φθορισμού που αντιστοιχεί στο 7-AAD μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας τη σήμανση ενός δείγματος φρέσκου ολικού αίματος και μη βιώσιμων σταθεροποιημένων κυττάρων μέσα στον ίδιο σωλήνα (βλέπε εικόνα στο παράρτημα). Υπό αυτές τις συνθήκες, η ηλεκτρική τάση που αντιστοιχεί στην ανίχνευση του 7-AAD πρέπει να ρυθμιστεί κατά τρόπο ώστε τα βιώσιμα συμβάντα (δηλαδή το φρέσκο ολικό αίμα) να εμφανίζονται στην πρώτη δεκάδα σε ένα ιστόγραμμα SS σε συνάρτηση με το 7-AAD (βλέπε απεικόνιση στο παράρτημα).

- Μην χρησιμοποιείτε αντιδραστήρια που περιέχουν παράγοντες αύξησης της διαπερατότητας ή της στερεότητας κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ώστε να αποφευχθεί μια τεχνητή θετική σήμανση.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα, εισάγετε 20μL του διαλύματος 7-AAD Viability Dye.
- Προσθέστε 100 μL του προς εξέταση δείγματος, ήτοι το ισοδύναμο των 5×10^5 κυττάρων περίπου.
Ανακινήστε ελαφρά με Vortex.
- Επώαστε για 15 με 20 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (18–25 °C) και μακριά από εστίες φωτός.
- Κατόπιν, πραγματοποιήστε λύση των ερυθροκυττάρων, ακολουθώντας, αν απαιτείται, τις συστάσεις που αφορούν το αντιδραστήριο λύσης που χρησιμοποιείται.
Για παράδειγμα, αν επιθυμείτε να χρησιμοποιήσετε το Διάλυμα Λύσης IOTest3 (Κωδ. A07799), προσθέστε 2mL από αυτό το αντιδραστήριο στη συγκέντρωση χρήσης του (1X). Ανακινήστε με vortex αμέσως και επώαστε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και μακριά από εστίες φωτός.
Εάν το δείγμα δεν περιέχει ερυθρά αιμοσφαίρια, μην πραγματοποιείτε το βήμα λύσης, αλλά προσθέστε 0,5 με 1 mL PBS.
- Τα παρασκευάσματα πρέπει να αναλυθούν μέσα σε 1 ώρα.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Διατηρείτε τα παρασκευάσματα μεταξύ 2 και 8 °C και μακριά από εστίες φωτός.

ΑΠΟΔΟΣΗ

ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Οι ακτινομυκίνες είναι ενεργά βιολογικά συστατικά που αποτελούνται από ένα χρωμοφόρο (2-Amino-4,6Dimethylpheno-xazone-3) και κυκλικά πενταπεπτίδια (3). Πρόκειται για αντιβιοτικά βακτηριακών προελεύσεων που χαρακτηρίστηκαν πρώτα στους Ασκομύκητες του εδάφους. Οι ακτινομυκίνες σχηματίζουν σταθερά σύμπλοκα με το δίκλωνο δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA), αλλά δεν σχηματίζουν αυτού του είδους το σύμπλοκο ούτε με το δίκλωνο ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA), ούτε με τα υβρίδια DNA-RNA, ούτε με το μονόκλωνο DNA ή RNA.

Οι φασματικές ιδιότητες του 7-AAD το κάνουν να είναι ένα ιδιαίτερα προσαρμοσμένο μόριο στην ανάλυση μέσω κυτταρομετρίας ροής (3). Η μέγιστη απορρόφηση του συμπλέγματος 7-AAD/ADN είναι συμβατή με το μπλε μήκος κύματος διέγερσης των 488nm των κυτταρομετρητών που διαθέτουν λείζερ αργόν (4). Η κορυφή εκπομπής φθορισμού στο σκούρο κόκκινο (635με675nm) του συμπλέγματος 7-AAD/ADN επιτρέπει την βελτιστοποιημένη χρήση αυτού του ανιχνευτή όταν συνδυάζεται με αντισώματα συζευγμένα με Ισοθειοκυανικό Οξύ Φλουορεσκεΐνης (FITC) και με R Φυκοερυθρίνη (PE) (3). Πράγματι και αντίθετα με το ιωδίδιο του προπιδίου (IP) το οποίο ένας άλλος φωσφορίζων ανιχνευτής που χρησιμοποιείται ως δείκτης του DNA, το σύμπλοκο 7-AAD/ADN παρουσιάζει περιορισμένη επικάλυψη του φάσματος εκπομπής με το FITC και την PE.

ΑΚΡΙΒΕΙΑ

Οι ποσοστιαίες θετικές τιμές προσδιορίστηκαν με χρήση ολικού αίματος ενισχυμένου με θετικά κύτταρα. Κάθε δείγμα αναλύθηκε 4 φορές, δύο φορές την ημέρα για 1 ημέρα σε 2 όργανα με χρήση 2 παρτίδων αντιδραστηρίου χρωστικής βιωσιμότητας 7-AAD. Οι μετρήσεις (% θετικών) πραγματοποιήθηκαν σε κυτταρόμετρο ροής Navios. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με βάση τη μέθοδο CLSI EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Αξιολόγηση της απόδοσης ακρίβειας για μεθόδους ποσοτικής μέτρησης).

Τα κριτήρια έγκρισης εξαρτώνται από τον αριθμό των θετικών συμβάντων που μετρώνται για κάθε πληθυσμό:

- Σε περίπτωση θετικού συμβάντος <1.500, <15% CV
- Σε περίπτωση θετικού συμβάντος >1.500, <10% CV

Διάλυμα λύσης IOTest 3:

Ολικό αίμα ενισχυμένο με HPBALL σειρά κυττάρων							
Αριθμός θετικών συμβάντων (μέσος όρος) = 5539							
	Μεταξύ χειριστών	Μεταξύ κυτταρόμετρων	Εντός παρτίδας	Μεταξύ παρτίδων	Μεταξύ αναλύσεων	Εντός ανάλυσης	Σύνολο
CV (%)	1,48	1,55	4,44	1,41	2,87	3,05	4,91
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Σύστημα λύσης VersaLyse:

Ολικό αίμα ενισχυμένο με HPBALL σειρά κυττάρων							
Αριθμός θετικών συμβάντων (μέσος όρος) = 4034							
	Μεταξύ χειριστών	Μεταξύ κυτταρόμετρων	Εντός παρτίδας	Μεταξύ παρτίδων	Μεταξύ αναλύσεων	Εντός ανάλυσης	Σύνολο
CV (%)	3,73	1,85	8,74	1,79	3,63	7,02	9,11
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

ΑΚΡΙΒΕΙΑ

Η ακρίβεια της χρωστικής βιωσιμότητας 7-AAD αξιολογήθηκε μέσω σύγκρισης των αποτελεσμάτων με ένα αντιδραστήριο αναφοράς, ως μέσο πρόγνωσης, σε ένα σύνολο δειγμάτων ολικού αίματος ενισχυμένου με θετικά κύτταρα, που αναλύθηκαν σε κυτταρόμετρο NAVIOS. Το συστηματικό σφάλμα μεταξύ εξέτασης και αντιδραστηρίου αναφοράς προσδιορίστηκε με βάση τη διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων εξέτασης. Εάν το συστηματικό σφάλμα βρίσκεται εντός του επιτρεπόμενου εύρους σφαλμάτων ή η τιμή p δεν υποδεικνύει καμία σημαντική διαφορά ($> 0,05$), τα αποτελέσματα εξετάσεων των δειγμάτων ασθενών από τα δύο αντιδραστήρια θεωρούνται ισοδύναμα.

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν συνοψίζονται στον πίνακα που ακολουθεί:

Διάλυμα λύσης IOTest 3:

Αριθμός δοτών = 25				
Θετικός στόχος	Μέση τιμή Δ	Κριτήρια κυττάρων Δ %	Τιμή p	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
Ολικό αίμα ενισχυμένο με HPBALL σειρά κυττάρων	0,31	<5	0,247	PASS

Σύστημα λύσης VersaLyse:

Αριθμός δοτών = 25				
Θετικός στόχος	Μέση τιμή Δ	Κριτήρια κυττάρων Δ %	Τιμή p	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
Ολικό αίμα ενισχυμένο με HPBALL σειρά κυττάρων	-0,34	<5	0,289	PASS

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

- Η κυτταρομετρία ροής ενδέχεται να παράγει ψευδή αποτελέσματα αν το κυτταρόμετρο δεν είναι σωστά ευθυγραμμισμένο, αν οι διαρροές φθορισμού δεν έχουν αντισταθμιστεί σωστά και αν οι περιοχές δεν έχουν τοποθετηθεί προσεκτικά.
- Ακριβή και επαναλήψιμα αποτελέσματα προκύπτουν στο μέτρο που οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται είναι σύμφωνες με το ένθετο τεχνικών οδηγιών και συμβατές με τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές.
- Το 7-AAD, δραστική ουσία αυτού του αντιδραστηρίου, έχει βαθμονομηθεί έτσι ώστε να προσφέρει την καλύτερη σχέση ειδικής σήμανσης / μη ειδικής σήμανσης. Για αυτό το λόγο, είναι σημαντικό να τηρείτε την αναλογία όγκου αντιδραστηρίου / όγκου δείγματος σε κάθε δοκιμασία.
- Σε περίπτωση υπερλευκοκυττάρωσης, αραιώστε το αίμα με PBS ώστε να επιτύχετε μια τιμή που να προσεγγίζει τα 5×10^9 λευκοκύτταρα / L.
- Σε κάποιες συγκεκριμένες παθολογικές καταστάσεις, όπως οι σοβαρές νεφρικές ανεπάρκειες ή οι αιμοσφαιρινοπάθειες, η λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων μπορεί να επιβραδυνθεί, ακόμη και να γίνει ατελής ή αδύνατη. Σε αυτήν την περίπτωση, συστήνεται η απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων με βάση το βαθμό πυκνότητας (για παράδειγμα: Ficoll) πριν από τη σήμανση.

Δείτε το Παράρτημα για παραδείγματα και παραπομπές.

ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΣΗΜΑΤΑ

Η επωνυμία Beckman Coulter, το τυποποιημένο λογότυπο και τα σήματα προϊόντων και υπηρεσιών της Beckman Coulter που αναφέρονται στο παρόν είναι εμπορικά σήματα ή σήματα κατατεθέντα της Beckman Coulter, Inc. στις Ηνωμένες Πολιτείες και σε άλλες χώρες.

ΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Για ασθενή/χρήστη/τρίτους στην Ευρωπαϊκή Ένωση και σε χώρες με όμοιο ρυθμιστικό καθεστώς (Οδηγία 2017/746/ΕΕ σχετικά με τα in vitro διαγνωστικά ιατροτεχνολογικά προϊόντα), εάν, κατά τη χρήση αυτής της συσκευής ή ως αποτέλεσμα της χρήσης της, προκύψει σοβαρό περιστατικό, πρέπει να το αναφέρετε στον κατασκευαστή ή/και στον εξουσιοδοτημένο αντιπρόσωπό του και στις εθνικές αρχές της χώρας στην οποία κατοικείτε.

ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΑΝΑΘΕΩΡΗΣΕΩΝ

ΑΝΑΘΕΩΡΗΣΗ AF:	Ημερομηνία έκδοσης: Οκτώβριος 2021
ΑΝΑΘΕΩΡΗΣΗ AW:	Ημερομηνία έκδοσης: Απρίλιος 2022
Ενημερώσεις για την επίτευξη συμμόρφωσης με την παγκόσμια πολιτική σήμανσης της Beckman Coulter και σύμφωνα με τις απαιτήσεις IVD-R (EE)2017/746:	
Προσθήκη ενότητων	«Προβλεπόμενος χρήστης», «Συγκέντρωση», «Ακρίβεια», «Ορθότητα», «Πρόσθετες πληροφορίες», «Ιστορικό αναθεωρήσεων»
Προσθήκη πληροφοριών	Δείτε τις ενότητες «Αρχή της διαδικασίας»

Ενημερωμένες ενότητες	«Αρχή της διαδικασίας», «Προειδοποίηση και προφυλάξεις», «Ταξινόμηση επικινδυνότητας κατά ΠΕΣ», «Φύλαξη και σταθερότητα», «Ενδείξεις αλλοίωσης», «Περιορισμοί», «Παράρτημα»
Αφαίρεση ενοτήτων	«Μεθοδολογία», «Παραδείγματα κλινικών εφαρμογών», «Αναμενόμενα αποτελέσματα», «Ενδοεργαστηριακή επαναληψιμότητα», «Γραμμικότητα»

ΑΝΑΘΕΩΡΗΣΗ	Ημερομηνία έκδοσης
ΑΧ	Οκτώβριος 2022
Ενημερωμένες ενότητες	Προσθήκη μεταφράσεων

ΑΝΑΘΕΩΡΗΣΗ	Ημερομηνία έκδοσης
ΑΥ	
Ενημερωμένες ενότητες	Φύλαξη και σταθερότητα

Υπόμνημα συμβόλων

Το γλωσσάριο συμβόλων είναι διαθέσιμο στη διεύθυνση beckman.com/techdocs (αριθμός εγγράφου B60062)

	仕様 7-AAD生存率色素
製剤	液状
巻 (本)	3 mL
キャリブレーション	すぐに使用できる
λ励起	488 nm
発光のピーク	655 nm (二本鎖DNAとの複合体)

7-AAD Viability Dye

REF A07704 テスト150回分、3 mL、
20 µL/テスト

体外診断用医薬品

用途

7-AAD生存率色素は、溶液中の化学着色剤で、フローサイトメトリーを使用した単一パラメトリック分析またはマルチパラメトリック分析用に設計されています。これにより、非生存細胞を同定し、ヒト白血球の分析対象の（生存）細胞から除外することができます。

原理

7-アミノアクチノマイシンD（7-Amino-Actinomycin D）（7-AAD）は、発色団の位置7に置換アミン基を持つアクチノマイシンのアナログです。7-AADは、DNAのシトシン/グアニン塩基の上部の間に自身を挿入します（1）。

DNA二本鎖の染色は、7-AAD生存率色素で検体をインキュベートすることによって行います。次に、赤血球を溶解して除去し、白血球をフローサイトメトリーによって分析します。

アポトーシス性壊死細胞および/または損傷した細胞は、フローサイトメトリーを使用した生存細胞の分析において、干渉の原因になります。非生存細胞は7-AADで染色されることで特性評価および同定されますが、一方、膜の完全性が維持されている生存細胞には7-AADが浸透せず、染色されません（7-AAD陰性）（2）。

フローサイトメーターは、細胞の光拡散および蛍光を測定します。フローサイトメーターにより、直角散乱光（側方散乱、SS）と7-AAD染色に対応する蛍光とを関連付けるヒストグラム上で定義した電子枠内の細胞の位置確認が可能になります。サイトメーターで使用する2つの異なるパラメータを組み合わせた別のヒストグラムもゲーティング段階で使用します。

陽性染色イベント（非生存）を非染色イベント（生存）から排除するために、こうしてゲーティングした細胞の蛍光を分析します。結果は、ゲーティングによって検討対象になった全イベントに対する非蛍光イベントの比率として表すことができます。

対象ユーザー

本製品は、検査室での専門的な使用を目的としています。

検体

静脈血は、抗凝固剤としてEDTA塩を含有する無菌チューブを用いて採取しなければなりません。

検体は室温（18～25℃）で保管し、揺らさないようにする必要があります。検体は、テスト検体を採取する前に、穏やかな振とうによって均質化する必要があります。

この検体は、静脈穿刺から24時間以内に分析する必要があります。

警告および注意

- 有効期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
- 凍結しないでください。
- 使用前に室温（18～25℃）にしてください。
- 露光をできるだけ避けてください。
- 試薬の微生物汚染を避けてください。誤った結果の原因となる場合があります。
- このすぐに使用できる試薬は、7-AADを0.005%（重量/容量）、ジメチルスルホキシド（DMSO）を1%（容量/容量）含んでいます。

純粋な形では、7-AADは発癌性の可能性があり、DMSOは刺激性です。

これらの成分は、現在の剤型では極端に希釈されていますが、有害作用を全てまたは一部保持している可能性があります。絶対に口でピペットを吸わないでください。また、皮膚、粘膜、目に触れないようにしてください。これらの試薬は、使用上の注意事項（特に手袋、実験着、保護眼鏡の着用）に従って使用してください。

7. 7-AADは、光曝露によって分解する発色団です。7-AADは、使用前に遮光するため、不透明バイアル中で保管します。
インキュベーション手順の間、継続的な光曝露を避け、染色後も検体の光曝露を少なくします。
8. すべての血液検体は感染性の可能性があるためとみなして慎重に取り扱う必要があります（特に保護手袋、実験着、ゴーグルの着用）。
9. 使用済みの採血管およびディスプレイ製品は、焼却用の専用容器に入れて廃棄してください。

GHSハザード分類

7-AAD Viability Dye

警告

H316

P332+P313

軽度の皮膚刺激。

皮膚刺激が生じた場合:医師の診察/手当を受けること。

ジメチルスルホキシド 0.5 - 1.5%



安全性データシートは、beckman.com/techdocsで入手できます

保管および安定性

7-AAD生存率色素は、バイアル開封の前後に2～8℃で保管し、遮光する必要があります。

各安定性試験におけるクローズドバイアルの保存期間：730日間

開封後のバイアル：試薬は60日間安定しています。

www.beckman.comでロット固有の分析証明書を参照してください。

変質や劣化の兆候

試薬の物理的な外観の変化は劣化の徴候である場合があります、その試薬を使用してはなりません。

追加情報に関して、または損傷している製品をお受け取りになった場合、ベックマン・コールターのカスタマーサービス800-742-2345（米国またはカナダ）にお電話をくださるか、最寄りの代理店に連絡してください。

ご用意いただくもの:

- ・ サンプリングに必要なサンプリングチューブと材料。
- ・ 使い捨てチップ付き自動ピペット（20、100および500 µL用）。
- ・ プラスチックの溶血チューブ。
- ・ 赤血球溶解試薬。例：IOtest3溶解液（REF A07799）。
- ・ 緩衝化剤（PBS：0.01 Mリン酸ナトリウム、0.145 M塩化ナトリウム、pH 7.2）。
- ・ 遠心機
- ・ 自動アジテーター（ボルテックスタイプ）。
- ・ フローサイトメーター

検体の調製

検体中の白血球濃度は、 10^4 細胞/µL（ 10^{10} /L）未満である必要があります。必要に応じてPBSで希釈し、白血球濃度を 5×10^3 細胞/µL（ 5×10^9 /L）にします。

本手順では、100 µLの検体、希釈済みまたは未希釈のチューブを使用します。

注意：

- ・ 7-AADに対応する蛍光強度の調整は、同じチューブ内の全新鮮血液検体および非生存安定化細胞の染色により行うことができます（附録の画像を参照）。これらの条件下では、7-AADの検出に対応する電圧を調整して、7-AADに依存して生存イベント（つまり全新鮮血）がSSヒストグラムの最初の10年間に現れるようにする必要があります（附録の例を参照）。
- ・ アーティファクトの陽性染色を防ぐため、手順中に透過性または固定剤を含む試薬を使用しないでください。

手順

1. 各テストチューブに20 µLの7-AAD生存率色素溶液を加えます。
2. 100 µLのテスト検体（約 5×10^5 細胞に相当）を加えます。
チューブを穏やかに攪拌します。
3. 遮光した状態で、室温（18～25℃）で15～20分間インキュベートします。
4. 必要に応じて、使用する溶解試薬の推奨事項に従い、赤血球を溶解します。

たとえば、IOTest3溶解液（REF A07799）を使用する場合、2 mLの希釈標準液（1X）を加えて直ちに攪拌し、室温、遮光下で10分間インキュベートします。

検体に赤血球が含まれていない場合は、溶解手順を実施せずに、0.5～1 mLのPBSを加えます。

5. 調製物は1時間以内に分析する必要があります。

注記：いずれの場合も、調製物は、遮光して2～8℃で保管します。

性能

特異性

アクチノマイシンは、発色団（2-アミノ-4,6ジメチルフェノキサゾン-3）および環状ペプタドの活性生物学的成分です（3）。これらは、歴史的に土壌中の子の菌類で特徴付けられた細菌由来の抗生物質である。アクチノマイシンは、二本鎖デオキシリボ核酸（DNA）と安定な複合体を形成しますが、二本鎖リボ核酸（RNA）やRNA-DNAハイブリッド、あるいは一本鎖のDNAやRNAとは複合体を形成しません。

7-AADのスペクトル特性により、フローサイトメトリー分析に特に適した化合物となります（3）。7-AAD/DNA複合体の最大吸収は、アルゴンレーザーを装備したサイトメーターの青色励起波長488 nmに適合しています（4）。7-AAD/DNA複合体の暗赤色帯（635～675 nm）のピーク蛍光発光により、このプローブをフルオレセインイソチオシアネート標識抗体（FITC）およびRフィコエリトリン（PE）と組み合わせた場合に最適な使用が可能になります（3）。実際、DNAマーカーとして使用されている別の蛍光プローブであるヨウ化プロピジウム（PI）とは対照的に、7-AAD/DNA複合体ではFITCおよびPEと重複する発光スペクトルが低減しています。

精密性

陽性細胞を添加した全血を用いて、陽性率の値を判定しました。各検体について、2台の装置で1日に2回で計4回の測定を、2ロットの7-AAD Viability Dye試薬を使用して行いました。Naviosフローサイトメーターで測定（%陽性）しました。CLSIメソッドEP5-A2に基づいて分析しました。Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods.（定量的測定メソッドの精密性性能の評価。）

当社の判定基準は、各集団について測定された陽性イベントの数によって異なります。

- 陽性イベント< 1,500の場合、CV< 15%
- 陽性イベント> 1,500の場合、CV< 10%

IOTest 3溶血試薬：

HPBALL細胞株を添加した全血							
陽性イベント数（平均）= 5539							
	オペレータ間	血球計算器間	ロット内	ロット間	測定間	測定内	総計
CV（%）	1.48	1.55	4.44	1.41	2.87	3.05	4.91
結果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

VersaLyse溶解システム：

HPBALL細胞株を添加した全血							
陽性イベント数（平均）= 4034							
	オペレータ間	血球計算器間	ロット内	ロット間	測定間	測定内	総計
CV（%）	3.73	1.85	8.74	1.79	3.63	7.02	9.11
結果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

正確性

7-AAD Viability Dyeの正確性は、一連の陽性細胞を添加した全血検体の結果を、NAVIOSSサイトメーターで測定した規準としての参照試薬の結果と比較して評価しました。テスト試薬と参照試薬の間のバイアスを、テスト結果の差に基づいて決定しました。バイアスが許容誤差範囲内にある場合、またはp値が有意差を示さない場合（> 0.05）、2つの試薬による患者検体のテスト結果は同等と見なされます。

得られた結果を、下表にまとめます。

IOTest 3溶血試薬：

ドナー数 = 25				
陽性標的細胞	平均Δ	Δ % 細胞基準	p値	結果
HPBALL細胞株を添加した全血	0.31	<5	0.247	PASS

VersaLyse溶解システム：

ドナー数 = 25				
陽性標的細胞	平均Δ	Δ % 細胞基準	p値	結果
HPBALL細胞株を添加した全血	-0.34	<5	0.289	PASS

制限事項

1. フローサイトメトリーは、血球計数器が完全に配列されていない場合、蛍光リークが正しく相殺されていない場合、および領域が慎重に配置されていない場合、誤った結果を示す可能性があります。
2. 取扱説明書および対応する検査室の実施基準に従って作業する限り、正確かつ再現性のある結果が得られます。
3. この試薬中の有効成分である7-AADは、最良の特異的/非特異的シグナル比を示すように最適化されています。そのため、各テストにおいて、試薬量/検体量比を順守することが重要です。
4. 白血球増加症の場合、白血球数がおよそ 5×10^9 個/Lとなるよう、血液をPBSで希釈してください。
5. 重度の腎不全やヘモグロビン異常など、特定の疾患状態では、赤血球の溶解が遅くなったり、不完全になったり、あるいは溶解できないことさえあります。この場合、染色する前に密度勾配 (Ficollなど) を使用して単核細胞を分離することを推奨します。

附録にある例および参考文献を参照してください。

商標

ここに記載されているBeckman Coulter、ロゴマーク、ならびにベックマン・コールターの商品およびサービスマークは、ベックマン・コールターの米国およびその他の国における商標と登録商標です。

その他

欧州連合、および規制制度が欧州連合と同一の国の患者/ユーザー/第三者 (体外診断医療機器規制2017/746/EU) については、本機器の使用または使用の結果、重大な事故が発生した場合、製造元および/または認定代理店ならびに所管の行政機関に報告してください。

改訂履歴

改訂番号 AF :	公開日 : 2021年10月
改訂番号 AW :	発行日 : 2022年4月
ベックマン・コールターのグローバルラベリングポリシーおよびIVD-R (EU) 2017/746の要件に準拠するための更新:	
セクションの追加	対象ユーザー、濃度、精密性、正確性、その他、改訂履歴
情報を追加	「原理」のセクションを参照
セクションの更新	原理、警告および注意、GHS/ハザード分類、保管および安定性、劣化の兆候、制限、附録
セクションの削除	方法、臨床応用の例、期待値、施設内再現性、直線性
改訂	発行日
AX	2022年10月
セクションの更新	翻訳を追加
改訂	発行日
AY	
セクションの更新	コントロールの調製

記号凡例

記号一覧は、beckman.com/techdocsで入手できます (文書番号B60062)

	规格 7-AAD 死活细胞鉴定染料
剂型	液体
容量	3 mL
校准	即用型
λ 激励	488 nm
辐射峰值	655 nm (与双链 DNA 形成复合物)

7-AAD 活性染色剂

REF A07704 150 次测试；3 mL，20 µL / 测试

供体外 **诊断** 使用

预期用途

7-AAD 死活细胞鉴定染料是一种化学着色剂溶液，用于流式细胞术单参数或多参数分析。该试剂可在人类白细胞分析中帮助鉴别无活性细胞，并将其从感兴趣（活性）细胞中排除。

原理

7-氨基放线菌素 D (7-AAD) 是一种类似放线菌素，其发色团的位置 7 上有一个替代氨基。7-AAD 会将自身插入到 DNA 的胞嘧啶/鸟嘌呤碱基的顶端之间 (1)。

用 7-AAD 死活细胞鉴定染料孵育样本，以对 DNA 双链进行染色。然后通过裂解去除红细胞，再使用流式细胞术分析白细胞。

凋亡、坏死和/或受损细胞是流式细胞术分析活细胞的干扰源之一。非活性细胞会发生 7-AAD 染色，因而可以被表征和鉴定；活细胞具有完整的细胞膜，7-AAD 无法渗透，因而未被染色（即 7-AAD 阴性）(2)。

流式细胞仪可分析细胞的光漫射和荧光。这样可以定位直方图上定义的电子窗口内的细胞，直方图可以关联光的正交漫射（侧向角散射，即 SS）和 7-AAD 染色所对应的荧光。在设门阶段还可以使用细胞仪上提供的可结合两个不同参数的其他直方图。

对经设门处理的细胞进行荧光分析，以从未染色颗粒（活性细胞）中排除阳性染色颗粒（无活性细胞）。结果可表示为非荧光颗粒占设门考虑的所有颗粒的百分比。

预期用户

本产品的预期用户为实验室专业人员。

样本

必须使用含有 EDTA 盐作为抗凝血剂的无菌试管采集静脉血。

样本应保存在室温 (18-25°C) 条件下，并注意避免摇动。在吸取测试样本之前，应通过轻轻搅动使样本均质化。

样本必须在静脉采血后的 24 小时内分析。

警告和注意事项

1. 请勿使用已过失效日期的试剂。
2. 切勿冷冻。
3. 使用前使其达到室温 (18-25°C)。
4. 尽量减少曝光。
5. 避免试剂受到微生物污染，否则可能出现错误结果。
6. 此即用型试剂含有 0.005%（重量/体积）的 7-AAD 和 1%（体积/体积）的二甲基亚砜 (DMSO)。
纯的 7-AAD 具有潜在致癌性，DMSO 则是一种刺激物。

虽然在本配方中已被极度稀释，但这些成分的有害效应可能会全部或部分保留。不得通过嘴巴移液，并避免以任何方式接触皮肤、黏膜和眼睛。使用这些试剂时应遵守使用注意事项（特别是：戴手套、穿防护服和戴防护眼镜）。


7. 7-AAD 是一种发色团，在光照下会降解。使用前，应避光储存在不透明的小瓶中。
在孵育阶段应避免持续暴露在光线下，进行染色之后也应减少样本在光线下的暴露时间。
8. 所有血样都必须被视为具有潜在传染性，并且必须小心处理（具体地讲：穿戴防护手套、防护服和护目镜）。
9. 用于处理的血液试管和一次性材料应丢弃于专门用于焚化的容器中。

GHS 危险等级分类

7-AAD Viability Dye

警告
H316
P332+P313

造成轻微皮肤刺激。
如发生皮肤刺激：求医/就诊。
二甲亚砜 0.5 - 1.5%

 化学品安全技术说明书提供于 beckman.com/techdocs

存储和稳定性

在开瓶前后，必须将 7-AAD 死活细胞鉴定染料避光保存在 2-8°C 环境下。

根据稳定性研究的开封前保质期：730 天。

已开瓶试剂的稳定性：试剂可稳定保存 60 天。

请参阅 www.beckman.com 上的特定批次分析证书。

变质的迹象

试剂物理外观的任何变化都可能表明试剂变质，此时不应使用试剂。

有关其他信息，或者如果收到受损产品，请致电贝克曼库尔特公司客服：800-742-2345（美国或加拿大），或联系您当地的贝克曼库尔特代表。

试剂盒中未提供的必需材料：

- 采样所需的采样管和材料。
- 带 20、100 和 500 µL 一次性吸头的自动移液器。
- 塑料溶血管。
- 红细胞裂解试剂。例如：IOtest 3 裂解液（参考号 A07799）
- 缓冲液（PBS：0.01 M 磷酸钠；0.145 M 氯化钠；pH 7.2）。
- 离心处理。
- 自动搅动器（旋涡型）。
- 流式细胞仪。

制备样本

样本中的白细胞浓度必须低于 10^4 个/µL（ 10^{10} 个/L）。如有必要，用 PBS 将白细胞浓度稀释至 5×10^3 个/µL（ 5×10^9 个/L）。

此程序使用每试管 100 µL 预稀释或未稀释的样本。

注意：

- 通过对同一试管中的新鲜全血样本和非活性稳定细胞样本进行染色，可以对 7-AAD 的荧光强度进行调节（见附录中的图片）。在这些条件下，必须调节 7-AAD 的检测电压，使得活性颗粒（即新鲜全血）出现在 SS 直方图的第一个十进位范围，具体取决于 7-AAD（见附录示例）。
- 在此程序期间不得使用含有渗透剂或固定剂的试剂，以免出现人为的阳性染色。

程序

1. 向每个试管中添加 20 µL 7-AAD 死活细胞鉴定染料溶液。
2. 添加 100 µL 测试样本（即相当于大约 5×10^5 个细胞）。
轻轻摇动试管。
3. 在室温 (18-25°C) 下避光孵育 15-20 分钟。
4. 然后，遵循溶解试剂使用建议，将红细胞溶解（如有必要）。
例如，如果希望使用 IOtest 3 裂解液（参考号 A07799），则加入 2 mL 工作液 (1X)，立即摇动，并在室温条件下避光孵育 10 分钟。
如果样本不含红细胞，请勿进行裂解步骤，而应添加 0.5-1 mL PBS。
5. 应在 1 小时内分析制备样本。

注释：任何情况下，制备试剂均需在 2-8°C 下避光保存。

性能

特异性

放线菌素是发色团（2-氨基-4,6 二甲基吩恶嗪酮-3）和环状五肽的活性生物成分 (3)。它们是细菌源性抗生素，历来存在于土壤子囊菌中。放线菌素会与双链脱氧核糖核酸 (DNA) 形成稳定复合物，但无法与双链核糖核酸 (RNA) 或 RNA-DNA 杂交体或单链 DNA 或 RNA 形成稳定复合物。

7-AAD 的光谱特性使得此化合物特别适用于流式细胞术分析 (3)。7-AAD/DNA 复合物的最大吸收与安装氩激光器的细胞仪的 488 nm 蓝色激发波长兼容 (4)。将 7-AAD/DNA 复合物在深红波段（635 至 675 nm）的荧光发射峰与异硫氰酸荧光素结合抗体 (FITC) 和藻红蛋白 (PE) 配合使用，可发挥此探针的最佳效果 (3)。事实上，与用作 DNA 标志物的另一种荧光探针碘化丙啶 (PI) 相比，7-AAD/DNA 复合物与 FITC 和 PE 的发射光谱重叠较少。

精度

阳性百分比值用掺入阳性细胞的全血样本测定。每个样本使用 2 个批次的 7-AAD 死活细胞鉴定染料试剂，在 2 台仪器上设 4 个平行样运行，每天运行 2 次，为期 1 天。使用 Navios 流式细胞仪进行测量（阳性 %）。分析基于 CLSI 方法 EP5-A2：Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods（EP5-A2：定量测量方法精度性能的评估）。我们的接受限取决于针对每个群体所测得的阳性颗粒数：

- 如果阳性颗粒数 < 1,500，则 CV < 15%
- 如果阳性颗粒数 > 1,500，则 CV < 10%

IOTest 3 裂解液：

掺有 HPBALL 细胞系的全血							
阳性颗粒数（平均值）= 5539							
	操作人员间	细胞仪间	批次内	批次间	运行间	运行内	总数
CV (%)	1.48	1.55	4.44	1.41	2.87	3.05	4.91
结果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

VersaLyse 裂解系统：

掺有 HPBALL 细胞系的全血							
阳性颗粒数（平均值）= 4034							
	操作人员间	细胞仪间	批次内	批次间	运行间	运行内	总数
CV (%)	3.73	1.85	8.74	1.79	3.63	7.02	9.11
结果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

准确性

评估 7-AAD 死活细胞鉴定染料的准确性的方法为：将其与参考试剂分别应用于一组掺有阳性细胞的全血样本，然后用 NAVIOS 细胞仪进行检测，之后比较结果。该测试与参考试剂之间的偏差根据测试结果的差异而确定。如果偏差在允许的误差范围内，或者 p 值没有显著差异 (> 0.05)，则认为这两种试剂对患者样本的测试结果是等效的。

所得结果如下表所示：

IOTest 3 裂解液：

献血人次 = 25				
阳性目标	平均值 Δ	Δ % 细胞标准	p 值	结果
掺有 HPBALL 细胞系的全血	0.31	<5	0.247	PASS

VersaLyse 裂解系统：

献血人次 = 25				
阳性目标	平均值 Δ	Δ % 细胞标准	p 值	结果
掺有 HPBALL 细胞系的全血	-0.34	<5	0.289	PASS

- 限制
1. 若流式细胞术未完全校准、荧光泄漏未得到正确补偿或未在该区域谨慎定位，则流式细胞术可能会产生错误结果。
 2. 只要所使用的程序符合技术插页说明书并遵守实验室管理规范，就可以获得准确和可重现的结果。
 3. 此试剂中的活性物质 7-AAD 已经过优化，可提供最佳的特异性/非特异性信号比率。因此，在每次测试中都务必遵从此试剂体积/样本体积比率。
 4. 如果白细胞过多，则用 PBS 将血样中的白细胞浓度稀释至约 5 x 10⁹ 个/L。
 5. 在严重肾衰竭、血红蛋白病等特定疾病状态中，红细胞裂解会变得缓慢、不完全，甚至无法实现。在这种情况下，建议在染色前通过密度梯度法（例如 Ficoll）分离单核细胞。

请参阅附录中的示例和参考文献。

商标

Beckman Coulter、标志以及文中提及的贝克曼库尔特产品和服务标记均是美国贝克曼库尔特有限公司在美国和其他国家/地区的商标或注册商标。

其他信息

对于欧盟及具有相同监管制度的国家/地区的患者/用户/第三方 (Regulation 2017/746/EU on In vitro Diagnostic Medical Devices [有关体外诊断医疗装置的法规 2017/746/EU]) : 如果在使用本装置期间或由于使用本装置而发生严重事件, 请向制造商和/或其授权代表以及当地国家主管部门报告。

修订历史

修订版本 AF :	发布日期 : 2021 年 10 月
修订版本 AW :	发布日期 : 2022 年 4 月
更新文档以符合贝克曼库尔特公司全球标签政策和 IVD-R (EU)2017/746 的要求 :	
新增章节	目标用户, 浓度, 精度, 准确性, 其他信息, 修订历史
添加了信息	参见“原理”章节
更新后章节	原理、警告和注意事项, GHS 危险等级分类, 储存及稳定性, 变质的迹象, 限制, 附录
删除了几个章节	方法, 临床应用示例, 预期结果, 实验室内重复性, 线性度
修订	发布日期
AX	2022 年 10 月
更新后章节	增加了翻译
修订	发布日期
AY	
更新后章节	储存及稳定性

符号注解

符号词汇表发布于 beckman.com/techdocs (文档编号 B60062)

	7-AAD gyvybingumo dažiklio specifikacijos
Būsena	Skystis
Tūris	3 ml
Kalibravimas	Paruošta naudoti
λ žadinimas	488 nm
Skleidžiamos šviesos smailė	655 nm (kompleksas su dvigrande DNR)

7-AAD gyvybingumo tyrimo dažiklis

[REF] A07704 150 tyrimų; 3 ml, 20 μ l tyrimui

In vitro diagnostiniam naudojimui

NAUDOJIMO PASKIRTIS

7-AAD gyvybingumo dažiklis yra cheminė dažomoji medžiaga tirpale, skirta vienparametrei arba daugiaparametrei analizei srauto citometrijos analizės būdu. Jis leidžia identifikuoti negyvybingas ląsteles ir išskirti jas iš (gyvybingų) dominančių ląstelių analizuojant žmogaus leukocitus.

PRINCIPAS

7-aminoaktinomicinas D (7-AAD) yra aktinomicino analogas, kurio sudėtyje yra pakeista amino grupė chromoforo 7 padėtyje. 7-AAD įsiterpia tarp DNR citozino / guanino bazių viršūnių (1).

DNR dvigrandė gija dažoma mėginį inkubuojant 7-AAD gyvybingumo dažikliu. Tada lizuojant pašalinami eritrocitai ir srauto citometrijos būdu analizuojami leukocitai.

Apoptozinės, nekrozinės ir (arba) pažeistos ląstelės sukelia trukdžius analizuojant gyvybingas ląsteles srauto citometrijos būdu. Negyvybingas ląsteles galima apibūdinti ir identifikuoti, nes jos nudažytos 7-AAD, o gyvos ląstelės, išlaikiusios membranınį vientisumą, nepraleidžia 7-AAD ir yra nedažytos (t. y. 7-AAD neigiamos) (2).

Srauto citometru analizuojama ląstelių šviesos difuzija ir fluorescencija. Šiuo būdu galima ląsteles lokalizuoti histogramoje apibrėžtu elektroniniu langu, kuriame šviesos sklaida stačiu kampu (šonine sklaida arba ŠS) koreliuojama su fluorescencija, atitinkančia 7-AAD nudažymą. Kitos citometre įdiegtos histogramos, kuriose derinami du skirtingi parametrai, taip pat naudojamos nustatant atrankos intervalus.

Tuomet analizuojama gautų ląstelių fluorescencija, kad teigiamai nudažyti įvykiai (negyvybingi) būtų atskirti nuo nenudažytų (gyvybingų). Rezultatai gali būti išreikšti kaip nefluorescencinių įvykių procentinė dalis visų įvykių, gautų nustačius atrankos intervalą, atžvilgiu.

NUMATOMAS NAUDOTOJAS

Šis gaminyss skirtas naudoti specialistams laboratorijose.

MĖGINIAI

Veninio kraujo mėginius reikia imti į sterilius mėgintuvėlius su EDTA druska kaip antikoaguliantu.

Mėginius reikia laikyti kambario temperatūroje (18–25 °C) ir nekratyti. Prieš paimant tiriamąjį mėginį reikia atsargiai sujudinti mėginį, kad jis taptų vienalytis.

Mėginiai turi būti išanalizuoti per 24 valandas po venų punkcijos.

ĮSPĖJIMAI IR ATSARGUMO PRIEMONĖS

1. Reagento nenaudoti pasibaigus galiojimo laikui.
2. Neužšaldyti.
3. Prieš naudojant reikia leisti sušilti iki kambario temperatūros (18–25 °C).
4. Laikykite kuo mažiau apšviestoje vietoje.
5. Saugokite, kad reagentai nebūtų užteršti mikrobais, nes antraip gali būti gaunami klaidingi rezultatai.
6. Šiame paruoštame naudoti reagente yra 0,005 % (svoris / tūris) 7-AAD ir 1 % (tūris / tūris) dimetilsulfoksido (DMSO).

Grynos formos 7-AAD yra potencialiai kancerogeniškas, o DMSO yra dirginanti medžiaga.

Nors šios sudedamosios dalys yra labai praskiestos šiame preparate, jos gali išlaikyti visą savo kenksmingą poveikį arba jo dalį. Jokiu būdu nesiurbkite burna ir saugokitės, kad nepatektų ant odos, gleivinės ir į akis. Šiuos reagentus naudokite laikydamiesi atsargumo priemonių (ypač mūvėdami pirštines, dėvėdami chalata ir apsauginius akinius).

7. 7-AAD yra chromoforas, skaidomas veikiant šviesai. Prieš naudojant jis laikomas nepermatomame buteliuke, kad būtų apsaugotas nuo šviesos.

Inkubavimo etapais venkite nuolatinio šviesos poveikio ir sumažinkite šviesos poveikį mėginiams, kai jie nudažomi.

8. Visi kraujo mėginiai turi būti laikomi potencialiai užkrečiamais ir su jais turi būti elgiamasi atsargiai (itin svarbu dėvėti apsaugines pirštines, apsiaustus ir akinius).
9. Panaudoti kraujo mėgintuvėliai ir vienkartinės medžiagos turėtų būti išmetami į sudeginamas ad hoc talpyklas.

GHS PAVOJINGUMO KLASIFIKACIJA

7-AAD Viability Dye

ATSARGIAI

H316

P332+P313

Sukelia nedidelį odos dirginimą.

Jeigu sudirginama oda: kreiptis į gydytoją.

Dimetilsulfoksidas 0,5 - 1,5 %



Saugos duomenų lapą galima gauti interneto svetainėje beckman.com/techdocs

LAIKYMAS IR STABILUMAS

Prieš atidarant ir atidarius buteliuką 7-AAD gyvybingumo dažiklis turi būti laikomas nuo 2 iki 8 °C temperatūroje ir saugomas nuo šviesos.

Uždaryto buteliuko tinkamumo naudoti laikas pagal stabilumo tyrimą: 730 d.

Atidaryto buteliuko stabilumas: reagentas lieka stabilus 60 d.

Žr. konkrečios partijos analizės sertifikata, pateikiamą interneto svetainėje www.beckman.com.

KOKYBĖS PABLOGĖJIMO POŽYMAI

Bet koks reagentų fizinės išvaizdos pokytis gali reikšti pablogėjusias gaminio savybes, todėl tokio reagento naudoti negalima.

Prireikus papildomos informacijos arba gavę sugadintą gaminį skambinkite į „Beckman Coulter“ klientų aptarnavimo skyrių telefonu 800-742-2345 (JAV arba Kanadoje) arba susisiekite su vietiniu „Beckman Coulter“ atstovu.

REIKALINGOS, BET SU RINKINIU NEPAITEIKTOS MEDŽIAGOS

- Mėginiams imti reikalingi mėginių ėmimo mėgintuvėliai ir medžiagos.
- Automatinės pipetės su vienkartiniais antgaliais, skirtos 20, 100 ir 500 µl tūrio mėginiams.
- Plastikiniai hemolizės mėgintuvėliai.
- Eritrocitų lizinis reagentas. Pavyzdys: „IOtest 3“ lizavimo tirpalas (nuor. A07799).
- Buferinis tirpalas (PBS: 0,01 M natrio fosfato; 0,145 M natrio chlorido; pH 7,2).
- Nucentrifuguokite.
- Automatinis maišytuvas (sūkurinio tipo).
- Srauto citometras.

MĖGINIŲ PARUOŠIMAS

Leukocitų koncentracija mėginyje turi būti mažesnė nei 10^4 ląstelių/µl (10^{10} /l). Prireikus atskieskite PBS tirpalu, kad leukocitų koncentracija būtų sumažinta iki 5×10^3 ląstelių/µl (5×10^9 /l).

Procedūrai atlikti reikia 100 µl mėginio, iš anksto atskiesto arba ne, mėgintuvėlyje.

Dėmesio.

- Fluorescencijos intensyvumą, atitinkantį 7-AAD, galima reguliuoti dažant viso šviežio kraujo mėginį ir negyvybingas stabilizuotas ląsteles tame pačiame mėgintuvėlyje (žr. paveikslėlį priede). Esant tokioms sąlygoms, įtampa, atitinkanti 7-AAD aptikimą, turi būti sureguliuota taip, kad gyvybingi įvykiai (t. y. visas šviežias kraujas) būtų rodomi pirmajame ŠS histogramos dešimtmetyje, priklausomai nuo 7-AAD (žr. pavyzdį priede).
- Per procedūrą nenaudokite reagentų, kuriuose yra pralaidžių ar fiksuojančių medžiagų, kad išvengtumėte artefaktiškai teigiamo dažymo.

PROCEDŪRA

1. Į kiekvieną tiriamąjį mėgintuvėlį įpilkite po 20 µl 7-AAD gyvybingumo dažiklio tirpalo.
2. Įpilkite 100 µl tiriamojo mėginio (t. y. maždaug 5×10^6 ląstelių ekvivalentą). Mėgintuvėlius atsargiai išmaišykite sūkuriniu būdu.
3. 15–20 min. inkubuokite kambario temperatūroje (18–25 °C), saugodami nuo šviesos.
4. Tada, jeigu reikia, atlikite raudonųjų kraujo ląstelių lizavimą, vadovaudamiesi naudojamo lizavimo reagento rekomendacijomis.

Pavyzdžiui, jei norima naudoti „IOtest 3“ lizavimo tirpalą (nuor. A07799), įpilkite 2 ml darbinio tirpalo (1X), nedelsdami išmaišykite ir 10 minučių inkubuokite kambario temperatūroje, saugodami nuo šviesos.

Jeigu mėginyje nėra eritrocitų, nevykdykite lizavimo etapo, bet įpilkite nuo 0,5 iki 1 ml PBS.

5. Preparatai turi būti išanalizuoti per 1 val.

Pastaba. Visais atvejais preparatus laikykite 2–8 °C temperatūroje ir saugodami nuo šviesos.

VEIKIMAS

SPECIFIŠKUMAS

Aktinomicinai yra aktyvios biologinės chromoforo (2-amino-4,6dimetilfenoksazono-3) ir ciklinių pentapeptidų sudedamosios dalys (3). Jie yra bakterinės kilmės antibiotikai, istoriškai būdingi aukšliagybūnų dirvožemiui. Aktinomicinai sudaro stabilius kompleksus su dvigrande deoksiribonukleino rūgštimi (DNR), tačiau jų nesudaro su dvigrande ribonukleino rūgštimi (RNR), RNR-DNR hibridais ir viengrande DNR ar RNR.

Dėl 7-AAD spektrinių savybių jis yra junginys, kuris ypač gerai tinka srauto citometrijos analizei (3). Didžiausia 7-AAD / DNR komplekso absorbcija suderinama su 488 nm ilgio mėlyna sužadavimo banga, kai citometrai yra su argono lazeriu (4). 7-AAD / DNR komplekso gilioje raudonoje juostoje (nuo 635 iki 675 nm) išsiskirianti didžiausia fluorescencijos spinduliuotė leidžia optimaliai naudoti šį zondą, kai jis derinamas su fluoresceino izotiocianatu konjuguotais antikūnais (FITC) ir R fikoeritrinu (PE) (3). Iš tiesų, priešingai nei propidiumo jodidas (PI), kuris yra kitas fluorescencinis zondas, naudojamas kaip DNR žymuo, 7-AAD / DNR kompleksas turi sumažintą spinduliuotės spektrą, sutampantį su FITC ir PE.

GLAUDUMAS

Procentinės teigiamosios vertės nustatytos naudojant teigiamomis ląstelėmis papildytą visą kraują. Kiekvienas mėginys buvo analizuojamas 4 kartus: 1 dieną po du kartus, naudojant 2 prietaisus ir 2 7-AAD gyvybingumo dažiklio reagento partijas. Matavimai (% teigiamų) buvo atlikti srauto citometru „Navios“. Analizė atlikta pagal CLSI metodą EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods“ (CLSI metodą EP5-A2 „Kiekybinių matavimo metodų glaudumo veikimo vertinimas“).

Mūsų priėmimo kriterijai priklauso nuo kiekvienoje populiacijoje nustatyto teigiamų įvykių skaičiaus:

- jeigu teigiamų įvykių < 1 500, VK < 15 %
- Jeigu teigiamų įvykių > 1 500, VK < 10 %

„IOTest 3“ lizavimo tirpalas:

Visas kraujas, papildytas HPBALL ląstelių linija							
Teigiamų įvykių skaičius (vidurkis) = 5539							
	Skirtingų operatorių	Skirtingų citometrų	Tos pačios partijos	Skirtingų partijų	Skirtingų analizių	Tos pačios analizės	Iš viso
VK (%)	1,48	1,55	4,44	1,41	2,87	3,05	4,91
REZULTATAI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Lizavimo sistema „VersaLyse“:

Visas kraujas, papildytas HPBALL ląstelių linija							
Teigiamų įvykių skaičius (vidurkis) = 4034							
	Skirtingų operatorių	Skirtingų citometrų	Tos pačios partijos	Skirtingų partijų	Skirtingų analizių	Tos pačios analizės	Iš viso
VK (%)	3,73	1,85	8,74	1,79	3,63	7,02	9,11
REZULTATAI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

TIKSLUMAS

7-AAD gyvybingumo dažiklio tikslumas vertintas palyginant rezultatus su etaloniniu reagentu kaip patvirtinamąją priemonę, citometru NAVIOS analizuojant teigiamomis ląstelėmis papildytą viso kraujo mėginių rinkinį. Tyrimo ir etaloninio reagentų paklaida nustatyta pagal tyrimo rezultatų skirtumą. Jeigu paklaida neviršija leidžiamojo paklaidų diapazono arba p reikšmė nerodo reikšmingo skirtumo (> 0,05), paciento mėginių tyrimų rezultatai, gauti naudojant abu reagentus, laikomi lygiaverčiais.

Gauti rezultatai apibendrinti toliau pateiktoje lentelėje.

„IOTest 3“ lizavimo tirpalas:

Donorų skaičius = 25				
Teigiamas taikiny	Vidurkis Δ	Δ % ląstelių kriterijai	p reikšmė	REZULTATAI
Visas kraujas, papildytas HPBALL ląstelių linija	0,31	<5	0,247	PASS

Lizavimo sistema „VersaLyse“:

Donorų skaičius = 25				
Teigiamas taikiny	Vidurkis Δ	Δ % ląstelių kriterijai	p reikšmė	REZULTATAI
Visas kraujas, papildytas HPBALL ląstelių linija	-0,34	<5	0,289	PASS

RIBOJIMAI

1. Atliekant srauto citometriją klaidingi rezultatai gali būti gauti tuo atveju, jei citometras nebuvo tiksliai sureguliuotas, fluorescencijos nuotėkiai nebuvo tinkamai kompensuoti ar regionai nebuvo kruopščiai išdėstyti.
2. Tikslūs ir atkuriami rezultatai bus gaunami tol, kol naudojamos procedūros atitiks techniniame lapelyje pateiktą informaciją ir bus atliekamos laikantis geros laboratorijos praktikos.
3. 7-AAD, šio reagento veiklioji medžiaga, buvo optimizuota taip, kad būtų gautas geriausias specifinio ir nespecifinio signalų santykis. Dėl šios priežasties atliekant kiekvieną tyrimą svarbu tiksliai laikytis nurodyto reagento ir mėginio tūrių santykio.
4. Hiperleukocitozės atveju kraują atskieskite PBS, kad gautumėte 5×10^9 leukocitų/l koncentraciją.
5. Sergant kai kuriomis ligomis, pavyzdžiui, sunkiu inkstų nepakankamumu arba hemoglobopatijomis, eritrocitai gali būti lėtai arba nevisiškai sulizuojami arba jų visai neįmanoma lizuoti. Tokiu atveju patartina prieš dažant atskirti vienbrandoles ląsteles tankio gradiento būdu (pavyzdžiui, Ficoll).

Pavyzdžiai ir nuorodos pateikti priede.

PREKIŲ ŽENKLAI

„Beckman Coulter“, stilizuotas logotipas ir kiti šiame dokumente nurodyti „Beckman Coulter“ gaminių ir prekių ženklai yra „Beckman Coulter, Inc.“ prekių ženklai arba registruotieji prekių ženklai Jungtinėse Amerikos Valstijose ir kitose šalyse.

PAPILDOMA INFORMACIJA

Pacientams / naudotojams / trečiosioms šalims Europos Sąjungoje ir šalyse, kuriose galioja identiški reguliaciniai reikalavimai (Reglamentas (ES) 2017/746 dėl in vitro diagnostikos medicinos priemonių): jeigu naudojant šią priemonę arba dėl jos naudojimo įvyko sunkus incidentas, apie jį praneškite gamintojui ir (arba) jo įgaliotajam atstovui ir savo šalies nacionalinei institucijai.

PERŽIŪRŲ ISTORIJA

PERŽIŪRA AF:	Leidimo data: 2021 m. spalio
PERŽIŪRA AW:	Leidimo data: 2022 m. balandžio mėn.
Atnaujinta pagal „Beckman Coulter“ visuotinių ženklinimo taisyklių ir IVD-R (ES)2017/746 reikalavimus.	
Pridėti skyriai	Numatytas naudotojas, Koncentracija, Glaudumas, Tikslumas, Papildoma informacija, Peržiūrų istorija
Pridėta informacija	Žr. skyrių „Principas“
Atnaujinti skyriai	Principas, įspėjimai ir atsargumo priemonės, visuotiniai suderintos sistemos (GHS) pavojingumo klasifikacija, laikymas ir stabilumas, kokybės pablogėjimo požymiai, ribojimai, priedas
Pašalinti skyriai	Metodologija, klinikinio naudojimo pavyzdžiai, numatomi rezultatai, atkuriamumas vienoje laboratorijoje, tiesiškumas
PERŽIŪRA	Leidimo data
AX	2022 m. spalio
Atnaujinti skyriai	Pridėti vertimai
PERŽIŪRA	Leidimo data
AY	
Atnaujinti skyriai	Laikymas ir stabilumas

Simbolių sutartiniai ženklai

Simbolių terminų žodynas pateikiamas interneto svetainėje beckman.com/techdocs (dokumento numeris B60062).

	Specifikáció 7-AAD Életképességi Festék
Kiszerelés	Folyadék
Térfogat	3 mL
Kalibrálás	Használatra kész
λ gerjesztés	488 nm
Emission peak	655 nm (kettősszálú DNS-sel képzett komplex)

7-AAD életképesség-festék

REF A07704 150 teszt, 3 mL, 20 μ L/teszt

In vitro diagnosztikai használatra.

RENDELTESSZERŰ HASZNÁLAT

A 7-AAD életképességi festék (Viability Dye) egy kémiai színező ágens, oldat formájában, amely áramlási citométerrel végzett mono- vagy multiparaméteres analízishez készült. A humán leukociták vizsgálatánál lehetővé teszi a nem életképes (nem viabilis) sejtek azonosítását és elkülönítését a vizsgálandó (viabilis) sejtektől.

MŰKÖDÉSI ELV

A 7-Amino-Aktinomicin D (7-AAD) a kromofor 7. pozíciójában helyettesített amincsoportot tartalmazó aktinomicinnek felel meg. A 7-AAD a DNS citozin/guanin bázisainak csúcsai közé illeszkedik be (1).

A kettős DNS-lánc festése úgy valósul meg, hogy a mintát 7-AAD életképességi festékkel inkubálják. Ezután lízis következik, amely eltávolítja a vörösvértesteket, végül a leukocitákat, amelyekre ez a lépés nem hat, áramlási citometriával analizálják.

Az apoptotikus nekrotikus és/vagy károsodott sejtek interferencia forrásai a viabilis sejtek áramlási citometriás vizsgálata során. A nem viabilis sejtek jellemzése és azonosítása azért lehetséges, mert ezek 7-AAD-vel festődnek, míg az élő sejteken, amelyek megtartják membránjuk integritását, nem tud áthatolni a 7-AAD, így azok nem festődnek (azaz 7-AAD-negatívak) (2).

Az áramlási citométer a sejtek fényszórását és fluoreszcenciáját analizálja. Ez lehetővé teszi a sejtek lokalizálását a derékszögben szórt fényt (oldalszóródás, side scatter, SS) és a 7-AAD-festődésnek megfelelő fluoreszcenciát ábrázoló hisztogramon meghatározott elektronikus ablakon belül. A citométer által mért többi paraméterből kettő kombinációját ábrázoló más hisztogramok is használatosak a kapuzási fázisban.

Az így kapuzott sejtek fluoreszcenciáját analizálva elkülöníthetők a pozitívan festődött (nem viabilis) események a nem festődött (viabilis) sejtektől. Az eredmény megadható a nem fluoreszcens események és a kapuzás során figyelembe vett összes esemény százalékos arányaként.

CÉLFELHASZNÁLÓ

Ez a termék laboratóriumi szakemberek általi használatra készült.

MINTÁK

A vénás vért steril, alvadásgátlóként EDTA sóját tartalmazó csövekbe kell gyűjteni.

A mintákat szobahőmérsékleten kell tárolni (18–25 °C) és nem szabad összerázni. A mintákat a tesztminta vétele előtt kíméletes keveréssel kell homogenizálni.

A minták elemzését a vénaszúráshoz képest 24 órán belül el kell végezni.

FIGYELMEZTETÉSEK ÉS ÓVINTÉZKEDÉSEK

1. Ne használja a reagenst a lejáratí időn túl.
2. Fagyasztani tilos.
3. Használat előtt hagyja felmelegedni szobahőmérsékletre (18-25 °C).
4. Minimalizálja a fényexpozíciót.
5. Kerülje el a reagensek mikrobiális kontaminációját, ebben az esetben hamis eredményeket kaphat.
6. Ez a használatra kész reagens 0,005% (tömeg/térfogat) 7-AAD-t és 1% (térfogat/térfogat) dimetil-szulfoxidot (DMSO) tartalmaz.

Tiszta formában a 7-AAD potenciálisan rákkeltő hatású, a DMSO pedig irritáló hatású.

Bár a készítmény rendkívül nagy hígításban tartalmazza ezt a két összetevőt, azok részben vagy egészben megtarthatják káros hatásukat. Soha ne pipettázza szájjal, és az oldat vagy a minták soha ne érintkezzenek szemmel, bőrrel vagy nyálkahártyával! Ezeket a reagenseket a használatra vonatkozó óvintézkedések betartásával használja (különösen fontos: viseljen kesztyűt, köpenyt és védőszemüveget).

7. A 7-AAD fény hatására lebomló kromofór. Használat előtt a fénytől való védelem érdekében átlátszatlan fiolában kell tárolni.

A reagenst ne tegye ki tartós fénynek az inkubációs lépések során, és különösen óvja a fénytől a megfestett mintákat.

8. Minden vérmintát potenciálisan fertőzőnek kell tekinteni, és óvatosan kell kezelni (azaz védőkesztyűt, köpenyt és szemüveget viselve).
9. A vércsőket és a kezeléshez használt, egyszer használatos anyagokat olyan ad hoc tartóedényben kell kidobni, amely égetésre szolgál.

GHS SZERINTI VESZÉLYESSÉGI BESOROLÁS

7-AAD Viability Dye

FIGYELEM

H316

P332+P313

Enyhe bőrirritációt okoz.

Bőrirritáció esetén: orvoshoz kell fordulni.

Dimetil-szulfoxid 0,5 - 1,5%



A biztonsági adatlap elérhető a következő weboldalon: beckman.com/techdocs

TÁROLÁS ÉS STABILITÁS

A 7-AAD életképességi festéket 2 és 8 °C között, fénytől védve kell tárolni az üvegcsé felnyitása előtt és után is.

A lezárt fiola eltarthatósági ideje a stabilitási vizsgálat alapján: 730 nap.

A felbontott fiola stabilitása: a reagens 60 napig stabil.

Lásd: www.beckman.com, tételspecifikus analitikai bizonylat.

A MINŐSÉGROMLÁS JELEI

A reagens fizikai megjelenésének bármilyen megváltozása megromlásra utalhat, és a reagenst nem szabad felhasználni.

További információkért, illetve sérült termék kézhezvétele esetén hívja a Beckman Coulter ügyfélszolgálatát a 800-742-2345-es számon (az Amerikai Egyesült Államokban és Kanadában), vagy lépjen kapcsolatba a Beckman Coulter területileg illetékes képviselőjével.

SZÜKSÉGES, DE A KÉSZLETTEL NEM SZÁLLÍTOTT ANYAGOK:

- Mintacsövek és a mintavételhez használt anyagok.
- 20, 100 és 500 µL-es automata pipetták és eldobható pipettahegyek.
- Műanyag hemolíziscsövek.
- Vörösvértest lízis reagens. Példa: IOTest 3 Lysing Solution (Ref. A07799).
- Puffer (PBS: 0,01M nátrium-foszfát; 0,145M nátrium-klorid; pH 7.2).
- Centrifuga.
- Automata keverő (vortex típusú).
- Áramlási citométer.

A MINTA ELŐKÉSZÍTÉSE

A leukociták koncentrációjának a mintában kevesebbnek kell lennie mint, 10^4 sejt/µL (10^{10} /L). Ha szükséges, PBS-sel hígítva csökkentse a leukocita koncentrációt 5×10^3 /µL-re (5×10^9 /L).

Az eljárás 100 µL, előhígított vagy tömény mintát használ.

Megjegyzés:

- a 7-AAD-nek megfelelő fluoreszcencia intenzitásának beállítását úgy lehet elvégezni, hogy a teljes friss vérmintát nem viabilis stabilizált sejtek jelenlétében (azonos csőben) festik meg (lásd a függelékben található ábrát). Ilyen körülmények között a 7-AAD észlelésének megfelelő feszültséget úgy kell beállítani, hogy a viabilis események (azaz teljes friss vér) az SS hisztogram első dekádjában jelenjenek meg, a 7-AAD függvényében (lásd a példát a függelékben).
- A mesterséges pozitív festés elkerülése érdekében az eljárás során ne használjon olyan reagenst, amelyek permeabilizáló vagy fixáló ágenseket tartalmaznak.

ELJÁRÁS

1. A VIZSGÁLAT MENETE Adjon 20 µL 7-AAD életképességi festékkoldatot minden tesztcsőhöz.
2. Adjon 100 µL tesztmintát (mintegy 5×10^5 sejtnél megfelelő).
- Óvatosan vortexelje a kémcsöveket.
3. Inkubálja szobahőmérsékleten (18–25 °C), fénytől védve, 15–20 percig.
4. Ezután szükség esetén lizálja a vörösvérsejteket az alkalmazott lízisreagens javaslatait követve.

Például: ha az IOTest 3 Lysing Solution (Ref. A07799) reagenst kívánja használni, adjon a mintához 2 mL munkaoldatot (1X), azonnal vortexelje és inkubálja 10 percig szobahőmérsékleten, fénytől védve.

Amennyiben a minta nem tartalmaz vörösvértesteket, ne iktassa be a lízist, hanem adjon a mintához 0,5-1 mL PBS-t.

5. A készítményeket 1 órán belül analizálni kell.

MEGJEGYZÉS: A készítményeket minden esetben 2 és 8 °C között, fénytől védve tárolja.

TELJESÍTMÉNY

SPECIFICITÁS

Az aktinomicinek aktív biológiai összetevői a kromofor (2-amino 4,6 dimetilfenoxazon-3) és ciklikus pentapeptid (3<). Ezek bakteriális eredetű antibiotikumok, amelyeket eredetileg a talajban megtalálható Ascomycetes fajban jellemeztek. Az aktinomicinek a kettős láncú dezoxiribonukleinsavval (DNS) stabil komplexet alkotnak, de ilyen komplex sem a kettős láncú ribonukleinsavval (RNS), sem az RNS-DNS hibridekkel, sem az egyszeres láncú DNS-sel vagy RNS-sel nem képződik.

A 7-AAD spektrális tulajdonságainak köszönhetően különösen jól alkalmazható vegyület az áramlási citometriában (3). A 7-AAD / DNS komplex maximális abszorpciója kompatibilis a 488 nm-es kék gerjesztés hullámhosszal az argon lézerrel felszerelt citométerek esetében (4). A 7-AAD / DNS komplex fluoreszcencia emissziós csúcsa a mélyvörös sávban (635-675 nm) azt eredményezi, hogy e festék optimálisan használható fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) vagy R-fikoeritrinnel (PE) konjugált antitestekkel együtt (3). Valóban, a propidium-jodiddal (PI) ellentétben, amely egy másik, DNS-markerként használt fluoreszcens próba, a 7-AAD / DNS komplex emissziós spektruma kevésbé átfedő a FITC és PE emissziós spektrumaival.

PRECIZITÁS

A százalékos pozitív értékeket pozitív sejtekkel kiegészített teljes vér felhasználásával határozták meg. Minden mintát 4-szer futtattak, naponta kétszer 1 napig, 2 berendezésen, a 7-AAD vitális színezék reagens 2 gyártási tételének felhasználásával. A méréseket (pozitív %) Navios áramlási citométerrel végezték. Az analízist a CLSI által közzétett EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (A kvantitatív mérési módszerek precizitási teljesítményének értékelése) módszer alapján végezték.

Az elfogadhatósági kritériumaink az egyes populációknál mért pozitív események számától függ:

- Ha a pozitív esemény < 1500, CV < 15%
- Ha a pozitív esemény > 1500, CV < 10%

IOTest 3 lizálóoldat:

Teljes vér HPBALL sejtvonallal kiegészítve							
Pozitív események száma (átlag) = 5539							
	Felhasználók közötti	Citométerek közötti	Egy gyártási tételen belüli	Eltérő gyártási tételek közötti	Futtatások közötti	Egy futtatáson belüli	Összes
CV (%)	1,48	1,55	4,44	1,41	2,87	3,05	4,91
EREDMÉNYEK	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

VersaLyse lizálórendszer:

Teljes vér HPBALL sejtvonallal kiegészítve							
Pozitív események száma (átlag) = 4034							
	Felhasználók közötti	Citométerek közötti	Egy gyártási tételen belüli	Eltérő gyártási tételek közötti	Futtatások közötti	Egy futtatáson belüli	Összes
CV (%)	3,73	1,85	8,74	1,79	3,63	7,02	9,11
EREDMÉNYEK	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

PONTOSSÁG

A 7-AAD vitális színezék pontosságának értékeléséhez összevetették egy referencia reagens és a pozitív sejtekkel preparált, NAVIOS citométeren futtatott teljesvér-minták eredményeit. A teszt- és a referenciareagens közötti torzítást a teszteredmények közötti különbségek alapján határozták meg. Ha a torzítás a megengedhető hibatarományon belül maradt, vagy ha a p-érték nem jelzett szignifikáns különbséget (> 0,05), akkor a betegminták két reagenssel kapott teszteredményeit egyenértékűnek tekintették.

Az eredményeket a következő táblázat tartalmazza:

IOTest 3 lizálóoldat:

Donorok száma = 25				
Pozitív cél	Átlag Δ	Δ % sejt kritériumok	p-érték	EREDMÉNYEK
Teljes vér HPBALL sejtvonallal kiegészítve	0,31	<5	0,247	PASS

VersaLyse lizálórendszer:

Donorok száma = 25				
Pozitív cél	Átlag Δ	Δ % sejt kritériumok	p-érték	EREDMÉNYEK
Teljes vér HPBALL sejtvonallal kiegészítve	-0,34	<5	0,289	PASS

KORLÁTOZÁSOK

1. Az áramlási citometria hamis eredményeket adhat, ha a citométert nem igazítják tökéletesen, ha nem kompenzálják megfelelően a fluoreszcenciaszivárgást és ha a régiókat nem pozicionálják elég gondosan.
2. Pontos és megismételhető eredmények születnek, amennyiben az eljárásokat a műszaki tájékoztató szerint és a helyes laboratóriumi gyakorlattal összhangban végzik el.
3. A reagens aktív összetevője, a 7-AAD, a legjobb specifikus jel / nem specifikus jel arányra van optimalizálva. Ezért fontos hogy minden teszt során betartsa a javasolt reagens térfogat / minta térfogat arányt.
4. Hiperleukocitózis esetén hígítsa PBS-el a mintát olyan mértékben, hogy kb. 5×10^9 leukocita/L sejtkoncentrációt érjen el.
5. Bizonyos betegségek, pl.: súlyos veseelégtelenség, vagy hemoglobinopátiák esetén a vörösvértestek lízise lassú, vagy nem teljes, vagy az is előfordulhat, hogy nem lehet őket lizálni. Ilyen esetekben javasolt a festés előtt sűrűséggrádiens (pl. Ficoll) segítségével izolálni az egymagvú sejteket.

A példákért és az irodalomjegyzékért lásd a Függelékét.

VÉDJEJEK

A Beckman Coulter, a stilizált logó, valamint az itt említett Beckman Coulter termék- és szolgáltatásjegyek a Beckman Coulter, Inc. védjegyei vagy bejegyzett védjegyei az Amerikai Egyesült Államokban és más országokban.

TOVÁBBI INFORMÁCIÓK

Az Európai Unióban, illetve az EU-val azonos szabályozási rendszerrel (lásd: az EU 2017/746 rendelete az in vitro diagnosztikai orvostechikai eszközökről) rendelkező országokban élő beteg/felhasználó/harmadik fél esetében: ha a jelen eszköz használata során vagy használata eredményeként súlyos váratlan esemény történik, kérjük, jelentse azt a gyártónak és/vagy hivatalos területi képviselőjének, valamint az illetékes nemzeti hatóságnak.

ÁTDOLGOZÁSOK

AF ÁTDOLGOZÁS:	Közzététel dátuma: 2021. október
AW ÁTDOLGOZÁS:	Közzététel dátuma: 2022. április
A Beckman Coulter globális címkézési szabályzatának megfelelő, valamint az IVD-R (EU) 2017/746 követelmények szerinti frissítések:	
Hozzáadott szakaszok	Célfelhasználó, Koncentráció, Precizitás, Pontosság, További információk, Átdolgozások
Új információk	Lásd a Működési elv című részt.
Frissített szakaszok	Működési elv, Figyelmeztetések és óvintézkedések, GHS szerinti veszélyességi besorolás, Tárolás és stabilitás, A minőségromlás jelei, Korlátozások, Függelék
Eltávolított szakaszok	Módszertan, Példák klinikai alkalmazásra, Várható eredmények, Laboratóriumon belüli reprodukálhatóság, Linearitás
ÁTDOLGOZÁS	Közzététel dátuma
AX	2022. október
Frissített szakaszok	Fordítások hozzáadása
ÁTDOLGOZÁS	Közzététel dátuma
AY	
Frissített szakaszok	Tárolás és stabilitás

Szimbólumok listája

A szimbólumok jegyzéke elérhető a következő weboldalon: beckman.com/techdocs (dokumentumszám: B60062)

	Specyfikacja Barwnik żywotności 7-AAD
Postać	Ciecz
Objętość	3 mL
Kalibracja	Gotowy do użycia
Wzbudzenie λ	488 nm
Maksimum emisji	655 nm (kompleks z dwuniciowym DNA)

7-AAD barwnik określający żywotność

REF A07704 150 testów; 3 mL, 20 μ L/test

Do stosowania w diagnostyce *in vitro*

PRZEZNACZENIE

Barwnik żywotności 7-AAD to chemiczny środek barwiący w roztworze, przeznaczony do jedno- i wieloparametrycznego badania metodą cytometrii przepływowej. Umożliwia identyfikację komórek nieżywotnych oraz wykluczanie ich z puli komórek (żywotnych) interesujących w przypadku badania leukocytów ludzkich.

ZASADA DZIAŁANIA

7-aminoaktynomycyna D (7-AAD) jest analogiem aktynomycyny zawierającym grupę aminową podstawioną w pozycji 7 chromoforu. 7-AAD wstawia się między wierzchołki zasad cytozyny/guaniny w DNA (1).

Barwienie podwójnej nici DNA jest prowadzone poprzez inkubację próbki z barwnikiem żywotności 7-AAD. Krwinki czerwone są następnie usuwane poprzez lizę, a leukocyty są badane metodą cytometrii przepływowej.

Komórki apoptotyczne, martwicze i/lub uszkodzone są źródłem zakłóceń w badaniu komórek żywotnych metodą cytometrii przepływowej. Komórki nieżywotne mogą być charakteryzowane i identyfikowane, gdy są barwione za pomocą 7-AAD, natomiast komórki żywe zachowujące integralność swoich błon są nieprzepuszczalne dla 7-AAD i pozostają niewybarwione (tj. dają wynik 7-AAD-ujemny) (2).

Cytometr przepływowy bada rozpraszanie światła i fluorescencję komórek. Dzięki temu możliwe jest zlokalizowanie komórek w zdefiniowanym na histogramie elektronicznym oknie, które koreluje prostopadłą dyfuzję światła („rozpraszanie boczne”, czyli SS (ang. Side Scatter)) z fluorescencją odpowiadającą barwieniu 7-AAD. Inne histogramy łączące dwa różne parametry dostępne w cytometrze są również wykorzystywane na etapie bramkowania.

Fluorescencja komórek bramkowanych w ten sposób jest badana w celu wykluczenia zdarzeń barwionych dodatkowo (nieżywotnych) z puli zdarzeń nieulegających barwieniu (żywotnych). Wyniki mogą być wyrażane jako procent zdarzeń niefluorescencyjnych w stosunku do wszystkich zdarzeń uwzględnionych w procesie bramkowania.

UŻYTKOWNIK DOCELOWY

Produkt jest przeznaczony do profesjonalnego użytku w laboratoriach.

PRÓBKİ

Krew żylną należy pobierać do sterylnych probówek zawierających antykoagulant w postaci soli EDTA.

Próbki należy przechowywać w temperaturze pokojowej (18–25°C), bez wstrząsania. Przed pobraniem próbki testowej materiał należy poddać homogenizacji przez łagodne wymieszanie.

Próbki muszą zostać zbadane w ciągu 24 godzin od pobrania krwi żyłnej przez nakłucie.

OSTRZEŻENIE I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

1. Nie używać odczynników po upływie daty ważności.
2. Nie zamrażać.
3. Przed użyciem odczekać, aż osiągnie temperaturę pokojową (18–25°C).
4. Maksymalnie ograniczyć narażenie na działanie światła.
5. Nie dopuścić do skażenia mikrobiologicznego odczynników, gdyż może to spowodować uzyskanie fałszywych wyników.
6. Ten odczynnik gotowy do użycia zawiera 0,005% (wag./obj.) 7-AAD i 1% (obj./obj.) dimetylosulfotlenku (DMSO).

7-AAD w czystej postaci może wykazywać działanie rakotwórcze, a DMSO ma działanie drażniące.

Chociaż składniki te są obecne w tym preparacie w bardzo dużym rozcieńczeniu, mogą zachowywać całość lub część swojego szkodliwego działania. Nie wolno pipetować ustami. Nie dopuszczać do kontaktu ze skórą, błonami śluzowymi i oczami. Podczas używania tych odczynników przestrzegać środków ostrożności dotyczących stosowania (szczególnie noszenia rękawiczek, fartucha i okularów ochronnych).

7. 7-AAD jest chromoforem podatnym na rozkład wskutek narażenia na działanie światła. Przed użyciem należy przechowywać w nieprzezroczystej fiolce w celu ochrony przed światłem.

Unikać ciągłego narażenia na działanie światła podczas etapów inkubacji i ograniczać narażenie próbek na działanie światła po przeprowadzeniu barwienia.

8. Wszystkie próbki krwi należy uważać za potencjalnie zakaźne i obchodzić się z nimi ostrożnie (w szczególności nosić ochronne rękawice, fartuchy i okulary).
9. Probówki przeznaczone na krew i materiały jednorazowego użytku używane podczas procedury należy usuwać do pojemników ad hoc przeznaczonych do spalania.

KLASYFIKACJA ZAGROŻEŃ WG GHS

7-AAD Viability Dye

UWAGA

H316

P332+P313

Działa umiarkowanie drażniąco na skórę.

W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry:

Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.

Dimetylosulfotlenek 0,5 - 1,5%



Karta charakterystyki jest dostępna pod adresem beckman.com/techdocs

MAGAZYNOWANIE I STABILNOŚĆ

Barwnik żywotności 7-AAD musi być przechowywany w temperaturze 2–8°C z zapewnieniem ochrony przed światłem, zarówno przed otwarciem fiolki jak i po jej otwarciu.

W oparciu o wyniki badania stabilności dopuszczalny okres przechowywania w zamkniętej fiolce ustalono na: 730 dni.

Stabilność otwartej fiolki: odczynnik zachowuje stabilność przez 60 dni.

Zobacz świadectwo analizy właściwe dla serii pod adresem www.beckman.com.

OZNAKA POGORSZENIA WŁAŚCIWOŚCI

Wszelkie zmiany w wyglądzie fizycznym odczynników mogą wskazywać na pogorszenie właściwości — odczynników takich nie należy używać.

W celu otrzymania dodatkowych informacji lub w przypadku otrzymania uszkodzonego produktu należy skontaktować się z działem obsługi klienta firmy Beckman Coulter pod numerem telefonu 800-742-2345 (USA lub Kanada) lub z miejscowym przedstawicielem firmy Beckman Coulter.

MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE Z ZESTAWEM:

- Probówki do pobierania próbek i materiały wymagane do pobierania próbek.
- Pipety automatyczne z jednorazowymi końcówkami na 20, 100 i 500 µL.
- Probówki z tworzywa sztucznego przeznaczone do hemolizy.
- Odczynnik do lizy krwinek czerwonych, na przykład: roztwór lizujący IOTest3 (nr ref. A07799).
- Bufor (sól fizjologiczna buforowana fosforanem: 0,01M fosforan sodu; 0,145M chlorek sodu; pH 7,2).
- Wirówka.
- Mieszadło automatyczne (typu wortex).
- Cytometr przepływowy.

PRZYGOTOWANIE PRÓBEK

Stężenie leukocytów w próbce nie może przekraczać 10^4 kom./µL (10^{10} /L). W razie potrzeby rozcieńczyć w PBS do uzyskania stężenia leukocytów wynoszącego 5×10^3 komórek /µL (5×10^9 /L).

W procedurze stosuje się 100 µL próbki bez względu na to, czy próbka była wstępnie rozcieńczana w próbówce, czy też nie.

Uwaga:

- Dostosowanie intensywności fluorescencji odpowiadającej 7-AAD można przeprowadzić za pomocą barwienia próbki świeżej krwi pełnej i nieżywotnych ustabilizowanych komórek w tej samej próbówce (zobacz obraz w załączniku). W tych warunkach napięcie odpowiadające wykryciu 7-AAD musi być dostosowane tak, aby zdarzenia żywotne (tj. świeża krew pełna) wystąpiły w pierwszej dekadzie histogramu rozpraszania bocznego w zależności od 7-AAD (zobacz przykład w załączniku).
- Aby zapobiegać barwieniu artefaktowo dodatniemu nie należy stosować podczas procedury odczynników zawierających środki permeabilizujące lub utrwalające.

PROCEDURA

1. Do każdej badanej próbki z próbką dodaj 20 µL roztworu barwnika żywotności 7-AAD.
2. Dodaj 100 µL próbki badanej (tj. równoważnik około 5×10^5 komórek).

Łagodnie wymieszaj próbki wytrząsarką Vortex.

3. Inkubuj przez 15–20 minut w temperaturze pokojowej (18–25°C), chroniąc przed światłem.
4. Następnie, jeśli to konieczne, przeprowadzić lizę krwinek czerwonych, postępując zgodnie z zaleceniami dotyczącymi stosowanego odczynnika do lizy.

Przykładowo jeśli ma być używany roztwór lizujący IOTest3 (nr ref. A07799), dodaj 2 mL roztworu roboczego (1X), natychmiast worteksuj i inkubuj przez 10 minut w temperaturze pokojowej, chroniąc przed światłem.

Jeśli próbka nie zawiera czerwonych krwinek, nie wykonuj etapu lizy, ale dodaj 0,5–1 mL soli fizjologicznej buforowanej fosforanem.

5. Preparaty należy zbadać w ciągu 1 godziny.

Uwaga: Niezależnie od sytuacji preparaty należy przechowywać w temperaturze 2–8°C, chroniąc je przed światłem.

WYDAJNOŚĆ

SWOISTOŚĆ

Aktynomycyny są czynnymi składnikami biologicznymi chromoforu (2-amino-4,6-dimetylofenoksazonu-3) oraz pentapeptydów cyklicznych (3). Są antybiotykami pochodzenia bakteryjnego historycznie charakteryzowanymi w workowcach glebowych. Aktynomycyny tworzą stabilne kompleksy z dwuniciowym kwasem deoksyrybonukleinowym (DNA), ale nie tworzą tego typu kompleksów z dwuniciowym kwasem rybonukleinowym (RNA), z hybrydami RNA-DNA ani z jednoniciowym DNA bądź RNA.

Dzięki swoim właściwościom widmowym 7-AAD jest związkiem szczególnie odpowiednim do badania metodą cytometrii przepływowej (3). Maksimum absorpcji kompleksu 7-AAD/DNA jest zgodne z niebieską falą wzbudzenia o długości 488 nm w przypadku cytometrów z zamocowanym laserem argonowym (4). Szczytowa emisja fluorescencji kompleksu 7-AAD/DNA w paśmie głębokiej czerwieni (635–675 nm) umożliwia optymalne zastosowanie tej sondy w połączeniu z przeciwciałami skoniugowanymi z izocyjanianem fluoresceiny (FITC) oraz z R-fikoerytryną (PE) (3). W istocie kompleks 7-AAD/DNA, w przeciwieństwie do jodku propidyny (PI) będącego inną sondą fluorescencyjną stosowaną jako marker DNA, cechuje się ograniczonym nakładaniem się widma emisji z FITC i PE.

PRECYZJA

Odsetek wartości dodatnich określono przy użyciu krwi pełnej z dodanymi komórkami dodatnimi. Każdą próbkę analizowano 4 razy, dwa razy dziennie przez 1 dzień, za pomocą 2 analizatorów, przy użyciu 2 serii odczynnika barwnika żywotności 7-AAD. Pomiar (% dodatnich) przeprowadzono na cytometrze przepływowym Navios. Badanie przeprowadzono na podstawie metody opisanej w wytycznych CLSI w dokumencie EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Ocena wydajności precyzji metody pomiarów ilościowych).

Nasze kryteria akceptacji są uzależnione od liczby zdarzeń dodatnich zmierzonych w każdej populacji:

- Jeśli zdarzenie dodatnie < 1500, WZ < 15%
- Jeśli zdarzenie dodatnie > 1500, WZ < 10%

Roztwór lizujący IOTest 3:

Krew pełna z dodaną linią komórkową HPBALL							
Liczba zdarzeń dodatnich (średnia) = 5539							
	Między operatorami	Między cytometrami	W ramach serii	Między seriami	Między oznaczeniami	W ramach analizy	Łącznie
WZ (%)	1,48	1,55	4,44	1,41	2,87	3,05	4,91
WYNIKI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

System do lizy VersaLyse:

Krew pełna z dodaną linią komórkową HPBALL							
Liczba zdarzeń dodatnich (średnia) = 4034							
	Między operatorami	Między cytometrami	W ramach serii	Między seriami	Między oznaczeniami	W ramach analizy	Łącznie
WZ (%)	3,73	1,85	8,74	1,79	3,63	7,02	9,11
WYNIKI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

DOKŁADNOŚĆ

Dokładność barwnika żywotności 7-AAD oceniano poprzez porównanie wyników uzyskanych za pomocą tego odczynnika z wynikami uzyskanymi za pomocą odczynnika referencyjnego wykorzystywanego jako wyrób predykatowy, na zestawie próbek krwi pełnej z dodanymi komórkami dodatnimi analizowanych na cytometrze NAVIOS. Odchylenie między odczynnikami testowym i referencyjnym określono na podstawie różnicy między wynikami testu. Jeżeli odchylenie leży w obrębie dopuszczalnego zakresu błędu lub wartość p wskazuje brak istotnej różnicy (> 0,05), wyniki testu próbek pacjenta dla dwóch odczynników są uznawane za równoważne.

W poniższej tabeli przedstawiono podsumowanie uzyskanych wyników:

Roztwór lizujący IOTest 3:

Liczba dawców = 25				
Dodatnie docelowe komórki	Średnia Δ	Kryteria Δ % komórki	Wartość p	WYNIKI
Krew pełna z dodaną linią komórkową HPBALL	0,31	<5	0,247	PASS

System do lizy VersaLyse:

Liczba dawców = 25				
Dodatnie docelowe komórki	Średnia Δ	Kryteria Δ % komórki	Wartość p	WYNIKI
Krew pełna z dodaną linią komórkową HPBALL	-0,34	<5	0,289	PASS

ORGANICZENIA

1. Wyniki cytometrii przepływowej mogą być zafałszowane, jeśli osiowanie cytometru nie było dokładne, przepuszczona fluorescencja nie została prawidłowo skompensowana, a regiony nie zostały starannie upożyczonowane.
2. Uzyskane wyniki będą dokładne i odtwarzalne pod warunkiem, że stosowane będą procedury zgodne z informacjami zawartymi w ulotce z danymi technicznymi oraz z dobrymi praktykami laboratoryjnymi.
3. Substancja czynna tego odczynnika, tj. 7-AAD, została zoptymalizowana tak, aby zapewniać najlepszy stosunek sygnału swoistego do nieswoistego. Dlatego ważne jest przestrzeganie stosunku objętości odczynnika do objętości próbki w każdym teście.
4. W przypadku hiperleukocytozy rozcieńczyć próbkę w PBS do uzyskania stężenia około 5×10^9 leukocytów/L.
5. W pewnych stanach chorobowych, takich jak ciężka niewydolność nerek czy hemoglobinopatie, liza czerwonych krwinek może być powolna, niepełna lub nawet niemożliwa. W takim przypadku zaleca się przed wykonaniem odczynu wyizolowanie komórek jednojądrzastych metodą gradientu gęstości (na przykład Ficoll).

Przykłady i piśmiennictwo można znaleźć w załączniku.

ZNAKI TOWAROWE

Beckman Coulter, stylizowane logo oraz wymienione w tym dokumencie znaki produktów i usług firmy Beckman Coulter są znakami towarowymi lub zastrzeżonymi znakami towarowymi firmy Beckman Coulter, Inc. w Stanach Zjednoczonych i innych krajach.

DODATKOWE INFORMACJE

Dotyczy pacjentów/użytkowników/stron trzecich w Unii Europejskiej i w krajach o identycznym systemie regulacyjnym (rozporządzenie 2017/746/UE w sprawie wyrobów medycznych do diagnostyki in vitro) — jeśli podczas lub w wyniku korzystania z tego wyrobu wystąpi poważny incydent, należy zgłosić go producentowi i/lub jego upoważnionemu przedstawicielowi oraz odpowiedniemu organowi krajowemu.

HISTORIA ZMIAN

WERSJA AF:	Data wydania: październik 2021 r.
WERSJA AW:	Data wydania: Kwiecień 2022 r.
Aktualizacje w celu zapewnienia zgodności z globalnymi zasadami oznakowania firmy Beckman Coulter i według wymogów rozporządzenia IVD-R (UE)2017/746:	
Dodano części	Przewidziany użytkownik, Stężenie, Precyzja, Dokładność, Informacje dodatkowe, Historia zmian
Dodano informacje	Zobacz punkt Zasada
Zaktualizowane części	Zasady, Ostrzeżenie i środki ostrożności, Klasyfikacja zagrożeń GHS, Przechowywanie i stabilność, Dowody pogorszenia jakości, Ograniczenia, Załącznik
Usunięte części	Metodologia, Przykłady zastosowań klinicznych, Wyniki oczekiwane, Odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna, Liniowość
WERSJA	Data wydania
AX	Październik 2022 r.
Zaktualizowane części	Dodano tłumaczenia
WERSJA	Data wydania
AY	
Zaktualizowane części	Przechowywanie i stabilność

Legenda symboli

Słowniczek symboli jest dostępny pod adresem beckman.com/techdocs (numer dokumentu B60062)

	Specifikace 7-AAD, barvivo k určení životnosti buněk
Forma	Roztok
Díl	3 ml
Kalibrace	K přímému použití
Excitace λ	488 nm
Maximum emise	655 nm (v komplexu s dvouřetězcovou DNA)

7-AAD Viability Dye

REF A07704 150 testů; 3 ml, 20 μ l/test

Pouze pro diagnostiku *in vitro*

URČENÉ POUŽITÍ

Barvivo 7-AAD pro stanovení životnosti buněk je chemické barvivo ve formě roztoku, které je určeno pro jedno- nebo víceparametrovou analýzu na průtokovém cytometru. Umožňuje identifikovat neživé buňky a oddělit je od (živých) buněk při analýze lidských leukocytů.

PRINCIP

7-aminoaktinomycin D (7-AAD) je analogem aktinomycinu, který obsahuje substituovanou aminoskupinu vpoleze 7 na chromoforu. 7-AAD se vmezuje mezi cytozinové a guaninové báze DNA (1).

Obarvení dvojitého řetězce DNA je provedeno inkubací vzorku s barvivem 7-AAD. Červené krvinky jsou poté za vzorku odstraněny lýzou a leukocyty analyzovány průtokovým cytometrem.

Apoptotické, nekrotické a/nebo poškozené buňky jsou zdrojem interference při analýze živých buněk průtokovým cytometrem. Neživé buňky mohou být charakterizovány a identifikovány po obarvení 7-AAD, zatímco živé buňky, jejichž membránová integrita je zachována a tudíž je membrána pro barvivo 7-AAD neprostupná, zůstávají neoznačeny (tedy jsou 7-AAD negativní) (2).

Průtokový cytometr analyzuje difúzi světla a fluorescenci buněk. Umožňuje lokalizaci buněk v rámci elektronického okna definovaného na histogramu, který zobrazuje korelaci ortogonální difúze světla (kolmý rozptyl nebo SS) s fluorescencí odpovídající barvení 7-AAD. Ve fázi gatování se také používají další histogramy kombinující dva různé parametry, které jsou v cytometru k dispozici.

Analýzou fluorescence takto "gatovaných" buněk jsou pozitivně označené částice (neživé) odděleny od neoznačených (živých). Výsledky jsou vyjádřeny jako procentuální zastoupení nefluoreskujících částic ve vztahu ke všem částicím vybraným při "gatování".

ZAMÝŠLENÝ UŽIVATEL

Tento produkt je určen pro profesionální laboratorní použití.

VZORKY

Vzorky žilní krve musejí být odebrány do sterilních zkumavek obsahujících sůl EDTA jako antikoagulační činidlo.

Vzorky by měly být uchovávány bez míchání při laboratorní teplotě (18–25 °C). Před odebráním vzorků z odběrové zkumavky do testových zkumavek je třeba vzorky jemně promíchat.

Vzorky je nutné analyzovat do 24 hodin od venepunkce.

VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

1. Reagencii nepoužívejte po datu expirace.
2. Nezmrazujte.
3. Před použitím ponechte vytemperovat na laboratorní teplotu (18 – 25 °C).
4. Minimalizujte expozici světlu.
5. Zabraňte mikrobiologické kontaminaci reagentů, jinak mohou být výsledky chybné.
6. Tato reagentie připravená k použití obsahuje 0,005 % (hmotnost/objem) 7-AAD a 1 % (objem/objem) dimetylsulfoxidu (DMSO).

V čisté formě je 7-AAD potenciálně karcinogenní a DMSO je iritant.

Ačkoliv jsou tyto látky v současném složení extrémně naředěné, mohou si zachovávat všechny své škodlivé účinky nebo jejich část. Nikdy nepipetujte ústy a zabraňte veškerému kontaktu s pokožkou, sliznicemi a očima. Při používání těchto reagentů dodržujte bezpečnostní opatření k použití (obzvláště: noste rukavice, plášť a ochranné brýle).

7. 7-AAD je chromofor, který při expozici světlu degraduje. Skladuje se v neprůsvitné lahvičce, aby byl před použitím chráněn před světlem.

Nevystavujte reagentii delšímu působení světla v průběhu inkubací a omezte dobu působení světla na již obarvené vzorky.

8. Všechny vzorky krve je nutno považovat za potenciálně infekční a je nutné manipulovat s nimi opatrně (zvláště: používat ochranné rukavice, pláště a brýle).
9. Zkumavky s krví a jednorázový materiál určený pro manipulaci je třeba likvidovat v kontejnerech ad hoc určených ke spálení.

KLASIFIKACE NEBEZPEČÍ PODLE GHS

7-AAD Viability Dye

VAROVÁNÍ
H316
P332+P313

Způsobuje mírné podráždění kůže.
Při podráždění kůže: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.
Dimethylsulfoxid 0,5 - 1,5 %



Bezpečnostní list je k dispozici na adrese beckman.com/techdocs

SKLADOVÁNÍ A STABILITA

Barvivo 7-AAD musí být uchováváno při 2 až 8 °C bez přístupu světla předtím i poté, co byla lahvička otevřena.

Doba použitelnosti uzavřené lahvičky podle studie stability: 730 dnů/dní.

Stabilita již jednou otevřené lahvičky: reagencie je stabilní po dobu 60 dní.

Viz certifikát o analýze specifický pro šarži na www.beckman.com.

ZNÁMKY ZHORŠENÍ KVALITY

Jakákoli změna fyzického vzhledu reagentií může znamenat jejich znehodnocení a taková reagencie by se neměla používat.

Pokud potřebujete další informace nebo jste obdrželi poškozený produkt, zavolejte na telefonní číslo zákaznické služby společnosti Beckman Coulter 800-742-2345 (USA nebo Kanada) nebo se obraťte na místního zástupce společnosti Beckman Coulter.

MATERIÁLY POTŘEBNÉ, ALE NEDODANÉ SE SOUPRAVOU:

- Zkumavky na odběr vzorků a materiál potřebný k odběru vzorků.
- Automatické pipety s výměnnými špičkami k dávkování objemů 20, 100 a 500 µl.
- Plastové zkumavky na hemolýzu.
- Činidlo k lýze červených krvinek, např. lyzační roztok IOTest 3 (ref. č. A07799).
- Tlumivý reakční roztok (PBS: 0,01 M fosforečnan sodný, 0,145 M chlorid sodný, pH 7,2).
- Odstředivka.
- Automatické míchadlo (typu vortex).
- Průtokový cytometr.

Příprava vzorků

Koncentrace leukocytů ve vzorku musí být menší než 10^4 buněk / µl (10^{10} /L). Pokud je třeba, nařed'te vzorek PBS na koncentraci leukocytů 5×10^3 buněk / µl (5×10^9 /L).

Postup používá 100 µl vzorku, předředěného ve zkumavce nebo připraveného jinak.

Upozornění:

- Pomocí stanovení vzorku plné krve a neživých stabilizovaných buněk v jedné zkumavce (viz obrázek v dodatku) je možné provést přizpůsobení intenzity fluorescence odpovídající 7-AAD. Za těchto okolností je třeba upravit napětí odpovídající detekci 7-AAD tak, aby se živé buňky (tedy buňky čerstvého vzorku krve) objevily na SS histogramu v první dekádě stupnice (viz příklad v dodatku).
- Nepoužívejte žádné reagencie obsahující látky, které navozují permeabilizaci membrány nebo fixační činidla, aby nedošlo k falešně pozitivnímu značení.

POSTUP

1. Do každé testové zkumavky přidejte 20 µl roztoku 7-AAD.
2. Přidejte 100 µl testovaného vzorku (nebo množství odpovídající 5×10^5 buněk).
Zkumavky jemně promíchejte na vortexu.
3. Inkubujte 15 až 20 minut při laboratorní teplotě (18 – 25 °C) bez přístupu světla.

- Poté v případě potřeby proveďte lyzu červených krvinek podle doporučení pro použitou lyzační reagensii.

Např. při použití roztoku IOTest 3 (ref. č. A07799) přidejte 2 ml roztoku naředěného na pracovní koncentraci (1x), vzorky ihned promíchejte na vortexu a inkubujte 10 minut při laboratorní teplotě bez přístupu světla.

Jestliže vzorek neobsahuje erytrocyty, neprovádějte lyzační krok a přidejte 0,5 nebo 1 ml PBS.

- Připravené vzorky musí být analyzovány do jedné hodiny.

Pozn.: Zpracované vzorky vždy uchovávejte při teplotě 2 až 8 °C bez přístupu světla.

FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY

SPECIFICITA

Aktinomyciny jsou aktivní biologické složky chromoforu (2-amino-4,6-dimetylfenoxazonu-3) a cyklických pentapeptidů (3). Jsou to antibiotika bakteriálního původu, která byla v minulosti objevena u půdních askomycet. Aktinomyciny tvoří sdvojitým řetězcem deoxyribonukleové kyseliny (DNA) stabilní komplexy, které nevznikají ani sdvojitěřetězcovou RNA, shybridní RNA-DNA, ani sjednotěřetězcovou DNA nebo RNA.

Spektrální vlastnosti 7-AAD zněj činí mimořádně vhodnou látku pro analýzu průtokovým cytometrem (3). Maximální absorpce komplexu 7-AAD/DNA odpovídá u cytometrů vybavených argonovým laserem excitačním vlnovým délkám 488 nm v modré části spektra (4). Maximální emise fluorescence komplexu 7-AAD/DNA vtmavočervené oblasti (635 až 675 nm) umožňuje optimální použití této sondy v kombinaci sproti látkami konjugovanými sfluorescein isothiokyanátem (FITC) a R-phycoerythrinem (PE) (3). Vkontrastu spropidium jodidem (PI), který je další fluorescenční sondou používanou ke stanovení DNA, má komplex 7-AAD/DNA menší překryv emisního spektra sFITC a PE.

PRECIZNOST

Procentuální pozitivní hodnoty byly stanoveny pomocí plné krve obohacené pozitivními buňkami. Každý vzorek byl analyzován 4krát, dvakrát denně v průběhu 1 dne na 2 přístrojích pomocí 2 šarží reagensií barviva pro rozlišení živých/mrtvých buněk 7-AAD. Měření (% pozitivních) byla provedena na průtokovém cytometru Navios. Analýza byla provedena na základě metody CLSI EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Vyhodnocení výkonu preciznosti kvantitativních měřicích metod).

Naše kritéria přijatelnosti závisí na počtu pozitivních událostí změřených pro každou populaci:

- Pokud pozitivní událost < 1 500, VK < 15 %
- Pokud pozitivní událost > 1 500, VK < 10 %

Lyzační roztok IOTest 3:

Plná krev obohacená buněčnou linií HPBALL							
Počet pozitivních událostí (průměr) = 5539							
	Mezi obslužnými pracovníky	Mezi cytometry	V rámci šarže	Mezi šaržemi	Mezi cykly	V rámci cyklu	Celkem
VK (%)	1,48	1,55	4,44	1,41	2,87	3,05	4,91
VÝSLEDKY	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Lyzační systém VersaLyse:

Plná krev obohacená buněčnou linií HPBALL							
Počet pozitivních událostí (průměr) = 4034							
	Mezi obslužnými pracovníky	Mezi cytometry	V rámci šarže	Mezi šaržemi	Mezi cykly	V rámci cyklu	Celkem
VK (%)	3,73	1,85	8,74	1,79	3,63	7,02	9,11
VÝSLEDKY	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

PŘESNOST

Přesnost barviva pro rozlišení živých/mrtvých buněk 7-AAD byla vyhodnocena porovnáním výsledků s referenční reagensií sloužící jako srovnávací látka na sadě vzorků plné krve obohacené pozitivními buňkami a analyzované na cytometru NAVIOS. Odchylka mezi testovací a referenční reagensií byla stanovena podle rozdílu mezi výsledky testů. Je-li odchylka v rozmezí dovolené chyby nebo pokud hodnota p nevykazuje žádný významný rozdíl (> 0,05), považují se výsledky testů vzorků pacienta získané danými dvěma reagensiemi za ekvivalentní.

Získané výsledky jsou shrnuty v následující tabulce:

Lyzační roztok IOTest 3:

Počet dárců = 25				
Pozitivní nosič	Průměr Δ	Kritéria Δ % buněk	Hodnota p	VÝSLEDKY
Plná krev obohacená buněčnou linií HPBALL	0,31	<5	0,247	PASS

Lyzační systém VersaLyse:

Počet dárců = 25				
Pozitivní nosič	Průměr Δ	Kritéria Δ % buněk	Hodnota p	VÝSLEDKY
Plná krev obohacená buněčnou linií HPBALL	-0,34	<5	0,289	PASS

OMEZENÍ

1. Průtoková cytometrie může přinést falešné výsledky, pokud cytometr nebyl dokonale seřízen, pokud nebyly správně kompenzovány úniky fluorescence a pokud oblasti nebyly pečlivě umístěny.
2. Přesných a reprodukovatelných výsledků bude dosaženo, pokud jsou použité postupy v souladu s technickým příbalovým letákem a se správnou laboratorní praxí.
3. 7-AAD, aktivní látka obsažená v této reagentii, byla optimalizována tak, aby poskytovala co nejlepší poměr specifického signálu k nespecifickému. Z tohoto důvodu je důležité v každém testu dodržovat objemy reagentií a doporučený počet buněk.
4. V případě hyperleukocytózy naředte vzorek PBS tak, aby výsledná hodnota koncentrace byla 5×10^9 leukocytů / L.
5. Za určitých patologických stavů, jako je např. těžké selhání ledvin nebo hemoglobinopatie, může lýza červených krvinek probíhat pomalu, nekompletně nebo ji dokonce vůbec nelze provést. V těchto případech je doporučeno izolovat před stanovením mononukleární buňky na hustotním gradientu (např. Ficoll).

Příklady a reference jsou uvedeny v příloze.

OCHRANNÉ ZNÁMKY

Beckman Coulter, stylizované logo a známky produktů a služeb společnosti Beckman Coulter uvedené v tomto dokumentu jsou ochranné známky nebo registrované ochranné známky společnosti Beckman Coulter, Inc. ve Spojených státech amerických a dalších zemích.

DALŠÍ INFORMACE

Pro pacienty, uživatele nebo třetí osoby v Evropské unii a v zemích se stejným regulačním režimem (nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2017/746 o diagnostických zdravotnických prostředcích in vitro); pokud při používání tohoto prostředku nebo v důsledku jeho používání dojde k závažné nehodě, prosím ohlaste tuto nehodu výrobci a/nebo jeho oprávněnému zástupci a kompetentnímu vnitrostátnímu orgánu.

HISTORIE REVIZÍ

REVIZE AF:	Datum vydání: Říjen 2021
REVIZE AW:	Datum vydání: Duben 2022
Aktualizace kvůli shodě s globálními zásadami označování společnosti Beckman Coulter a dle požadavků IVD-R (EU) 2017/746:	
Přidání částí	Určený uživatel, Koncentrace, Preciznost, Přesnost, Další informace, Historie revizí
Přidány informace	Viz část Princip
Aktualizované části	Princip, Varování a opatření, Klasifikace nebezpečí podle GHS, Skladování a stabilita, Znamky znehodnocení, Omezení, Příloha
Odstranění částí	Metodologie, Příklady klinických aplikací, Očekávané výsledky, Reprodukovatelnost v rámci laboratoře, Linearita
REVIZE	Datum vydání
AX	Říjen 2022
Aktualizované části	Přidání překladů
REVIZE	Datum vydání
AY	
Aktualizované části	Skladování a stabilita

Klíč k symbolům

Slovníček symbolů je k dispozici na adrese beckman.com/techdocs (číslo dokumentu B60062)

	Špecifikácia 7-AAD, farbivo na určenie životnosti buniek
Forma	Roztok
Objem	3 ml
Kalibrácia	Na priame použitie
Excitácia λ	488 nm
Maximum emisie	655 nm (v komplexe s dvojreťazovou DNA)

7-AAD farba na určenie životaschopnosti buniek (Viability Dye)

REF A07704 150 testov; 3 ml, 20 µl/test

Na diagnostické použitie *in vitro*

URČENÉ POUŽITIE

Farbivo 7-AAD na stanovenie životnosti buniek je chemické farbivo vo forme roztoku, ktoré je určené na jedno- alebo viacparametrovú analýzu na prietokovom cytometri. Umožňuje identifikovať neživé bunky a oddeliť ich od (živých) buniek pri analýze ľudských leukocytov.

PRINCÍP

7-aminoaktinomycin D (7-AAD) je analógom aktinomycinu, ktorý obsahuje substituovanú aminoskupinu v polohe 7 na chromofore. 7-AAD sa vtesnáva medzi cytozinové a guaninové bázy DNA (1).

Zafarbenie dvojitého reťazca DNA je vykonané inkubáciou vzorky s farbivom 7-AAD. Červené krvinky sú potom zo vzorky odstránené lýzou a leukocyty analyzované prietokovým cytometrom.

Apoptotické, nekrotické a/alebo poškodené bunky sú zdrojom interferencie pri analýze živých buniek prietokovým cytometrom. Neživé bunky môžu byť charakterizované a identifikované po zafarbení 7-AAD, zatiaľ čo živé bunky, ktorých membránová integrita je zachovaná a teda je membrána pre farbivo 7-AAD neprepustná, zostávajú neoznačené (teda sú 7-AAD negatívne) (2).

Prietokový cytometer analyzuje rozptyl svetla a fluorescenciu buniek. Umožňuje lokalizáciu buniek v rámci elektronického okna definovaného v histograme, ktorý zobrazuje koreláciu ortogonálneho rozptylu svetla (bočný rozptyl alebo SS) s fluorescenciou zodpovedajúcou farbeniu pomocou 7-AAD. V gatingovej fáze sa používajú aj iné histogramy obsahujúce kombináciu dvoch rozličných parametrov dostupných na cytometri.

Analýzou fluorescencie takto "gatovaných" buniek sú pozitívne označené častice (neživé) oddelené od neoznačených (živých). Výsledky sú vyjadrené ako percentuálne zastúpenie nefluoreskujúcich častíc vo vzťahu ku všetkým časticiam vybraným pri "gatovaní".

URČENÝ POUŽÍVATEĽ

Tento produkt je určený na profesionálne laboratórne použitie.

VZORKY

Vzorky žilovej krvi musia byť odobraté do sterilných skúmaviek, ktoré obsahujú soľ EDTA ako antikoagulačné činidlo.

Vzorky by mali byť uchovávané bez miešania pri laboratórnej teplote (18 – 25 °C). Pred odberom vzoriek z odberovej skúmavky do testovacích skúmaviek je treba vzorky jemne premiešať.

Vzorky sa musia analyzovať do 24 hodín od odberu.

VÝSTRAHA A OPATRENIA

1. Činidlo nepoužívajte po dátume expirácie.
2. Nezamrazujte.
3. Pred použitím ponechajte vytemperovať na laboratórnu teplotu (18 - 25 °C).
4. Minimalizujte vystavenie svetlu.
5. Zabráňte mikrobiálnej kontaminácii činidiel, inak môže dôjsť k falošným výsledkom.
6. Toto činidlo pripravené na použitie obsahuje 0,005 % (hmotnosť/objem) 7-AAD a 1 % (objem/objem) dimetylsulfoxidu (DMSO).

V čistej forme je 7-AAD potenciálne karcinogénny a DMSO je dráždivá látka.

Hoci sú tieto zložky v súčasnej formulácii extrémne zriedené, môžu si uchovať všetky alebo časť svojich škodlivých účinkov. Nikdy nepipetujte ústami a predchádzajte akémukoľvek kontaktu s pokožkou, sliznicami a očami. Pri týchto činidlách dodržiavajte preventívne opatrenia (najmä: používajte rukavice, plášť a ochranné okuliare).

7. 7-AAD je chromofor, ktorý podlieha degradácii pôsobením svetla. Pred použitím sa uchováva v nepriehľadnej fľaštičke na ochranu pred svetlom.

Reagencia je tak chránená počas skladovania. Nevystavujte reagentiu dlhšiemu pôsobeniu svetla v priebehu inkubácie a obmedzte dobu pôsobenia svetla na už zafarbené vzorky.

8. Všetky vzorky krvi sa musia považovať za potenciálne infekčné, a preto sa s nimi musí nárábať opatrne (predovšetkým: používajte ochranné rukavice, plášte a okuliare).
9. Skúmavky na krv a jednorazový materiál používané pri manipulácii sa musia zlikvidovať do schválených nádob určených na spálenie.

KLASIFIKÁCIA RIZÍK PODĽA GHS

7-AAD Viability Dye

POZOR

H316

P332+P313

Mierne dráždi kožu.

Ak sa objaví podráždenie pokožky, vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť.

Dimetyl sulfoxid 0,5 - 1,5 %



Bezpečnostný list je dostupný na adrese beckman.com/techdocs

SKLADOVANIE A STABILITA

Farbivo 7-AAD musí byť uchovávané pri 2 až 8 °C bez prístupu svetla predtým i potom, čo bola fľaštička otvorená.

Doba použiteľnosti uzavretej fľaštičky podľa štúdie stability: 730 dní.

Stabilita otvorenej fľaštičky: činidlo je stabilné 60 dní.

Pozrite si certifikát analýzy pre konkrétnu šaržu na adrese www.beckman.com.

ZNÁMKY ZNEHODNOTENIA

Akákoľvek zmena fyzického vzhľadu činidla môže svedčiť o zhoršení kvality a takéto činidlo by sa nemalo používať.

Ak potrebujete ďalšie informácie alebo ak je výrobok poškodený, kontaktujte stredisko zákazníckych služieb spoločnosti Beckman Coulter na telefónnom čísle 800-742-2345 (ak sa nachádzate v USA alebo Kanade) alebo kontaktujte miestneho zástupcu spoločnosti Beckman Coulter.

POTREBNÝ MATERIÁL, KTORÝ NIE JE SÚČASŤOU SÚPRAVY:

- Vzorkovacie skúmavky a materiál potrebný na vzorkovanie.
- Automatické pipety s výmennými špičkami na dávkovanie objemov 20, 100 a 500 µl.
- Plastové hemolytické skúmavky.
- Činidlo na lýzu červených krviniek, napr. lyzačný roztok IOTest 3 (ref. č. A07799).
- Tlmivý reakčný roztok (PBS: 0,01 M fosforečnan sodný, 0,145 M chlorid sodný, pH 7,2).
- Centrifúga.
- Automatické miešadlo (typ Vortex).
- Prietokový cytometer.

PRÍPRAVA VZORIEK

Koncentrácia leukocytov vo vzorke musí byť menšia než 10^4 buniek / µl (10^{10} /L). Ak je to potrebné, nariedte vzorku pomocou PBS na koncentráciu leukocytov 5×10^3 buniek / µl (5×10^9 /L).

Pri tomto postupe sa použije 100 µl vzorky, predriedenej v skúmavke alebo neriedenej.

Upozornenie:

- Pomocou stanovenia vzorky plnej krvi a neživých stabilizovaných buniek v jednej skúmavke (viď obrázok v dodatku) je možné vykonať prispôbenie intenzity fluorescencie zodpovedajúcej 7-AAD. Pri týchto okolnostiach je potrebné upraviť napätie zodpovedajúce detekcii 7-AAD tak, aby sa živé bunky (teda bunky čerstvej vzorky krvi) objavili na SS histograme v prvej dekáde stupnice (viď príklad v dodatku).
- Nepoužívajte žiadne reagentie obsahujúce látky, ktoré navodzujú permeabilizáciu membrány alebo fixačné činidlá, aby nedošlo k falošne pozitívnemu značeniu.

POSTUP

1. Do každej testovacej skúmavky pridajte 20 µl roztoku 7-AAD.
2. Pridajte 100 µl testovanej vzorky (alebo množstvo zodpovedajúce 5×10^5 buniek).
Skúmavky jemne premiešajte na vortexe.
3. Inkubujte 15 až 20 minút pri laboratórnej teplote (18 – 25 °C) bez prístupu svetla.

- Potom podľa potreby vykonajte lýzu červených krviniek podľa odporúčaní pre použité lyzačné činidlo.

Napr. pri použití roztoku IOTest 3 (ref. č. A07799) pridajte 2 ml roztoku nariedeného na pracovnú koncentráciu (1x), vzorky ihneď premiešajte na vortexe a inkubujte 10minút pri laboratórnej teplote bez prístupu svetla.

Ak vzorka neobsahuje erytrocyty, nevykonávajte lyzačný krok a pridajte 0,5 alebo 1 ml PBS.

- Pripravené vzorky musia byť analyzované do jednej hodiny.

POZN.: Spracované vzorky vždy uchovávajúte pri teplote 2 až 8 °C bez prístupu svetla.

VÝKONNOSŤ

ŠPECIFICITA

Aktinomyciny sú aktívne biologické zložky chromoforu (2-amino-4,6-dimetylfenoxazonu-3) a cyklických pentapeptidov (3). Sú to antibiotiká bakteriálneho pôvodu, ktorá bola v minulosti objavená u pôdných askomycet. Aktinomyciny tvoria s dvojitém reťazcom deoxyribonukleové kyseliny (DNA) stabilné komplexy, ktoré nevznikajú ani s dvojreťazcovou RNA, s hybridnou RNA-DNA, ani s jednoreťazcovou DNA alebo RNA.

Spektrálne vlastnosti 7-AAD z nich robia mimoriadne vhodnú látku pre analýzu prietokovým cytometrom (3). Maximálna Absorpcia komplexu 7-AAD/DNA zodpovedá pri cytometroch vybavených argónovým laserom excitačným vlnovým dĺžkam 488 nm v modrej časti spektra (4). Maximálna emisia fluorescence komplexu 7-AAD/DNA v tmavočervenej oblasti (635 až 675 nm) umožňuje optimálne použitie tejto sondy v kombinácii s protilátkami konjugovanými s fluorescein isothiokyanátom (FITC) a R-phycoerythrinom (PE) (3). V kontraste s propidium jodidom (PI), ktorý je ďalšou fluorescenčnou sondou používanou na stanovenie DNA, má komplex 7-AAD/DNA menší prekryv emisného spektra s FITC a PE.

PRESNOSŤ

Percentuálne pozitívne hodnoty sa stanovili na plnej krvi s prídavkom pozitívnych buniek. Každá vzorka sa spracovala 4-krát, dva razy denne počas 1 dňa na 2 prístrojoch pomocou 2 šarží činidla so 7-AAD na viabilné farbenie. Merania (% pozitívnych) sa vykonávali na prietokovom cytometri Navios. Analýza sa vykonávala podľa metódy CLSI EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Hodnotenie zhodnosti pri metódach kvantitatívneho merania).

Naše kritériá prijateľnosti závisia od počtu pozitívnych udalostí nameraného v jednotlivých populáciách:

- Ak je pozitívnych udalostí < 1500, CV < 15 %
- Ak je pozitívnych udalostí > 1500, CV < 10 %

Lyzačný roztok IOTest 3:

Plná krv s prídanou bunkovou líniou HPBALL							
Počet pozitívnych udalostí (priemer) = 5539							
	Medzi operátormi	Medzi cytometrami	V rámci jednej šarže	Medzi šaržami	Medzi analýzami	V rámci jednej analýzy	Celkovo
CV (%)	1,48	1,55	4,44	1,41	2,87	3,05	4,91
VÝSLEDKY	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Lyzačný systém Versalyse:

Plná krv s prídanou bunkovou líniou HPBALL							
Počet pozitívnych udalostí (priemer) = 4034							
	Medzi operátormi	Medzi cytometrami	V rámci jednej šarže	Medzi šaržami	Medzi analýzami	V rámci jednej analýzy	Celkovo
CV (%)	3,73	1,85	8,74	1,79	3,63	7,02	9,11
VÝSLEDKY	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

PRESNOSŤ

Presnosť činidla so 7-AAD na viabilné farbenie sa vyhodnotila porovnaním výsledkov s porovnávacím referenčným činidlom na súbore vzoriek plnej krvi s prídavkom pozitívnych buniek spracovaných v cytometri NAVIOS. Odchýlka medzi testovaným a referenčným činidlom sa stanovila na základe rozdielu medzi výsledkami testovania. Ak je odchýlka v medziach prípustného chybového rozsahu, alebo ak p-hodnota svedčí o nevýznamnom rozdieli (> 0,05), výsledky testovania patientskych vzoriek pomocou daných dvoch činidiel sa považujú za rovnocenné.

Získané výsledky sú zhrnuté v nasledujúcej tabuľke:

Lyzačný roztok IOTest 3:

Počet darcov = 25				
Pozitívny cieľ	Priemer Δ	Kritériá Δ % buniek	p-hodnota	VÝSLEDKY
Plná krv s prídanou bunkovou líniou HPBALL	0,31	<5	0,247	PASS

Lyzačný systém Versalyse:

Počet darcov = 25				
Pozitívny cieľ	Priemer Δ	Kritériá Δ % buniek	p-hodnota	VÝSLEDKY
Plná krv s pridanou bunkovou líniou HPBALL	-0,34	<5	0,289	PASS

OBMEDZENIA

1. Prietoková cytometria môže vytvárať falošné výsledky, ak cytometer nie je správne zarovnaný, ak úniky fluorescencie nie sú správne kompenzované, alebo ak nie sú oblasti správne umiestnené.
2. Presné a reprodukovateľné výsledky sa získajú len vtedy, ak sa použijú postupy v súlade s technickými údajmi v príbalovom letáku a v súlade s osvedčenou laboratórnou praxou.
3. 7-AAD, aktívna látka obsiahnutá v tejto reagentii, bola optimalizovaná tak, aby poskytovala čo najlepší pomer špecifického signálu k nešpecifickému. Z tohto dôvodu je dôležité v každom teste dodržiavať objemy reagentii a odporúčaný počet buniek.
4. V prípade hyperleukocytózy nariedte vzorku pomocou PBS tak, aby výsledná hodnota koncentrácie bola 5×10^9 leukocytov/L.
5. Pri určitých patologických stavoch, ako je napr. ťažké zlyhanie obličiek alebo hemoglobínopatia, môže lýza červených krviniek prebiehať pomaly, nekompletné alebo ju dokonca vôbec nie je možné vykonať. V týchto prípadoch je odporúčané izolovať pred stanovením mononukleárne bunky na hustotnom gradiente (napr. Ficoll).

Príklady a referencie nájdete v Dodatku.

OCHRANNÉ ZNÁMKY

Beckman Coulter, štylizované logo a známky produktov a služieb spoločnosti Beckman Coulter spomenuté v tomto dokumente sú ochranné známky alebo registrované ochranné známky spoločnosti Beckman Coulter, Inc. v USA a ďalších krajinách.

DOPLŇUJÚCE INFORMÁCIE

Pre pacienta/používateľa/tretiu stranu v Európskej únii a v krajinách s identickým regulačným režimom (Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (EÚ) 2017/746 o diagnostických zdravotníckych pomôckach in vitro): ak sa počas používania tejto pomôcky alebo v dôsledku jej používania vyskytne vážna nehoda, nahláste ju výrobcovi a/alebo jeho autorizovanému zástupcovi a vášmu národnému orgánu.

HISTÓRIA REVÍZIÍ

REVÍZIA AF:	Dátum vydania: Október 2021
REVÍZIA AW:	Dátum vydania: Apríl 2022
Aktualizácie kvôli súladu s dokumentom Beckman Coulter Global Labelling Policy (Globálne pravidlá označovania spoločnosti Beckman Coulter) a podľa požiadaviek nariadenia IVDR (EÚ) 2017/746:	
Pridané časti	Určený používateľ, Koncentrácia, Zhodnosť, Presnosť, Doplnujúce informácie, História revízií
Pridané informácie	Pozri časti Princíp
Aktualizované časti	Princíp, Výstraha a opatrenia, Klasifikácia nebezpečnosti podľa GHS, Skladovanie a stabilita, Známky zhoršenia kvality, Obmedzenia, Dodatok
Odstránené časti	Metodika, Príklady klinického využitia, Očakávané výsledky, Reprodukovateľnosť výsledkov v rámci laboratória, Linearita
REVÍZIA	Dátum vydania
AX	Október 2022
Aktualizované časti	Doplnené preklady
REVÍZIA	Dátum vydania
AY	
Aktualizované časti	Skladovanie a stabilita

Popis symbolov

Slovník symbolov je dostupný na adrese beckman.com/techdocs (číslo dokumentu B60062)

	규격 7-AAD 염색액
제형	액상
용량	3mL
보정	즉시 사용 가능
λ 자극	488nm
방출 피크	655nm(이중 가닥 DNA와 복합체)

7-AAD 염색액

[REF] A07704 검사 150회; 3mL, 검사당 20μL

체외 진단용

사용목적

7-AAD 염색액은 유세포 분석기를 사용하여 단일 또는 다중 파라메타 분석을 위해 설계된 용액의 화학적 착색제입니다. 이를 사용하면 인간 백혈구 분석에서 비생존 세포를 식별하고 관심 (생존) 세포로부터 제외할 수 있습니다.

원리

7-아미노-액티노마이신 D(7-AAD)는 발색단의 7번 위치에서 치환된 아민기를 포함하는 액티노마이신의 유사체입니다. 7-AAD는 DNA의 사이토신/구아닌 염기의 상단 사이에 삽입됩니다(1).

DNA 이중 가닥의 염색은 7-AAD 염색액으로 검체를 배양함으로써 수행됩니다. 그런 다음 적혈구를 용해하여 제거하고 백혈구를 유세포 분석기를 통해 분석하십시오.

세포사멸적 괴사 및/또는 손상된 세포는 유세포 분석기를 사용하여 생존 세포를 분석하는 데 있어서 방해 원인입니다. 생존 불가 세포는 7-AAD에 의해 염색될 때 특성이 규명되고 식별될 수 있는 반면 막의 완전성을 유지하는 살아있는 세포는 7-AAD에 불투과적이며 염색되지 않습니다(즉 7-AAD에 음성)(2).

유세포 분석기는 세포의 빛 확산과 형광 영역을 분석합니다. 이를 통해 히스토그램에 정의된 전자 창 내에서 세포의 위치를 파악하여 7-AAD 염색에 상응하는 형광과 빛의 직교 확산(측면 산란(SS)) 간의 상관관계를 이해할 수 있습니다. 유세포 분석기에서 이용 가능한 두 가지 파라메타를 결합한 다른 히스토그램도 게이팅 단계에서 사용됩니다.

따라서 게이트된 세포의 형광 영역을 분석하여 염색되지 않은 이벤트(실행 가능)에서 명확하게 염색된 이벤트(실행 불가)를 제외합니다. 분석 결과는 게이팅에 의해 고려된 모든 이벤트와 관련하여 비 형광 이벤트의 비율로 표현할 수 있습니다.

대상 사용자

본 제품은 실험실 전문가용입니다.

검체

정맥혈은 EDTA 염을 항응고제로 포함한 무균 튜브를 사용하여 채취해야 합니다.

검체는 실온(18~25°C)에 보관해야 하며 흔들어서는 안 됩니다. 검사 검체를 채취하기 전에 부드럽게 교반하여 검체를 균질화해야 합니다.

검체는 정맥천자 후 24시간 이내에 분석해야 합니다.

경고 및 주의 사항

1. 유효 기간이 지난 시약은 사용하지 마십시오.
2. 냉동하지 마십시오.
3. 사용 전 실온(18~25°C)에 두십시오.
4. 빛 노출을 최소화하십시오.
5. 시약이 미생물에 오염되지 않도록 하십시오. 그러지 않으면 잘못된 결과를 얻을 수 있습니다.
6. 이 완성형 시약에는 0.005 %(중량/용적)의 7-AAD와 1 %(용적/용적)의 디메틸설폭사이드(DMSO)가 함유되어 있습니다. 순수한 상태에서 7-AAD는 잠재적 발암 물질이며, DMSO는 자극성이 있습니다.
본 제형에서는 상당히 희석되었지만 성분의 유해성이 일부 또는 모두 유지될 수 있습니다. 입으로 흡입하거나 피부, 점막, 눈, 의류에 절대 닿지 않도록 주의하십시오. 이 시약을 사용상의 주의사항에 따라 사용하십시오(주의: 장갑, 가운 및 보안경 착용).
7. 7-AAD는 빛에 대한 노출을 통해 분해되는 발색단입니다. 7-AAD는 사용하기 전까지 빛으로부터 보호하기 위해 불투명한 바이알에 보관됩니다.
배양 단계에서 빛에 대한 지속적인 노출을 피하고 염색이 시작되면 검체의 빛 노출을 줄입니다.
8. 모든 혈액 검체는 잠재적으로 전염성이 있다고 간주하고 주의해서 다루어야 합니다(특히 보호용 장갑, 가운 및 보안경 착용).

9. 취급에 사용한 혈액 튜브 및 일회용 물질은 소각용 특수 용기에서 폐기해야 합니다.

GHS 유해물질 등급

7-AAD Viability Dye

경고
H316
P332+P313

피부에 자극 우려가 있음.
피부 자극이 발생한 경우: 의학적 조언/관리를 받으십시오.
디메틸 술폰 0.5 - 1.5 %



안전보건자료는 beckman.com/techdocs에서 확인할 수 있습니다

보관 및 안정성

7-AAD 염색액은 바이알의 개봉 후후에 2~8°C로 유지하면서 빛으로부터 보호해야 합니다.

안정성 시험에 따른 밀봉 바이알 유효 기간: 730일.

개봉한 바이알의 안정성: 시약은 60일 동안 안정적입니다.

www.beckman.com에서 로트별 분석증명서를 확인할 수 있습니다.

성능 저하 증거

시약 외관에 물리적 변화가 있는 경우 성능 저하를 나타내는 것일 수 있으므로 시약을 사용해서는 안 됩니다.

자세한 정보가 필요하거나 손상된 제품을 받은 경우에는 Beckman Coulter 고객 서비스에 800-742-2345(미국 또는 캐나다)로 또는 현지 Beckman Coulter 담당자에게 문의하십시오.

필요하지만 키트와 함께 제공되지 않는 품목:

- 검체 튜브와 검체 채취에 필요한 물질.
- 20, 100 및 500µL용 일회용 팁이 있는 자동 피펫.
- 플라스틱 용혈 튜브.
- 적혈구 용해 시약. 예: IOTest3 용해액(참조 A07799).
- 완충액(PBS: 0.01M 인산나트륨, 0.145M 염화나트륨, pH 7.2).
- 원심분리기.
- 자동 교반기(교반 유형).
- 유세포 분석기.

검체의 조제

검체에서 백혈구 농도는 세포 10⁴개/µL(세포 10¹⁰개/L) 미만이어야 합니다. 필요하다면 PBS에서 백혈구 농도를 세포 5x 10³개/µL (5 x 10⁹개/L)로 희석시킵니다.

이 절차에서는 튜브에서 미리 희석되었거나 다른 방식으로 처리된 100µL의 검체가 사용됩니다.

주의:

- 7-AAD에 반응하는 형광 강도의 조절은 동일한 튜브에서 신선한 전혈 검체 및 생존 불가 안정화 세포의 염색을 사용하여 수행될 수 있습니다(부록의 그림 참조). 이러한 조건에서 7-AAD 검출에 해당하는 전압은 7-AAD에 따라 실행 가능한 사건(즉 신선한 전혈)이 SS 히스토그램의 첫 십진에 나타나도록 조정해야 합니다(부록의 예 참조).
- 인위적으로 양성 염색을 방해하기 위해 절차 동안 침투제 또는 고정제가 포함된 시약은 사용하지 마십시오.

절차

1. 각 검사 튜브에 7-AAD 염색액 20µL을 첨가하십시오.
2. 100µL의 검사 검체를 추가합니다(세포 약 5 x 10⁵개).
튜브를 부드럽게 교반합니다.
3. 실온(18~25°C)에서 빛을 피해 15~20분 동안 배양하십시오.
4. 그런 다음 사용할 용해 시약 권고 사항에 따라 필요한 경우 적혈구 용해를 수행합니다.
예를 들어 IOTest3 용해액(참조 A07799)을 사용하려면 2mL의 작업액(1X)을 첨가하고 즉시 교반한 후 빛을 피해 실온에서 10분 동안 배양합니다.
검체에 적혈구가 포함되어 있지 않다면 용해 단계를 수행하지 말고 0.5~1mL의 PBS를 첨가하십시오.
5. 조제물은 1시간 이내에 분석해야 합니다.

참고: 조제물은 항상 빛을 피해 2~8°C로 유지하십시오.

성능 특이도

악티노마이신은 발색단(2-아미노-4,6디메틸페녹사존-3) 및 사이클릭 펜타펩티드의 활성 생물학적 성분입니다(3). 악티노마이신은 역사적으로 토양 자낭균류에서 특성화된 박테리아 기원의 항생제입니다. 악티노마이신은 이중 가닥 데옥시리보핵산(DNA)과는 안정적인 복합체를 형성하지만 이중 가닥 리보핵산(RNA) 또는 RNA-DNA 하이브리드 또는 단일 가닥 DNA 또는 RNA와는 이러한 유형의 복합체를 형성하지 않습니다.

7-AAD는 스펙트럼 특성으로 인해 유세포 분석기에 특히 적합한 화합물입니다(3). 7-AAD/DNA 복합체의 최대 흡수는 아르곤 레이저가 장착된 유세포 분석기의 경우 488nm의 청색 여기 파장과 호환됩니다(4). 7-AAD/DNA 복합체의 질은 적색 대역(635~675nm)에서 피크 형광 방출은 플루오레세인 아이소티오시안산염(FITC) 결합 항체 및 R 피코에리트린(PE)과 조합될 때 프로브를 최적으로 사용할 수 있도록 합니다(3). 실제로 DNA 표지로 사용되는 또 다른 형광 프로브인 프로피듐 아이오다이드(PI)와 달리 7-AAD/DNA 복합체는 FITC 및 PE와 감소한 중첩 방출 스펙트럼을 갖습니다.

정밀도

양성 비율 값은 양성 세포가 첨가된 전혈을 사용하여 측정되었습니다. 각 검체는 2개의 7-AAD 생존율 염료 시약 로트를 사용하여 2대의 장비에서 하루 동안 2회씩, 총 4회 실행되었습니다. 측정값(양성 비율)은 Navios 유세포 분석기로 도출했습니다. 분석은 CLSI 방법 EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods(EP5-A2: 정량적 측정 방법의 정밀도 성능 평가)를 기반으로 수행했습니다.

허용 기준은 각 집단에서 측정한 양성 이벤트 수에 따라 다릅니다.

- 양성 이벤트 수가 < 1,500인 경우 CV < 15 %
- 양성 이벤트 수가 > 1,500인 경우 CV < 10 %

IOTest 3 용해액:

HPBALL 세포주가 첨가된 전혈							
양성 이벤트 수(평균) = 5539							
	작업자 간	유세포 분석기 간	로트 내	로트 간	실행 간	실행 내	총계
CV(%)	1.48	1.55	4.44	1.41	2.87	3.05	4.91
결과	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

VersaLyse 용해 시스템:

HPBALL 세포주가 첨가된 전혈							
양성 이벤트 수(평균) = 4034							
	작업자 간	유세포 분석기 간	로트 내	로트 간	실행 간	실행 내	총계
CV(%)	3.73	1.85	8.74	1.79	3.63	7.02	9.11
결과	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

정확도

7-AAD 염료의 정확도는 그 결과를 Navios 유세포 분석기로 처리되었으며 양성 세포가 첨가된 전혈 검체에 공인 참조 시약을 가한 값과 비교하여 평가했습니다. 검사 시약과 참조 시약 간 바이어스는 검사 결과 간 차이를 기반으로 지정되었습니다. 바이어스가 허용 가능한 오차 범위 내에 있거나 p-값이 유의한 차이를 나타내지 않는 경우(> 0.05) 두 시약으로 처리한 환자 검체의 검사 결과는 동일한 것으로 간주됩니다.

얻은 결과는 아래 표에 요약되어 있습니다.

IOTest 3 용해액:

공여자 수 = 25				
양성 표적	평균 Δ	Δ % 세포 기준	p-값	결과
HPBALL 세포주가 첨가된 전혈	0.31	<5	0.247	PASS

VersaLyse 용해 시스템:

공여자 수 = 25				
양성 표적	평균 Δ	Δ % 세포 기준	p-값	결과
HPBALL 세포주가 첨가된 전혈	-0.34	<5	0.289	PASS

한계

1. 유세포 분석기가 완벽하게 정렬되지 않은 경우, 형광 누출이 올바르게 보정되지 않은 경우 또는 영역 위치를 신중하게 지정하지 않은 경우 유세포 분석법에서 잘못된 결과가 나올 수 있습니다.
2. 사용한 절차가 동봉된 기술 책자의 내용을 따르고 실험실 모범 사례와 호환되는 경우 정확하고 재현 가능한 결과를 얻을 수 있습니다.

- 이 시약에서 활성 물질인 7-AAD는 최상의 특이/비특이 신호비를 제공하도록 최적화되었습니다. 그러므로 모든 검사에서 시약의 용적/검체 용적 비율을 준수하는 것이 중요합니다.
- 과백혈구 증가증의 경우 혈액을 PBS에 희석하여 대략 백혈구 5×10^6 /L 값을 얻어야 합니다.
- 심한 신부전 또는 혈액소병증 같은 특정 질병 상태에서 적혈구의 용해는 느리거나 불완전하거나 심지어는 불가능할 수도 있습니다. 이러한 경우, 염색 전에 밀도 구배(예를 들면 Ficoll)를 사용하여 단핵구 세포를 분리하는 것이 좋습니다.

예시와 참고 자료는 부록을 참조하십시오.

상표

본 문서에 포함된 Beckman Coulter, 스타일 로고, Beckman Coulter 제품 및 서비스 마크는 미국 및 기타 국가에서 Beckman Coulter, Inc.의 상표이거나 등록 상표입니다.

추가 정보

유럽 연합 및 이와 동일한 규정 체제(EU 규정 2017/746, 체외 진단용 의료 기기 관련)를 사용하는 국가에 거주하는 환자/사용자/타사의 경우, 이 장치의 사용 중이나 사용으로 인해 심각한 상황이 발생했다면 제조업체 및/또는 공인 담당자와 해당 국가의 담당 기관에 신고하십시오.

개정 이력

개정판 AF:	발행 날짜: 2021년 10월
개정판 AW:	발행 날짜: 2022년 4월
Beckman Coulter 글로벌 라벨 지정 정책 및 IVD-R (EU) 2017/746 요건에 따라 업데이트했습니다.	
추가된 섹션	대상 사용자, 농도, 정밀도, 정확도, 추가 정보, 개정 이력
추가된 정보	원리 섹션 참조
업데이트된 섹션	원리, 경고 및 주의 사항, GHS 유해물질 등급, 보관 및 안정성, 성능 저하 증거, 한계, 부록
삭제된 섹션	방법론, 임상 적용 사례, 예상 결과, 실험실간 재현성, 선형성
개정	발행 날짜
AX	2022년 10월
업데이트된 섹션	번역 추가
개정	발행 날짜
AY	
업데이트된 섹션	보관 및 안정성

기호 목록

기호 용어집은 beckman.com/techdocs에서 확인할 수 있습니다(문서 번호 B60062)

	Spesifikasyonlar 7-AAD Canlılık Boyası
Formülasyon	Likid
Hacim	3 mL
Kalibrasyon	Kullanıma hazır
λ eksitasyonu	488 nm
Emisyon piki	655 nm (çift zincirli DNA ile kompleks)

7-AAD Viyabilite Boyası

REF A07704 150 test; 3 mL, 20 µL/test

In Vitro Diagnostik Kullanım içindir

KULLANIM AMACI

7-AAD Canlılık Boyası çözelti içerisinde kimyasal bir renklendirici ajandır ve akış sitometrisinin kullanıldığı tek veya çok parametrelili analiz için tasarlanmıştır. İnsan lökositlerinin analizinde, canlı olmayan hücrelerin saptanmasını ve ilgilenilen (canlı) hücrelerden ayırt edilmesini sağlar.

İLKE

7-Amino-Aktinomisin D (7-AAD) kromoforun 7. bölgesine substitüsyonla giren bir amin grubunu içeren bir Aktinomisin analogudur. 7-AAD DNA'nın Sitozin/ Guanin bazlarının üst kısımları arasına girer (1).

DNA çift zincirinin boyaması, örneğin 7-AAD Canlılık Boyası ile inkübe edilmesiyle gerçekleştirilir. Daha sonra kırmızı hücreler parçalanarak uzaklaştırılır ve lökositler akış sitometrisiyle analiz edilir.

Apoptoza (programlı hücre ölümü) uğramış, nekrotik ve/veya hasarlı hücreler, akış sitometrisinin kullanıldığı canlı hücre analizinde enterferans kaynağıdır. Canlı olmayan hücreler 7-AAD ile boyamayla tanımlanabilir ve saptanabilir; buna karşılık canlı hücreler membran bütünlüklerini korudukları için 7-AAD'ye karşı geçirgen değildir ve boyanmazlar (yani bunlar 7-AAD negatif) (?).

Akış sitometresi, ışık difüzyonunu ve hücre floresanını analiz eder. Böylelikle, ışığın ortogonal difüzyonu (Yana Saçılım veya SS) ve 7-AAD boyamaya karşılık gelen floresanla ilişkilendirilen histogram üzerinde tanımlanmış elektronik pencere içinde hücrelerin lokalizasyonu sağlanır. Sitometredeki farklı parametrelerden ikisini birleştiren diğer histogramlar da geçitleme aşamasında kullanılır.

Böylece kapılanan hücrelerdeki floresans pozitif boyanmış olayları (canlı olmayan) boyanmamış olanlardan (canlı) dışlamak üzere analiz edilir. Sonuçlar kapılama ile edinilmiş tüm olaylara göre floresansız olayların yüzdesi şeklinde ifade edilir.

HEDEF KULLANICI

Bu ürün, laboratuvarında profesyonel kullanım için tasarlanmıştır.

ÖRNEKLER

Antikoagülan olarak EDTA tuzu içeren steril tüpler kullanılarak venöz kan alınmalıdır.

Numuneler oda sıcaklığında (18–25°C) saklanmalıdır ve çalkalanmamalıdır. Numune test örneği alınmadan önce yavaşça sallanarak homojen hale getirilmelidir.

Örnekler venipunktür sonrası 24 saat içinde analiz edilmelidir.

UYARILAR VE ÖNLEMLER

1. Reaktifi son kullanma tarihinden sonra kullanmayın.
2. Dondurmayın.
3. Kullanmadan önce oda sıcaklığına (18–25°C) gelmesini bekleyin.
4. Işığa maruz kalmasını en aza indirin.
5. Reaktiflerin mikrobiyal kontaminasyonundan kaçının yoksa yanlış sonuçlar oluşabilir.
6. Kullanıma hazır bu reaktif %0,005 (ağırlık/hacim) 7-AAD ve %1 (hacim/hacim) Dimetil Sülfoksit (DMSO) içerir.

Saf haliyle, 7-AAD potansiyel olarak kanserojendir ve DMSO tahriş edicidir.

Mevcut formülasyonda aşırı yoğun olarak seyreltilmiş olmasına rağmen, bu bileşenler zararlı etkilerinin tamamını veya bir kısmını koruyabilir. Asla ağızla pipetleme yapmayın ve cilt, mukoza veya gözlerle herhangi bir şekilde temas etmesini önleyin. Bu reaktifleri, kullanım önlemlerine (özellikle eldiven, önlük ve koruyucu gözlük kullanımı) uygun şekilde kullanın.

7. 7-AAD, ışığa maruz kalarak bozunmaya uğrayan bir kromofordur. Kullanmadan önce ışıktan korumak için opak bir şişede saklanır.

İnkübasyon basamaklarında ışığa sürekli maruz kalımdan kaçının ve boyama yapıldıktan sonra örneklerin ışığa maruz kalımını azaltın.

8. Tüm kan örnekleri potansiyel olarak bulaşıcı olarak kabul edilmeli ve dikkatle ele alınmalıdır (özellikle koruyucu eldiven, önlük ve gözlük takılmalıdır).
9. Taşıma için kullanılan kan tüpleri ve tek kullanımlık malzeme, yakma amacıyla özel kaplara atılmalıdır.

GHS TEHLİKE SINIFLANDIRMASI

7-AAD Viability Dye

UYARI

H316

P332+P313

Hafif cilt tahrişine yol açar.

Ciltte tahriş söz konusu ise: Tıbbi yardım/müdahale alın.

Dimetil Sülfoksit 0,5 - %1,5



Güvenlik Veri Sayfası beckman.com/techdocs adresinde bulunabilir

SAKLAMA VE STABİLİTE

7-AAD Canlılık Boyası flakon açılmadan önce ve açıldıktan sonra 2 - 8°C'de saklanmalı ve ışıktan korunmalıdır.

Stabilite çalışması için şişe raf ömrü: 730 gün.

Açılan şişenin stabilitesi: reaktif 60 gün stabildir.

Lota özel Analiz Sertifikası için www.beckman.com adresine bakın.

BOZULMA GÖSTERGESİ

Reaktiflerin fiziksel görünümündeki herhangi bir değişiklik bozulmayı gösterebilir ve reaktif kullanılmamalıdır.

Ek bilgi almak isterseniz veya aldığınız ürün hasarlı çıktıysa, 800-742-2345 numaralı telefondan (ABD veya Kanada) Beckman Coulter Müşteri Hizmetlerini arayın veya yerel Beckman Coulter Temsilcinizle temas kurun.

GEREKLİ OLAN ANCAK KİT İLE BİRLİKTE VERİLMİYEN MALZEMELER:

- Numune alma tüpleri ve numune alma için gerekli malzemeler.
- 20, 100 ve 500µL'lik tek kullanımlık uçları olan otomatik pipetler.
- Plastik hemoliz tüpleri.
- Kırmızı hücre parçalama reaktifi. Örneğin: IOTest3 Lizis Çözültisi (Ref. A07799).
- Tampon (PBS: 0.01M sodyum fosfat; 0.145 M sodyum klorür; pH 7.2).
- Santrifüjleyin.
- Otomatik karıştırıcı (Vorteks tipi).
- Akış sitometresi.

NUMUNELERİN HAZIRLANMASI

Numunedeki lökosit konsantrasyonu 10⁴ hücre /µL (10¹⁰/L)'den az olmalıdır. Gerekirse, lökosit konsantrasyonu 5x 10³ hücre /µL (5 x 10⁹/L)'ye getirmek için PBS içinde seyreltin.

Prosedürde, önceden seyreltilmiş tüpte veya başka bir şekilde 100 µL örnek kullanılır.

NOT:

- 7-AAD'ye karşılık gelen floresanın yoğunluğunda ayarlama, aynı tüpte taze tam kan ve canlı olmayan, stabilize edilmiş hücrelerin bir numunesinin boyaması kullanılarak yapılabilir (bkz. ekteki resim). Bu koşullarda, 7-AAD'nin tayinine karşılık gelen voltaj, 7-AAD'ye bağlı olarak, canlı hücreler (taze tam kan) SS histogramın ilk dekadında görülebilecek şekilde ayarlanmalıdır (bkz. ekteki örnek).
- Artefakt tarzı pozitif boyamayı önlemek amacıyla, prosedürde geçirgenleştirici veya fikse edici ajanlar kullanmayın.

PROSEDÜR

1. Her test tübüne 20µL 7-AAD Canlılık Boyası solüsyonu ekleyin.
2. 100µL test numunesi ekleyin (yani yaklaşık 5 x 10⁵ hücre karşılığı).
Tüpleri yavaşça vorteksleyin.
3. Oda sıcaklığında (18–25°C) ışıktan koruyarak 15 - 20 dakika boyunca inkübe edin.
4. Ardından gerekirse kullanılan lizis reaktifinin önerilerini izleyerek kırmızı hücrelerin lizisini gerçekleştirin.
Örnek olarak, IOTest3 Lizis Solüsyonu (Ref. A07799) kullanmak istiyorsanız, 2mL çalışma solüsyonu ekleyin (1X), hemen vorteksleyin ve oda sıcaklığında ışıktan koruyarak 10 dakika boyunca inkübe edin.
Numune kırmızı hücreler içermiyorsa, parçalama basamağını geçin ve 0.5 - 1mL PBS ekleyin.

5. Preparatlar 1 saat içerisinde analiz edilmelidir.

Not: Her zaman preparatları ışıktan koruyarak 2 - 8°C'de saklayın.

PERFORMANS

ÖZGÜLLÜK

Aktinomisinler bir kromofor (2-Amino-4,6Dimetilfenoksazon-3) ve siklik penta-peptidlerin aktif biyolojik bileşenleridir (3). Bunlar geçmişte toprak Ascomycetes'inde karakterize edilen bakteri orijinli antibiyotiklerdir. Aktinomisinler çift zincirli deoksiribonükleik asit (DNA) ile stabil kompleksler oluşturur ancak çift sarmallı ribonükleik asit (RNA), RNA-DNA hibridleri veya tek sarmallı DNA veya RNA ile bu tip kompleks oluşturmazlar.

7-AAD'nin spektral özellikleri onu akış sitometri analizi için özellikle uygun bir bileşik haline getirir (3). 7-AAD/DNA kompleksinin maksimum Emilimi, argon lazer donanımlı sitometrelerde 488 nm'lik mavi eksitasyon dalgaboyuyla uyumludur(4). 7-AAD/DNA kompleksinin derin kırmızı bandındaki pik floresan emisyonu (635-675nm), Floresan İzotiyosiyanat konjuge antikorları (FITC) ve R Fikoeritrin (PE) ile kombine edildiğinde bu probun optimal kullanımına imkan verir (3). Gerçekte, bir DNA markeri olarak kullanılan başka bir floresan prob olan Propidyum İyodürün (PI) tersine, 7-AAD/DNA kompleksi FITC ve PE ile örtüşen emisyon spektrumunu azaltmıştır.

KESİNLİK

Yüzde pozitif değerleri, pozitif hücreler eklenen Tam Kan kullanılarak belirlenmiştir. Her örnek, 2 lot 7-AAD Canlılık Boya reaktifi kullanılarak 2 cihazda 1 gün boyunca günde iki kez olmak üzere 4 kez çalışılmıştır. Ölçümler (% pozitif) Navios akış sitometresi üzerinde yapılmıştır. Analiz, CLSI yöntemi EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Kantitatif Ölçüm Yöntemlerinin Kesinlik Performansına İlişkin Değerlendirme) temelinde yürütülmüştür.

Kabul kriterlerimiz, her popülasyon için ölçülen pozitif olay sayısına bağlıdır:

- Pozitif olay <1.500, VK <%15 ise
- Pozitif olay >1.500, VK <%10 ise

IOtest 3 Parçalama Çözümleri:

HPBALLHücre soyu eklenmiş Tam Kan							
Pozitif olay sayısı (Ortalama)=5539							
	Kullanıcılar arası	Sitometreler arası	Lot içi	Lotlar arası	Çalışmalar arası	Çalışma içi	Total
VK (%)	1,48	1,55	4,44	1,41	2,87	3,05	4,91
SONUÇLAR	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Versalyse Parçalama Sistemi:

HPBALLHücre soyu eklenmiş Tam Kan							
Pozitif olay sayısı (Ortalama)=4034							
	Kullanıcılar arası	Sitometreler arası	Lot içi	Lotlar arası	Çalışmalar arası	Çalışma içi	Total
VK (%)	3,73	1,85	8,74	1,79	3,63	7,02	9,11
SONUÇLAR	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

DOĞRULUK

NAVIO Sitometrede çalışılan pozitif hücreler eklenmiş tam kan örnekleri grubunda esas alınan referans reaktifle sonuçlar karşılaştırılarak, 7-AAD Canlılık Boyasının doğruluğu değerlendirilmiştir. Test ve referans reaktif arasındaki sapma, test sonuçları arasındaki fark temelinde belirlenmiştir. Sapma, izin verilen hata aralığı dahilindeyse veya p değeri anlamlı fark göstermediğinde (>0,05), iki reaktifte göre hasta örnekleri test sonuçlarının eşdeğer olduğu kabul edilir.

Elde edilen sonuçlar, aşağıdaki tabloda özetlenmektedir:

IOtest 3 Parçalama Çözümleri:

Donör sayısı=25				
Pozitif Hedef	Ortalama Δ	Δ % Hücre kriteri	p değeri	SONUÇLAR
HPBALLHücre soyu eklenmiş Tam Kan	0,31	<5	0,247	PASS

Versalyse Parçalama Sistemi:

Donör sayısı=25				
Pozitif Hedef	Ortalama Δ	Δ % Hücre kriteri	p değeri	SONUÇLAR
HPBALLHücre soyu eklenmiş Tam Kan	-0,34	<5	0,289	PASS

SINIRLAMALAR

1. Akış sitometrisi, sitometre mükemmel şekilde hizalanmadıysa, floresan sızıntıları doğru şekilde telafi edilmediyse ve bölgeler dikkatli bir şekilde konumlandırılmadıysa yanlış sonuçlar üretebilir.
2. Kullanılan prosedürler teknik bilgi broşürüne uygun olduğu ve iyi laboratuvar uygulamalarına uygun olduğu sürece doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilecektir.
3. Bu reaktifin etkin maddesi (7-AAD) en iyi spesifik sinyal/spesifik olmayan sinyal oranını sunacak şekilde kalibre edilmiştir. Bu nedenle, her testte reaktif hacmi/numune hacmi oranına bağlı kalınması önemlidir.
4. Hiperlökositoz durumunda, yaklaşık 5×10^9 lökosit/L'lik bir değer elde etmek için örneği PBS içinde seyreltin.
5. Ağır böbrek yetmezliği veya hemoglobinopatiler gibi belirli hastalık durumlarında, kırmızı hücrelerin parçalanması yavaş, eksik ve hatta imkansız olabilir. Bu durumda, boyamadan önce bir yoğunluk gradyanı (örneğin, Ficoll) kullanılarak mononükleer hücrelerin izole edilmesi tavsiye edilir.

Örnekler ve referanslar için Ek'e bakın.

TİCARİ MARKALAR

Bu belgede belirtilen Beckman Coulter, stilize logo ve Beckman Coulter ürün ve hizmet markaları, Beckman Coulter, Inc. firmasının ABD'de ve diğer ülkelerdeki ticari veya tescilli ticari markalarıdır.

EK BİLGİLER

Avrupa Birliği'nde ve aynı düzenleme rejiminin olduğu ülkelerdeki (In Vitro Diagnostik Tıbbi Cihazlar hakkında 2017/746/EU sayılı Yönetmelik) hasta/kullanıcı/üçüncü taraflar için; bu cihazın kullanımı sırasında veya cihazın kullanımının bir sonucu olarak ciddi bir olay meydana gelirse lütfen olayı üreticiye ve/veya yetkili temsilcisine ve ulusal yetkili makamınıza bildirin.

REVİZYON GEÇMİŞİ

REVİZYON AF:	Yayın tarihi: Ekim 2021
REVİZYON AW:	Yayın tarihi: Nisan 2022
Beckman Coulter Global Etiketleme Politikasıyla uyumluluk sağlamak için ve IVD-R (AB)2017/746 gerekliliklerine göre güncellemeler yapıldı:	
Bölümler eklendi	Hedef Kullanıcı, Konsantrasyon, Kesinlik, Doğruluk, Ek Bilgiler, Revizyon Geçmişi
Bilgi eklendi	Bkz. İlke bölümleri
Güncellenmiş bölümler	İlke, Uyarı ve Önlemler, GHS Tehlike Sınıflandırması, Saklama ve Stabilitate, Bozulma Göstergesi, Sınırlamalar, Ek
Bölümler kaldırıldı	Metodoloji, Klinik Uygulama Örnekleri, Beklenen Sonuçlar, Laboratuvar İçi Tekrar Üretilirlik, Linearite
REVİZYON	Yayın Tarihi
AX	Ekim 2022
Güncellenmiş bölümler	Çeviriler eklendi
REVİZYON	Yayın Tarihi
AY	
Güncellenmiş bölümler	Saklama ve stabilite

Sembol Anahtarı

Semboller Sözlüğü beckman.com/techdocs adresinde bulunabilir (belge numarası B60062)

	Спецификации Витального красителя 7-AAD
Форма выпуска	Жидкость
Объем	3 мл
Калибровка	Готов к употреблению
Возбуждение λ	488 нм
Пик эмиссии	655 нм (комплекс красителя с двухцепочечной ДНК)

Краситель 7-аминоактиномицин D (7-AAD) для анализа жизнеспособности клеток

REF A07704 150 тестов; 3 мл, 20 мкл/тест

Применяется для *In Vitro* диагностики.

НАЗНАЧЕНИЕ

Витальный краситель 7-AAD представляет собой раствор химического соединения, предназначенный для выполнения одно- и многопараметрического анализа методом проточной цитометрии. При анализе лейкоцитов человека данный краситель позволяет идентифицировать нежизнеспособные клетки и исключить их из интересующей популяции жизнеспособных клеток.

ПРИНЦИП РАБОТЫ

7-амино-актиномицинD (7-AAD) представляет собой аналог актиномицина, содержащий аминогруппу в 7-положении хромофора. 7-AAD встраивается в ДНК между азотистыми основаниями цитозином и гуанином (1).

При инкубации образца с красителем 7-AAD происходит окрашивание двойной спирали ДНК. Затем выполняется лизис эритроцитов, а лейкоциты анализируются на проточном цитофлуориметре.

Анализу жизнеспособных клеток методом проточной цитометрии зачастую мешают клетки, подвергшиеся апоптозу, некрозу и/или поврежденные клетки. Нежизнеспособные клетки можно идентифицировать, поскольку они окрашиваются 7-AAD, в то время как жизнеспособные клетки, у которых целостность мембраны не нарушена, непроницаемы для 7-AAD и не окрашиваются (т.е., такие клетки являются 7-AAD-негативными) (2).

Проточный цитометр анализирует светорассеяние и флуоресценцию клеток. Это дает возможность локализации клеток в электронном окне, определенном на гистограмме, что коррелирует с ортогональным светорассеянием (боковое рассеяние, или боковое светорассеяние) и флуоресценцией, соответствующей окрашиванию 7-аминоактиномицином D. Также на стадии гейтирования используются другие гистограммы, объединяющие два из различных параметров, доступных на цитометре.

Чтобы отличить положительно окрашенные (нежизнеспособные) клетки от неокрашенных (жизнеспособных), проводится анализ флуоресценции гейтированных клеток. Результат представляется в виде процентного содержания неокрашенных клеток от всех клеток выбранной популяции.

ПРЕДПОЛАГАЕМЫЙ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ

Изделие предназначено для использования в лаборатории персоналом с профессиональной подготовкой.

ПРОБЫ

При взятии образца венозной крови необходимо использовать стерильные пробирки с ЭДТА в качестве антикоагулянта.

Образцы следует хранить при комнатной температуре (18–25°C), не встряхивая. Перед забором аликвоты для исследования образец следует перемешать путем легкого встряхивания пробирки, чтобы обеспечить однородное распределение клеток по объему.

Пробы требуется проанализировать в течение 24 ч после венипункции.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реагенты после истечения срока годности.
2. Не замораживать.
3. Перед использованием реагента необходимо дождаться, пока его температура достигнет комнатной (18–25°C).
4. Минимизируют воздействие света.
5. Во избежание получения ошибочных результатов не допускайте микробной контаминации реагентов.
6. Этот готовый для использования реагент содержит 0,005% (масса/объем) 7-аминоактиномицина D и 1% (объем/объем) диметилсульфоксида (ДМСО).

В чистом виде 7-аминоактиномицин D является потенциально канцерогенным, а ДМСО является раздражающим веществом.

Хотя в представленной рецептуре эти компоненты очень сильно разведены, они могут сохранить свое вредное действие полностью или частично. Никогда не пипетируйте ртом и избегайте любого контакта проб с кожей, слизистыми и глазами. Используйте эти реагенты, соблюдая меры предосторожности при использовании (особенно важно надевать перчатки, халат и защитные очки).

7. 7-аминоактиномицин D представляет собой хромофор, деградирующий при воздействии света. Он хранится в непрозрачном флаконе для защиты от света перед использованием.

Старайтесь не допускать продолжительного воздействия света на пробы на этапах инкубации и уменьшить воздействие света на образцы после их окрашивания.

8. Все пробы крови должны считаться потенциально инфицированными, при обращении с ними необходимо соблюдать осторожность (в частности, использовать защитные перчатки, одежду и очки).
9. При утилизации пробирок и одноразовых материалов следует использовать специальные предназначенные для сжигания контейнеры.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

7-AAD Viability Dye

ОСТОРОЖНО!

H316

P332+P313

Вызывает незначительное раздражение кожи.

При раздражении кожи: обратиться к врачу.

Диметил сульфоксид 0,5 - 1,5%



Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНИЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

До и после распечатки флакона витальный краситель 7-AAD необходимо хранить при температуре от 2 до 8°C в защищенном от света месте.

Срок хранения закрытого флакона согласно исследованию стабильности: 730 день.

Стабильность в открытом флаконе: реагент сохраняет стабильность в течение 60 дн.

См. специфический для партии сертификат анализа на веб-сайте www.beckman.com.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любые изменения внешнего вида реагентов могут говорить о порче, использовать такой реагент не следует.

За дополнительной информацией или при получении поврежденной продукции обращайтесь в сервисный центр компании Beckman Coulter по телефону 800-742-2345 (в США или Канаде) или свяжитесь со своим местным представителем Beckman Coulter.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР:

- Необходимые для взятия проб пробирки и материалы.
- Автоматические пипетки с одноразовыми наконечниками объемом 20, 100 и 500мкл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реагент для лизиса эритроцитов, например IOTest3 Lysing Solution (каталожный номер. A07799).
- Буфер (PBS: 0,01M фосфата натрия; 0,145 M раствор хлорида натрия; pH 7,2).
- Центрифугируйте.
- Автоматическая мешалка (вortexная)
- Проточный цитометр.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Концентрация лейкоцитов в образце должна быть менее 10^4 клеток/мкл ($10^{10}/л$). При необходимости образец разводят ФСБ, доводя концентрацию лейкоцитов до 5×10^3 клеток/мкл ($5 \times 10^9/л$).

Для этой процедуры используется 100 мкл пробы, предварительно разбавленной в пробирке или иным способом.

ЗАМЕЧАНИЕ:

- Для настройки интенсивности флуоресценции, соответствующей 7-AAD, можно окрасить в одной и той же пробирке образец свежей цельной крови и стабилизированных нежизнеспособных клеток (см. рисунок в приложении). При таких условиях напряжение, соответствующее детекции 7-AAD, необходимо скорректировать таким образом, чтобы жизнеспособные клетки (т.е., свежая цельная кровь) располагались в первой декаде на гистограмме, отображающей SS против 7-AAD (см. пример в приложении).
- Во избежание получения ложноположительных результатов при пробоподготовке не используйте реагенты, содержащие вещества, повышающие проницаемость мембраны или фиксирующие вещества.

ПРОЦЕДУРА

1. В каждую из пробирок для анализа клинических образцов добавьте по 20мкл раствора красителя 7-AAD.
2. Добавьте 100мкл исследуемого образца (что эквивалентно примерно 5×10^5 клеток).
Осторожно встряхивают пробирки на приборе Vortex.
3. Инкубируют в течение 15–20 мин при комнатной температуре (18–25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем при необходимости выполняют лизис эритроцитов, следуя рекомендациям для используемого лизирующего реагента.

Например, при использовании раствора для лизиса IOtest3 Lysing Solution (каталожный номер. A07799) добавьте к образцу 2мл рабочего раствора (1X), после этого незамедлительно перемешайте на вортексе и инкубируйте в течение 10 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте.

Если образец не содержит эритроцитов, не проводите лизис, но добавьте от 0,5 до 1мл PBS.

5. Готовые пробы необходимо проанализировать в течение 1 часа.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C в защищенном от света месте.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Актиномицины являются активными биологическими компонентами хромофора (2-амино-4,6 диметил-феноксазона-3) и циклических пентапептидов(3). Они являются антибиотиками бактериального происхождения, которые были впервые обнаружены в почвенных аскомицетах. Актиномицины образуют стабильные комплексы с двухцепочечной дезоксирибонуклеиновой кислотой (ДНК), но не образуют подобные комплексы с двухцепочечной рибонуклеиновой кислотой (РНК), гибридами РНК-ДНК, и одноцепочечными ДНК или РНК.

Спектральные характеристики 7-AAD позволяют успешно использовать его в проточной цитометрии (3). Комплекс 7-AAD/ДНК эффективно возбуждается голубым лазером с длиной волны 488 нм, в частности аргоновым лазером, которым оснащены некоторые цитометры (4). Пик эмиссии в темно-красной области (от 635 до 675 нм) комплекса 7-AAD/ДНК позволяет оптимально использовать такой флуоресцентный зонд в комбинации с флуоресцентными красителями, конъюгированными с флуоресцином изотиоцианатом (FITC) и с фикоэритрином R (PE) (3). В отличие от пропидиума иодида (PI), который также является флуоресцентным зондом, используемым как маркер для ДНК, спектр эмиссии комплекса 7-AAD/ДНК имеет меньшие области перекрытия со спектрами эмиссии флуорохромов FITC и PE.

ПРЕЦИЗИОННОСТЬ

Процент положительных результатов был установлен с использованием цельной крови, в которую добавили положительные клетки. Каждую пробу измеряли 4 раза, два раза в день в течение 1 дня на 2 приборах, с использованием 2 партий реагента-красителя жизнеспособности 7-аминоактиномицина D. Измерения (% положительных) выполняли на проточном цитометре Navios. Анализ проводился на основе метода CLSI EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Оценка прецизионности количественных методов измерения).

Наши критерии принятия зависят от количества положительных событий, измеренных для каждой популяции:

- Если положительных событий <1 500, CV <15%
- Если положительных событий >1 500, CV <10%

Лизирующий раствор IOtest 3:

Цельная кровь с добавлением клеточной линии HPBALL							
Количество положительных событий (среднее) = 5539							
	Между операторами	Между цитометрами	Внутри партии	Между партиями	Между анализами	Внутри анализа	Итого
CV (%)	1,48	1,55	4,44	1,41	2,87	3,05	4,91
РЕЗУЛЬТАТЫ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Лизирующая система Versalyse:

Цельная кровь с добавлением клеточной линии HPBALL							
Количество положительных событий (среднее) = 4034							
	Между операторами	Между цитометрами	Внутри партии	Между партиями	Между анализами	Внутри анализа	Итого
CV (%)	3,73	1,85	8,74	1,79	3,63	7,02	9,11
РЕЗУЛЬТАТЫ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

ТОЧНОСТЬ

Точность красителя жизнеспособности 7-аминоактиномицина D оценивалась путем сравнения результатов с результатами по референсному реагенту в качестве предиката. Анализ выполняли на цитометре NAVIOS с использованием набора проб цельной крови с добавлением положительных клеток. Систематическая ошибка оценки между тестовым и референсным реагентами была определена на основании различий между результатами теста. Если систематическая ошибка оценки находится в пределах допустимого диапазона ошибки или если р-значение указывает на отсутствие значительного различия ($>0,05$), тогда результаты теста проб пациента для двух реагентов рассматриваются как эквивалентные.

Полученные результаты обобщены в таблице далее.

Лизирующий раствор IOTest 3:

Количество доноров = 25				
Положительная мишень	Среднее значение Δ	Критерии Δ % клеток	р-значение	РЕЗУЛЬТАТЫ
Цельная кровь с добавлением клеточной линии HPBALL	0,31	<5	0,247	PASS

Лизирующая система Versalyse:

Количество доноров = 25				
Положительная мишень	Среднее значение Δ	Критерии Δ % клеток	р-значение	РЕЗУЛЬТАТЫ
Цельная кровь с добавлением клеточной линии HPBALL	-0,34	<5	0,289	PASS

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. При проведении проточной цитометрии возможно получение ложных результатов, если цитометр не был идеально позиционирован, не была проведена правильная компенсация утечек флуоресцентного агента или точное позиционирование областей.
2. Для получения точных и повторяемых результатов необходимо выполнять процедуры в соответствии с инструкцией-вкладышем и требованиями надлежащей лабораторной практики.
3. 7-AAD, активное вещество данного реагента, было оптимизировано для получения наилучшего соотношения специфического и неспецифического сигнала. Поэтому в каждом исследовании необходимо строго соблюдать соотношение между объемом реагента и объемом образца.
4. В случае лейкоцитоза образец следует разводить ФСБ приблизительно до концентрации 5×10^9 лейкоцитов в 1 л.
5. При некоторых заболеваниях, таких как тяжелая почечная недостаточность или гемоглобинопатия, лизис эритроцитов может происходить медленно, неполностью или совсем не происходить. В этом случае перед окрашиванием рекомендуется выделить мононуклеарные клетки в градиенте плотности (например, фикола).

Примеры и ссылки см. в Приложении.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter, Inc. в Соединенных Штатах и других странах.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Для пациента / пользователя / третьей стороны в Европейском Союзе и в странах с идентичным регуляторным режимом (Регламент 2017/746/ЕС в отношении медицинских изделий для *in vitro* диагностики); если, во время использования этого изделия или в результате его использования произошел серьезный инцидент, сообщите о нем производителю и/или его уполномоченному представителю и своему национальному органу регулирования.

СВЕДЕНИЯ О ВЕРСИЯХ

ВЕРСИЯ AF:	Дата выпуска: Октябрь 2021 г.
ВЕРСИЯ AW:	Дата выпуска: Апрель 2022 г.
Обновления с целью приведения в соответствие политике международной маркировки Beckman Coulter и для выполнения требований IVD-R (EC)2017/746:	

Добавлены разделы	«Предполагаемый пользователь», «Концентрация», «Прецизионность», «Точность», «Дополнительная информация», «Сведения о версиях»
Добавлена информация	См. раздел «Принцип работы»
Обновленные разделы	«Принцип работы», «Предупреждения и меры предосторожности», «Классификация опасностей по системе СГС», «Хранение и стабильность», «Признаки порчи», «Ограничения», «Приложение»
Удалены разделы	«Методика», «Примеры клинических областей применения», «Ожидаемые результаты», «Внутрилабораторная воспроизводимость результатов», «Линейность»

ВЕРСИЯ	Дата выпуска
АХ	Октябрь 2022 г.
Обновленные разделы	Добавлены переводы

ВЕРСИЯ	Дата выпуска
АУ	
Обновленные разделы	Хранение и стабильность

Определения символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)



	Spetsifikatsioon värvaine 7-AAD Viability Dye
Moodustumine	Vedel
Maht	3 ml
Kalibreerimine	Kasutusvalmis
λ ergastumine	488 nm
Emissiooni tipptase	655 nm (kaksikahelalise DNA kompleks)

7-AAD eluvõime värv

REF A07704 150 analüüsi; 3 ml, 20 µl
analüüsi kohta

In vitro diagnostiliseks kasutamiseks

KASUTUSOTSTARVE

7-AAD Viability Dye on lahusesse lisatud keemiline värvaine, mis on ette nähtud kasutamiseks voolutsütomeetriaal põhinevates ühe- või mitmeparameetrilistes analüüsides. See võimaldab inim pärilolu leukotsüütide analüüsimisel tuvastada mitteilujulisi rakke ja eristada neid huvipakkuvatest elujulistest rakkudest.

PÕHIMÕTE

7-aminoaktinomütsiin D (7-AAD) on aktinomütsiini analoog, mis sisaldab kromofoori 7. positsioonil asendatud amiinrühma. 7-AAD siseneb DNA tsütosiini/guaaniini aluste tippude vahele (1).

DNA kaksikahela värvimiseks tuleb proovi inkubeerida koos värvainega 7-AAD Viability Dye. Seejärel eemaldatakse erütrotsüüdid lüüsimisega ja pärast seda analüüsitakse leukotsüüte voolutsütomeetria.

Apoptotilised nekrootilised rakud ja/või kahjustunud rakud põhjustavad elujuliste rakkude voolutsütomeetria analüüsimisel interferentsi. Mitteilujulised rakud on kirjeldatavad ja tuvastatavad, sest need värvuvad ühendiga 7-AAD, samas kui terviku membraaniga elusrakud on ühendit 7-AAD mitteläbilaskvad ning ei värvu (need on ühendi 7-AAD suhtes negatiivsed) (2).

Voolutsütomeeter analüüsib valguse hajumist ja rakkude fluorestsentsi. See võimaldab lokaliseerida rakke histogrammil määratud elektroonilises aknas, milles valguse ortogonaalne hajumine (külghajuvus (KH)) korreleeritakse 7-AAD värvimisele vastava preparaadi fluorestsentsiga. Värvdamisetapis saab kasutada ka teisi kahte erinevat tsütomeetris kasutatavat parameetrit kombineerivaid histograme.

Seeläbi värvatud rakkude fluorestsentsi analüüsitakse positiivselt värvunud sündmuste (mitteilujuliste rakkude) eristamiseks mittevärvunud sündmustest (elujulistest rakkudest). Tulemusi saab kajastada mittefluorestseerunud sündmuste protsentuaalse osakaaluna kõigi värvdamisega arvesse võetud sündmuste suhtes.

SIHTKASUTAJA

See toode on ette nähtud laboratoorseks kasutamiseks.

PROOVID

Veeniverd tuleb võtta steriilsete katsutitega, mis sisaldavad antikoagulandina etüleendiamiintetraatsetaadi (EDTA) soola.

Proove tuleb hoida toatemperatuuril (18–25 °C) ja neid ei tohi loksutada. Proovimaterjal tuleb enne analüüsitava proovi võtmist ettevaatliku loksutamisega homogeniseerida.

Proove tuleb analüüsida 24 tunni jooksul alates veenipunktsioonist.

HOIATUS JA ETTEVAATUSABINÕUD

1. Ärge kasutage reagenti pärast aegumiskuupäeva.
2. Ärge külmutage.
3. Enne kasutamist laske tasakaalustuda toatemperatuuriga (18–25 °C).
4. Minimeerige kokkupuudet valgusega.
5. Vältige reagentide mikroobidega saastumist, vastasel juhul võite saada valed tulemused.
6. Selle kasutusvalmis reagenti 7-AAD sisaldus on 0,005% (mass ruumalaühiku kohta) ja dimetüülsulfoksiidi (DMSO) sisaldus 1% (maht ruumalaühiku kohta).

7-AAD puhtal kujul on potentsiaalselt kantserogeenne ja DMSO on ärritav.

Kuigi ainet on selles preparaadis ulatuslikult lahjendatud, võivad nende koostisosade kahjulikud toimed tervikuna või osaliselt säilida. Ärge pipettige kunagi suu kaudu ning vältige proovide ja reaktiivide kontakti naha, limaskestade ja silmadega. Järgige nende reagentide kasutamisel asjaomaseid ettevaatusabinõusid (kasutage kindaid, kitlit ja kaitseprille).

7. 7-AAD on kromofoor, mis laguneb valgusega kokkupuutel. Seda hoitakse läbipaistmatus viaalis, et kaitsta seda valguse eest enne kasutamist.
- Välistage inkubatsioonietappide ajal pidev kokkupuude valgusega ja piirake pärast värvimist proovide kokkupuudet valgusega.
8. Kõiki vereproove tuleb pidada potentsiaalselt nakkusohtlikuks ja käsitseda ettevaatusega (kasutage kaitsekindaid, kitlit ning kaitseprille).
9. Verekatsetid ja käitlemiseks kasutatav ühekordselt kasutatav materjal tuleb hävitada põletamiseks ettenähtud spetsiaalsetes konteinerites.

GHS-I OHUKLASSIFIKATSIOON

7-AAD Viability Dye

HOIATUS

H316

P332+P313

Põhjustab kerget nahaärritust.

Nahaärrituse korral: pöörduda arsti poole.

Dimetüülsulfoksiid 0,5 - 1,5%



Ohutuskaart on kättesaadav veebilehel beckman.com/techdocs

SÄILITAMINE JA STABIILSUS

Värvainet 7-AAD Viability Dye tuleb enne ja pärast viaali avamist hoida temperatuuril 2–8 °C ning valguse eest kaitstult.

Suletud viaali säilivusaeg stabiilsusuuringu põhjal: 730 päeva.

Avatud viaali stabiilsus: reagent on stabiilne 60 päeva.

Vt partiispetsiifilist analüüsi sertifikaati veebilehelt www.beckman.com.

RIKNEMISE TUNNUSED

Igasugune muutus reagentide füüsilises välimuses võib viidata reagendi riknemisele ja seda ei tohi kasutada.

Lisateabe hankimiseks või kahjustatud toote saamisel helistage Beckman Coulteri klienditeenindusse numbril 800-742-2345 (USA või Kanada) või võtke ühendust kohaliku Beckman Coulteri esindajaga.

VAJALIKUD, KUID KOMPLEKTI MITTEKUULUVAD MATERJALID

- Proovide kogumiseks vajalikud proovivõtukatsutid ja vahendid.
- Automaatpipetid ühekordselt kasutatavate otsakutega, mis võimaldavad teiselada 20, 100 ja 500 µl.
- Plastist hemolüüsi katsutid.
- Erütrotsüütide lüüsimisreagent. Näiteks tootesarja IOTest3 lüüsimislahus (viitenr A07799).
- Puhver (PBS: 0,01 M naatriumfosfaat; 0,145 M naatriumkloriid; pH 7,2).
- Tsentrifuugige.
- Automaatsegisti (vibratsioonsegamise tüüpi).
- Voolutsütomeeter.

PROOVIDE ETTEVALMISTAMINE

Proovis sisalduvate leukotsüütide kontsentratsioon peab olema väiksem kui 10^4 rakku mikrolitri kohta ($10^{10}/l$). Vajadusel lahjendage PBS-is, et leukotsüütide kontsentratsioon vastaks tasemele 5×10^3 rakku mikrolitri kohta ($5 \times 10^9/l$).

Protseduuril kasutatakse 100 µl proovi, mis võib olla katsutis eellahjendatud.

NB!

- Ühendile 7-AAD vastava fluorestsentsi intensiivsuse kohandamiseks võib samas katsutis värvida värske täisvere ja mitteelujõuliste stabiliseeritud rakkude proovi (vt illustratsiooni lisas). Sellisel juhul tuleb ühendi 7-AAD tuvastamisele vastavat pinget reguleerida nii, et elujõulised sündmused (st värske täisveri) avalduks ühendist 7-AAD olenevalt SS histogrammi esimeses dekaadis (vt näidet lisas).
- Kunstlikult positiivse värvumise vältimiseks ärge kasutage protseduuril reagente, mis sisaldavad permeabiliseerivaid või fikseerivaid aineid.

PROTSEDUUR

1. Lisage igasse analüüsikatsutisse 20 µl värvaine 7-AAD Viability Dye lahust.
2. Lisage 100 µl analüüsivat proovi (st kogus, mis on samaväärne ligikaudse tasemega 5×10^5 rakku).
Keerisegage ettevaatlikult katsuteid.
3. Inkubeerige 15 kuni 20 minutit toatemperatuuril (18–25 °C) ja eemal valgusest.

4. Seejärel lüüsi vajaduse korral punaseid vereliblesid, järgides kasutatavat lüüsimisreagenti puudutavaid soovitusi.

Kui soovite näiteks kasutada tootesarja IOTest3 lüüsimislahust (viitenr A07799), lisage 2 ml standardlahust (kontsentratsioonil 1X), keerisegage viivitamatult ja inkubeerige valguse eest kaitstult kümme minutit toatemperatuuril.

Kui proov ei sisalda erütrotsüüte, jätke lüüsimisetapp vahele ja lisage 0,5–1 ml PBS-i.

5. Valmistisi tuleb analüüsida ühe tunni jooksul.

Märkus. Preparaate tuleb alati hoida temperatuuril 2–8 °C ja valguse eest kaitstult.

TOIMIMINE

SPETSIIFILISUS

Aktinomütsiinid on kromofoori (2-amino-4,6-dimetüülphenoksasoon-3) ja tsükliiliste pentapeptiidide bioloogiliselt aktiivsed komponendid (3). Need on bakteriaalset päritolu antibiootikumid, mida on leitud pinnase askomütseetidest. Aktinomütsiinid moodustavad stabiilseid komplekse kaksikahelalise desoksüribonukleiinhappega (DNA), kuid seda tüüpi komplekse ei teki kaksikahelalise ribonukleiinhappe (RNA), RNA-DNA hübriidide ega üksikahelalise DNA või RNA-ga.

Ühend 7-AAD on tänu oma spektraalsetele omadustele voolutsütomeetriaal põhinevates analüüsides kasutamiseks eriti sobiv (3). Ühendi 7-AAD/DNA kompleksi maksimaalne absorptsioon on argoonlaseriga varustatud tsütomeetrite korral vastavuses sinise ergastuslainepikkusega 488 nm (4). Ühendi 7-AAD/DNA kompleksi maksimaalne fluorestsentsemissioon sügavpunases ribas (635–675 nm) tagab sondi fluorestsentsiisototsüanaadiga (FITC) ja R-fükoerütriiniga (R-PE) konjugeeritud antikehadega kombineerimisel selle kasutuse optimaalsuse (3). Teise DNA markerina kasutatava fluorestsentssondi propiidiumjodiidiga (PI) võrreldes on ühendi 7-AAD/DNA kompleksil väiksem FITC ja PE-ga kattuv emissioonispekter.

TÄPSUS

Positiivsete väärtuste protsent määrati täisverega, millele oli lisatud positiivseid rakke. Igat proovi testiti 4 korda, kaks korda päevas 1 päeva jooksul 2 instrumendil, kasutades 2 7-AAD elumuse määramise värvi reagentide partiid. Mõõtmised (% positiivne) tehti Naviosi voolutsütomeetriaga. Analüüsi CLSI meetodi EP5-A2 põhjal. Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Kvantitatiivsete mõõtmismeetodite täpsuse näitajate hindamine).

Meie sobivuskriteeriumid sõltuvad iga populatsiooni kohta mõõdetud positiivsete sündmuste arvust:

- Positiivse sündmuse korral < 1500, CV < 15%
- Positiivse sündmuse korral > 1500, CV < 10%

IOTest 3 lüüsimislahus:

Täisveri lisatud HPBALL rakuliiniga							
Positiivsete sündmuste arv (keskmine) = 5539							
	Kasutajatevaheline	Tsütomeetritevaheline	Partiisisene	Partiidevaheline	Testidevaheline	Testisisene	Kokku
CV (%)	1,48	1,55	4,44	1,41	2,87	3,05	4,91
TULEMUSED	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Versalyse'i lüüsimissüsteem:

Täisveri lisatud HPBALL rakuliiniga							
Positiivsete sündmuste arv (keskmine) = 4034							
	Kasutajatevaheline	Tsütomeetritevaheline	Partiisisene	Partiidevaheline	Testidevaheline	Testisisene	Kokku
CV (%)	3,73	1,85	8,74	1,79	3,63	7,02	9,11
TULEMUSED	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

MÕÕTETÄPSUS

7-AAD elumuse määramise värvi mõõtetäpsust hinnati, võrreldes tulemusi võrdlusreagendiga kui predikaadiga täisvereproovide komplektis, millele oli lisatud tsütomeetriga NAVIOS testitud positiivseid rakke. Analüüsi- ja võrdlusreagenti erinevused määrati analüüsitulemuste erinevuse põhjal. Kui nihe jääb lubatud vea piiridesse või p-väärtus ei näita statistiliselt olulist erinevust (> 0,05), peetakse kahe reagentiga patsiendi testitulemusi samaväärseteks.

Saadud tulemused on kokku võetud järgmises tabelis.

IOTest 3 lüüsimislahus:

Doonorite arv = 25				
Positiivne siht	Keskmine Δ	Δ% raku kriteeriumid	p-väärtus	TULEMUSED
Täisveri lisatud HPBALL rakuliiniga	0,31	<5	0,247	PASS

Versalyse'i lüüsimissüsteem:

Doonorite arv = 25				
Positiivne siht	Keskmine Δ	$\Delta\%$ raku kriteeriumid	p-väärtus	TULEMUSED
Täisveri lisatud HPBALL rakuliiniga	-0,34	<5	0,289	PASS

PIIRANGUD

- Voolutsütomeetria võib anda valed tulemused, kui tsütomeeter ei ole ideaalselt joondatud, kui fluorestsentsi lekkeid ei ole õigesti kompenseeritud ja kui piirkonnad ei ole hoolikalt paigutatud.
- Täpsed ja korratavad tulemused saadakse, kui kasutatavad protseduurid on kooskõlas tehnilise teabelehe ja heade laboritavadega.
- Selle reagendi toimeainet 7-AAD on parima spetsiifilise ja mittespetsiifilise signaali suhtarvu tagamiseks optimeeritud. Seetõttu tuleb iga analüüsi korral kindlasti järgida reagendi koguse ja proovi mahu suhet.
- Hüperleukotsütoosi korral lahjendage verd PBS-is nii, et saadav väärtus oleks ligikaudu 5×10^9 leukotsüüti liitri kohta.
- Teatud haigusseisundite (näiteks raske neerupuudulikkuse või hemoglobiinopaatia) korral võib erütrotsüütide lüüsimine olla aeglane, mittetäielik või isegi võimatu. Sellisel juhul on enne värvimist soovitatav mononukleaarsete rakkude isoleerimine tihedusgradiendi (näiteks Ficoll-gradiendi) abil.

Vt näiteid ja viiteid lisast.

KAUBAMÄRGID

Beckman Coulter, stiliseeritud logo ning selles juhendis nimetatud ettevõtte Beckman Coulter toote- ja teenusemärgid on ettevõtte Beckman Coulter, Inc. kaubamärgid või registreeritud kaubamärgid Ameerika Ühendriikides ja teistes riikides.

LISATEAVE

Patsiendile / kasutajale / muule osapoolele Euroopa Liidus ja identse regulatsioonirežiimiga riikides (määrus (EL) nr 2017/746 in vitro diagnostikameditsiiniseadmete kohta), kui selle seadme kasutamise ajal või selle kasutamise tagajärjel on toimunud tõsine vahejuhtum, teatage sellest tootjale ja/või tema volitatud esindajale ning teie riiklikult pädevale asutusele.

VERSIONI AJALUGU

REVISION AF:	Väljaandmise kuupäev: oktoober 2021
REVISION AW:	Väljaandmiskuupäev: aprill 2022
Värskendused, mis vastavad Beckman Coulteri ülemaailmse märgistamise poliitikale ja IVD-R (EL) 2017/746 nõuetele:	
Lisatud osad	Sihtkasutaja, Kontsentratsioon, Täpsus, Mõõtetäpsus, Lisateave, Versiooni ajalugu
Lisatud informatsioon	Vt jaotist Põhimõte
Uuendatud jaotised	Põhimõte, Hoiatus ja ettevaatusabinõud, GHS-i ohuklassifikatsioon, Säilitamine ja stabiilsus, Riknemise tunnused, Piirangud, Lisa
Eemaldatud osad	Metoodika, Kliinilise kasutamise näited, Oodatud tulemused, Laborisisene korratavus, Lineaarsus
REDAKTSIOON	Väljaandmise kuupäev
AX	Oktoober 2022
Uuendatud jaotised	Lisatud tõlked
REDAKTSIOON	Väljaandmise kuupäev
AY	
Uuendatud jaotised	Säilitamine ja stabiilsus

Sümboli tähis

Sümbolite mõisted on kättesaadavad veebilehel beckman.com/techdocs (dokument nr B60062)

	Specifikacije Boja za održivost 7-AAD
Oblik	Tekućina
Volumen	3 mL
Kalibracija	Spremno za upotrebu
λ ekscitacija	488 nm
Vršna emisija	655 nm (kompleks s dvolančanom DNA)

Boja za vijabilnost 7-AAD

REF A07704 150 testova; 3 mL, 20 μ L po testu

Za *in vitro* dijagnostičku uporabu

NAMJENA

Boja za održivost 7-AAD kemijsko je sredstvo za bojenje u otopini za jednoparametarsku ili višeparametarsku analizu pomoću protočne citometrije. Omogućuje prepoznavanje neodrživih stanica i njihovo odvajanje od (održivih) promatranih stanica prilikom analize humanih leukocita.

NAČELO

7-amino-aktinomycin D (7-AAD) analog je aktinomicina koji sadrži aminoskupinu supstituiranu na položaju 7 kromofora. 7-AAD se umeće između vrhova baza citozina/gvanina u DNK-u (1).

Bojenje dvostrukog lanca DNA provodi se inkubiranjem uzorka pomoću boje za održivost 7-AAD. Eritrociti se zatim uklanjaju liziranjem, a leukociti se uklanjaju protočnom citometrijom.

Apoptotičke nekrotične i/ili oštećene stanice izvor su interferencije u analizi održivih stanica pomoću protočne citometrije. Neodržive stanice moguće je obilježiti i prepoznati kada se oboje sredstvom 7-AAD, dok žive stanice koje zadržavaju integritet membrana ne propuštaju 7-AAD te ostaju neobojene (negativne su na 7-AAD) (2).

Protočni citometar analizira difuziju svjetlosti i fluorescenciju stanica. To omogućuje lokalizaciju stanica unutar elektroničkog okvira definiranog na histogramu, koji povezuje ortogonalnu difuziju svjetlosti (bočno raspršenje ili SS) s fluorescencijom, što odgovara bojenju reagensom 7-AAD. Ostali histogrami objedinjuju dva različita parametra dostupna na citometru te se koriste i u fazi ograđivanja.

Fluorescencija tako ograđenih stanica analizirana je da bi se odvojili pozitivno obojeni događaji (neodgovarajući) od neobojenih (odgovarajućih). Rezultati se mogu izraziti kao postotak nefluorescentnih događaja u odnosu na sve događaje obuhvaćene ograđivanjem.

CILJNI KORISNIK

Proizvod je namijenjen za profesionalnu laboratorijsku uporabu.

UZORCI

Venska krv mora se uzeti sterilnim epruvetama koje kao antikoagulans sadrže EDTA sol.

Uzorke držite na sobnoj temperaturi (18 – 25 °C) i nemojte ih tresti. Uzorak prije uzimanja testnog uzorka homogenizirajte pažljivim mućkanjem.

Uzorci venske krvi moraju se analizirati u roku od 24 sata od njihova uzimanja.

UPOZORENJE I MJERE OPREZA

1. Reagens nemojte upotrebljavati nakon isteka roka trajanja.
2. Nemojte zamrzavati.
3. Prije upotrebe pustite da dosegne sobnu temperaturu (18 – 25 °C).
4. Smanjite izlaganje svjetlu.
5. Izbjegavajte mikrobnu kontaminaciju reagensa ili može doći do netočnih rezultata.
6. Reagens spreman za upotrebu sadrži 0,005 % (masena koncentracija) 7-AAD-a i 1 % (volumni udio) dimetil-sulfoksida (DMSO-a).

U čistom obliku 7-AAD može biti kancerogen, a DMSO izaziva iritaciju.

Iako su u postojećoj formulaciji izrazito razrijeđeni, ti sastojci mogu zadržati sve svoje štetne učinke ili dio njih. Nemojte pipetirati ustima te izbjegavajte doticaj s kožom, sluznicama i očima. Pri upotrebi tih reagensa primjenjujte mjere opreza (osobito: nosite rukavice, kutu i zaštitne naočale).

7. 7-AAD jest kromofor podložan degradaciji pri izlaganju svjetlosti. Prije upotrebe čuva se u neprozirnoj bočici radi zaštite od svjetlosti.

- Izbjegavajte neprestano izlaganje svjetlosti tijekom faza inkubacije te smanjite izlaganje uzoraka svjetlosti nakon bojenja.
8. Svi uzorci krvi moraju se smatrati potencijalno zaraznima te je njima potrebno rukovati oprezno (odnosno nositi zaštitne rukavice, odjeću i naočale).
 9. Epruvete s krvlju i otpadni materijal za rukovanje treba odložiti u jednokratne spremnike namijenjene za spaljivanje.

KLASIFIKACIJA OPASNOSTI PREMA GHS-U

7-AAD Viability Dye

UPOZORENJE

H316

P332+P313

Uzrokuje blago nadraživanje kože.

U slučaju nadražaja kože: zatražiti savjet/pomoć liječnika.

Dimetil-sulfoksid 0,5 - 1,5 %



Sigurnosno-tehnički list dostupan je na adresi beckman.com/techdocs

POHRANA I STABILNOST

Boja za održivost 7-AAD mora se čuvati na temperaturi od 2 do 8 °C i zaštićena od svjetlosti prije i nakon otvaranja bočice.

Vijek trajanja zatvorene bočice prema ispitivanju stabilnosti: 730 dana.

Stabilnost otvorene bočice: reagens je stabilan 60 dana.

Na web-mjestu www.beckman.com pogledajte Certifikat o analizi specifičan za lot koji upotrebljavate.

DOKAZ PROPADANJA

Svaka promjena fizičkog izgleda reagensa može upućivati na propadanje te se reagens ne smije upotrebljavati.

Ako su vam potrebne dodatne informacije ili ste primili oštećen proizvod, nazovite korisnički servis tvrtke Beckman Coulter na 800-742-2345 (u SAD-u ili Kanadi) ili se obratite lokalnom predstavniku tvrtke Beckman Coulter.

POTREBNI MATERIJALI KOJI NISU DIO KOMPLETA:

- Epruvete za uzorke i materijal potreban za uzimanje uzoraka.
- Automatske pipete s potrošnim vršcima za 20, 100 i 500 µL.
- Plastične hemolitičke epruvete.
- Reagens za liziranje eritrocita. Na primjer: otopina za liziranje IOTest3 (REF A07799).
- Pufer (PBS: 0,01 M natrijeva fosfata, 0,145 M natrijeva klorida, pH 7,2).
- Centrifuga.
- Automatska miješalica (tip vorteks).
- Citometar toka.

PRIPREMA UZORAKA

Koncentracija leukocita u uzorku mora biti manja od 10^4 stanica/µL (10^{10} /L). Po potrebi razrijedite PBS da bi se koncentracija leukocita smanjila na 5×10^3 stanica/µL (5×10^9 /L).

U postupku se koristi 100 µL uzorka unaprijed razrijeđenog u epruveti ili drukčijeg.

NB:

- Prilagodba intenziteta fluorescencije u skladu sa sredstvom 7-AAD može se izvesti bojenjem uzorka pune svježe krvi i neodrživih stabiliziranih stanica u istoj epruveti za uzorke (pogledajte sliku u dodatku). Pod tim uvjetima napon koji odgovara detekciji sredstva 7-AAD potrebno je prilagoditi tako da se održi događaji (odnosno puna svježa krv) pojave u prvoj dekadi histograma BR ovisno u sredstvu 7-AAD (pogledajte primjer u dodatku).
- Tijekom postupka nemojte koristiti reagense koji sadrže permeacijska ili fiksacijska sredstva da biste spriječili umjetno pozitivno bojenje.

POSTUPAK

1. U svaku ispitnu epruvetu dodajte 20 µL otopine boje za održivost 7-AAD.
2. Dodajte 100 µL testnog uzorka (npr. ekvivalent od približno 5×10^5 stanica).
Epruvete za uzorke lagano promiješajte u vorteks-miješalici.
3. Inkubirajte 15 do 20 minuta na sobnoj temperaturi (18 - 25 °C), zaštićeno od svjetlosti.
4. Zatim izvršite liziranje eritrocita, ako je potrebno, tako da pratite preporuke reagensa za liziranje koji se upotrebljava.

Ako želite, primjerice, koristiti otopinu za liziranje IOTest 3 (REF A07799), dodajte 2 mL radne otopine (u koncentraciji od 1x), odmah promiješajte u vorteks-miješalici te inkubirajte 10 min na sobnoj temperaturi, zaštićeno od svjetlosti.

Ako uzorak ne sadrži eritrocite, nemojte lizirati, nego dodajte od 0,5 do 1 mL PBS-a.

5. Pripravke analizirajte u roku od 1 sat.

Napomena: u svakom slučaju pripravke čuvajte zaštićene od svjetlosti na temperaturi između 2 i 8 °C.

PERFORMANSE

SPECIFIČNOST

Aktinomicini su aktivni biološki sastojci kromofora (2-amino-4,6dimetilfenoksazon-3) i cikličkih pentapeptida (3). To su antibiotici bakterijskog podrijetla koji su povijesno karakterizirani u askomicetima u tlu. Aktinomicini tvore stabilne komplekse s dvolančanom deoksiribonukleinskom kiselinom (DNK-om), ali ne tvore taj tip kompleksa s dvolančanom ribonukleinskom kiselinom (RNK-om) ni RNK-DNK hibridima, kao ni s jednolančanim DNK-om ni RNK-om.

Zahvaljujući svojim spektralnim svojstvima, 7-AAD je spoj osobito prikladan za analizu protočnom citometrijom (3). Maksimalna apsorpcija kompleksa 7-AAD/DNA kompatibilna je s valnom duljinom plave boje pri aktivaciji od 488 nm za citometre opremljene argonskim laserom (4). Najveća emisija fluorescencije u tamnocrvenom pojasu (od 635 do 675 nm) kompleksa 7-AAD/DNA dopušta optimalnu upotrebu te kontrole u kombinaciji s antitijelima konjugiranim fluorescein izotiocijanatom (FITC-om) i crvenim fikoeritriinom (PE-om) (3). Za razliku od propidij jodida (PI-ja), koji je druga fluorescentna kontrola koja se koristi kao DNA marker, kompleks 7-AAD/DNA ima spektar emisije sa smanjenim preklapanjem uz FITC i PE.

PRECIZNOST

Postotne pozitivne vrijednosti utvrđene su pomoću pune krvi u koju su dodane pozitivne stanice. Svaki je uzorak obrađen 4 puta, dvaput dnevno tijekom 1 dana na 2 instrumenta uz 2 lota reagensa s bojilom za održivost 7-AAD. Mjerenja (% pozitivnih vrijednosti) provedena su s pomoću protočnog citometra Navios. Analiza je provedena na temelju metode EP5-A2 Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (CLSI): Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Procjena radnih značajki preciznosti metoda kvantitativnog mjerenja).

Naši kriteriji prihvatljivosti ovise o broju pozitivnih događaja izmjerenih za svaku populaciju:

- Ako je pozitivni događaj < 1500, CV < 15 %
- Ako je pozitivni događaj > 1500, CV < 10 %

Otopina za liziranje IOTest 3:

Puna krv u koju je dodana stanična linija HPBALL							
Broj pozitivnih događaja (srednja vrijednost) = 5539							
	Među operatorima	Među citometrima	Unutar lota	Među lotovima	Među obradama	Unutar obrade	Ukupno
CV (%)	1,48	1,55	4,44	1,41	2,87	3,05	4,91
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Sustav za liziranje VersaLyse:

Puna krv u koju je dodana stanična linija HPBALL							
Broj pozitivnih događaja (srednja vrijednost) = 4034							
	Među operatorima	Među citometrima	Unutar lota	Među lotovima	Među obradama	Unutar obrade	Ukupno
CV (%)	3,73	1,85	8,74	1,79	3,63	7,02	9,11
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

TOČNOST

Točnost bojila za održivost 7-AAD procijenjena je usporedbom rezultata s referentnim reagensom kao predikatom na skupu uzoraka pune krvi u koje su dodane pozitivne stanice obrađenih na citometru NAVIOS. Odstupanje između testa i referentnog reagensa utvrđeno je na temelju razlike između rezultata testa. Ako je odstupanje unutar dopuštenog raspona pogreške ili ako p-vrijednost upućuje na to da nema značajne razlike (> 0,05), rezultati testova na uzorcima pacijenata za dva reagensa smatraju se istovjetnima.

Dobiveni rezultati sažeti su u tablici u nastavku:

Otopina za liziranje IOTest 3:

Broj donora = 25				
Pozitivna ciljna vrijednost	Srednja vrijednost Δ	Kriterij stanica Δ %	p-vrijednost	REZULTATI
Puna krv u koju je dodana stanična linija HPBALL	0,31	<5	0,247	PASS

Sustav za liziranje VersaLyse:

Broj donora = 25				
Pozitivna ciljna vrijednost	Srednja vrijednost Δ	Kriterij stanica Δ %	p-vrijednost	REZULTATI
Puna krv u koju je dodana stanična linija HPBALL	-0,34	<5	0,289	PASS

OGRANIČENJA

1. Protočna citometrija može proizvesti pogrešne rezultate ako citometar nije savršeno poravnat, ako fluorescentna curenja nisu pravilno kompenzirana i ako regije nisu pažljivo pozicionirane.
2. Točni i ponovljivi rezultati dobivat će se sve dok se postupci izvode u skladu s tehničkom brošurom i u skladu s dobrim laboratorijskim praksama.
3. 7-AAD, aktivna tvar u ovom reagensu, optimiziran je tako da daje najbolji omjer specifičnih/nespecifičnih signala. Zato je važno pridržavati se omjera količine reagensa i količine uzorka prilikom svakog ispitivanja.
4. U slučaju hiperleukocitoze, razrijedite krv u PBS tako da dobijete vrijednost približno od 5×10^9 leukocita/L.
5. Pri određenim bolestima, npr. ozbiljnom zatajenju bubrega ili hemoglobinopatiji, liziranje eritrocita može biti sporo, nepotpuno ili nemoguće. U tom se slučaju prije bojenja preporučuje izoliranje jednojezgrenih stanica pomoću gradijenta gustoće (kao što je Ficoll).

Za primjere i reference pogledajte Dodatak.

ŽIGOVI

Beckman Coulter, stilizirani logotip te oznake proizvoda i usluga tvrtke Beckman Coulter žigovi su ili registrirani žigovi tvrtke Beckman Coulter, Inc. u Sjedinjenim Američkim Državama i drugim državama.

DODATNE INFORMACIJE

Za pacijenta / korisnika / treću stranu u Europskoj uniji i u državama s identičnim regulatornim režimom (Uredba 2017/746/EU o medicinskim proizvodima za in vitro dijagnostiku): ako tijekom upotrebe ovog uređaja ili kao rezultat njegove upotrebe dođe do ozbiljnog štetnog događaja, prijavite ga proizvođaču i/ili njegovu ovlaštenom zastupniku te nadležnom nacionalnom tijelu.

POVIJEST REVIZIJA

REVIZIJA AF:	Datum objave: listopad 2021.
REVIZIJA AW:	Datum objave: travanj 2022.
Ažuriranja radi usklađivanja s pravilnikom o globalnom označavanju tvrtke Beckman Coulter i u skladu sa zahtjevima uredbe (EU)2017/746 o in vitro dijagnostičkim medicinskim proizvodima (IVD-R):	
Dodani odjeljci	Ciljni korisnik, Koncentracija, Preciznost, Točnost, Dodatne informacije, Povijest revizija
Dodane informacije	Pogledajte odjeljak Načelo
Ažurirani odjeljci	Načelo, Upozorenje i mjere opreza, Klasifikacija opasnosti prema sustavu GHS, Čuvanje i stabilnost, Vidljivi znakovi propadanja, Ograničenja, Dodatak
Uklonjeni odjeljci	Metodologija, Primjeri kliničke primjene, Očekivani rezultati, Unutarlaboratorijska obnovljivost, Linearnost
REVIZIJA	Datum objave
AX	Listopad 2022.
Ažurirani odjeljci	Dodani prijevodi
REVIZIJA	Datum objave
AY	
Ažurirani odjeljci	Čuvanje i stabilnost

Pojmovnik simbola

Pojmovnik simbola dostupan je na web-mjestu beckman.com/techdocs (broj dokumenta B60062)

	Спецификации 7-AAD Viability Dye
Форма	Течност
Обем	3 mL
Калибриране	Готов за употреба
λ възбуждане	488 nm
Пик на излъчване	655 nm (комплекс с двойно-верижна ДНК)

7-AAD Viability Dye

REF A07704 150 теста; 3 mL, 20 µL/тест

За *in vitro* диагностика

ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

7-AAD Viability Dye е химически оцветяващ агент в разтвор, който е предназначен за моно- или мултипараметричен анализ чрез флуоцитометрия. При анализ на човешки левкоцити той позволява нежизнеспособни клетки да бъдат идентифицирани и изключени от клетките, които ни интересуват (жизнеспособните).

ПРИНЦИП

7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) е аналог на актиномицин, съдържащ amino-група, разположена в позиция 7 на хромофора. 7-AAD се вмъква между върховете на базите на ДНК цитозин/гуанин (1).

Оцветяването на двойно верижната ДНК се осъществява, когато пробата се инкубира със 7-AAD Viability Dye. Еритроцитите се премахват чрез лизиране и левкоцитите се анализират чрез флуоцитометрия.

Апоптичните, некротични и/или увредени клетки смущават флуоцитометричния анализ на жизнеспособните клетки. Нежизнеспособните клетки могат да бъдат характеризирани и идентифицирани, тъй като те се оцветяват от 7-AAD, докато живите клетки поради целостта на мембраната са непроницаеми за 7-AAD и са неочетени (т.е. те са 7-AAD негативни) (2).

Поточният цитометър анализира разсейването на светлината и флуоресценцията на клетките. Прави възможно локализирането на клетки в рамките на електронен прозорец, дефиниран върху хистограма, който корелира с перпендикулярното разпространение на светлината („Странично светоразсейване“ или SS), и флуоресценцията, кореспондираща с оцветяването на 7-AAD. Други хистограми, комбиниращи два от различните параметри, които са на разположение в цитометъра, също се използват на етапа на определянето на областта на анализ.

Флуоресценцията на гейтираните по този начин клетки се анализира, за да се изключат положително оцветените събития (нежизнеспособни) от неочетените (жизнеспособни). Резултатите могат да се представят като процент на нефлуоресциращи събития спрямо всички гейтирани събития.

ПРЕДВИДЕН ПОТРЕБИТЕЛ

Този продукт е предназначен само за лабораторна професионална употреба.

ПРОБИ

Венозна кръв трябва да се взема в стерилни епруветки, съдържащи сол EDTA като антикоагулант.

Материалите трябва да се съхраняват при стайна температура (18-25°C) и да не се разклащат. Материалите трябва да бъде хомогенизирани чрез леко разклащане, преди да се вземе проба за оцветяване.

Пробите трябва да бъдат анализирани в рамките на 24 часа от венوپунктурата.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ И ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ

1. Не използвайте реактива след изтичане на срока на годност.
2. Не замразявайте.
3. Оставете го да се темперира до стайна температура (18-25°C) преди употреба.
4. Минимизирайте излагането на светлина.
5. Избягвайте микробно замърсяване на реактивите, в противен случай е възможно да се получат погрешни резултати.
6. Този готов за употреба реактив съдържа 0,005 % (тегло/обем) 7-AAD и 1 % (обем/обем) диметил сулфоксид (DMSO).

В чиста форма 7-AAD е потенциално канцерогенен, а DMSO е дразнител.

Въпреки че са изключително разреждени в настоящата формулировка, тези съставки могат да запазят всички или част от вредните си ефекти. Никога не пипетирайте с уста и избягвайте всякакви контакти с кожата, лигавицата

и очите. Използвайте тези реактиви, като спазвате предпазните мерки за употреба (по-специално: носенето на ръкавици, престилка и защитни очила).

7. 7-AAD е хромофор, подложен на разграждане при излагане на светлина. Съхранява се в непрозрачен флакон, за да се предпази от светлина преди употреба.

Да се избягва продължително излагане на светлина в продължение на инкубацията и да се намали излагането на светлина на пробите след като са оцветени

8. Всички кръвни проби трябва да се считат за потенциално заразни и с тях трябва да се борави внимателно (по-специално: носене на защитни ръкавици, облекло и очила).
9. Епруветките за кръв и материалите за еднократна употреба, използвани за боравене, трябва да се изхвърлят във временни контейнери, предназначени за изгаряне.

КЛАСИФИЦИЯ НА ОПАСНОСТИТЕ ПО GHS

7-AAD Viability Dye

ВНИМАНИЕ

H316

P332+P313

Причинява леко дразнене на кожата.

При поява на кожно дразнене: Потърсете медицински съвет/помощ.

Диметилсулфоксид 0,5 - 1,5 %



Информационният лист за безопасност е наличен на beckman.com/techdocs

СЪХРАНЕНИЕ И СТАБИЛНОСТ

Реактивът 7-AAD Viability Dye трябва да се съхранява при 2 до 8°C и да не се излага на светлина преди и след отваряне на флакона.

Изследване на срок на годност при затворена епруетка и стабилност: 730 дни.

Стабилност на отворен флакон: реактивът е стабилен за 60 дни.

Вижте Сертификата за анализ за конкретната партида на www.beckman.com.

ДАНИИ ЗА ВЛОШАВАНЕ

Всяка промяна във физическия изглед на реактивите може да е признак за влошаване и реактивът не трябва да бъде използван.

За допълнителна информация или при получаване на повреден продукт се свържете с отдела за обслужване на клиенти на Beckman Coulter на тел. 800-742-2345 (САЩ или Канада) или се свържете с местния представител на Beckman Coulter.

НЕОБХОДИМИ МАТЕРИАЛИ, КОИТО НЕ СА ДОСТАВЕНИ С КОМПЛЕКТА:

- Епруетки за проби и материали, необходими за вземане на проби.
- Автоматични пипети с накрайници за еднократна употреба за 20, 100 и 500 µL.
- Пластмасови хемолитни епруетки.
- Реагент за лизиране на еритроцити с последващо промиване. Например: IOTest3 Lysing Solution (Ref. A07799).
- Буфер (PBS: 0,01 M натриев фосфат; 0,145 M разтвор на натриев хлорид, pH 7.2).
- Центрофугирайте.
- Автоматичен агитатор (тип вортекс).
- Поточен цитометър.

ПОДГОТОВКА НА ПРОБИ

Броят на левкоцитите в пробата трябва да бъде по-малко от 10^4 cells / µL (10^{10} /L). Ако е необходимо, разрежете кръвта с PBS за да стане концентрацията на левкоцитите до 5×10^3 cells / µL (5×10^9 /L).

Процедурата използва 100 µL от проба, предварително разредена в епруетка или по друг начин.

NB:

- Нагласяване на интензитета на флуоресценцията, съответстващ на 7-AAD, може да бъде осъществено като се използва оцветяване на проба от цялостна прясна кръв и нежизнеспособни, стабилизирани клетки в една и съща епруетка (вижте изображението в приложението). При тези условия, волтажът съответстващ на 7-AAD трябва да бъде нагласен така, че живите клетки (т.е. цялата прясна кръв) да се появява в първата декада на SS хистограмата в зависимост от 7-AAD (вижте примера в приложението).
- Не използвайте реактиви съдържащи проникващи или фиксиращи компоненти по време на процедурата, за да се предотврати погрешно положително оцветяване.

ПРОЦЕДУРА

1. Добавете 20 µL от 7-AAD Viability Dye разтвор към всяка тест епруветка.
2. Добавете 100 µL от тест пробата (т.е. еквивалент на приблизително 5×10^5 cells).
Смесете внимателно епруветките с вортекс.
3. Инкубирайте за 15 до 20 минути при стайна температура (18 - 25°C), защитени от светлина.
4. След това лизирайте червените кръвни телца, ако е необходимо, като следвате препоръките за използвания лизиращ реактив.
Като пример, ако използвате IOTest 3 Lysing разтвор (Ref. A07799) добавете 2 mL от работния разтвор (1X), вортексирайте незабавно и инкубирайте за 10 минути при стайна температура, предпазени от светлина.
Ако пробата не съдържа еритроцити, не използвайте лизиращия етап, а добавете 0.5 до 1 mL PBS.
5. Пробите трябва да се анализират в рамките на 1 час от венепункцията.

ЗАБЕЛЕЖКА: Във всички случаи, запазвайте пробите между 2 и 8 ° C и предпазени от светлина.

РАБОТНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ

СПЕЦИФИЧНОСТ

Актиномицините са активните биологични съставки на един хромофор (2-Amino-4,6 Dimethylphenoxazone-3) и на циклични пентапептиди (3). Те са антибиотици от бактериален произход, характеризирани исторически в почвата Ascomycetes. Актиномицетите образуват стабилни комплекси с двойно верижната ДНК, но не образува този тип комплекс с двойно верижната рибонуклеинова киселина (РНК) или с ДНК-РНК хибрид или с едно верижната ДНК или РНК.

Спектралните свойства на 7-AAD го правят особено подходящ за флуоцитометричен анализ (3). Максималната абсорбция на 7-AAD / ДНК комплекса е съответстваща на синята дължина на вълната на възбуждане 488 nm при цитометри, оборудвани с аргон лазер (4). Пикът на емисията на флуоресценцията в дълбоката червена фракция (635 to 675 nm) на 7-AAD / ДНК комплекса позволява оптимално използване на тази проба, когато е комбинирана с Fluorescein Isothiocyanate конюгирани антитела (FITC) и с R-Phycoerythrin (PE) (3). Наистина, за разлика от Propidium Iodide (PI), който е друг флуоресцентен компонент, използван като ДНК маркер, 7-AAD / ДНК комплексът има намален спектър на припокриване на емисиите на FITC и PE.

ТОЧНОСТ

Процентните положителни стойности са определени посредством цялостна кръв, обогатена с положителни клетки. Всяка проба е обработена 4 пъти, два пъти на ден за 1 ден на 2 инструмента, като са използвани 2 партии реактив на багирло за жизнеспособност 7-AAD. Измерванията (% положителни) са направени на поточен цитометър Navios. Процедурният анализ е извършен въз основа на CLSI метода EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods. (Метод EP5-A2 на CLSI: Оценка на точността на методите за количествено измерване.)

Нашите критерии за приемливост зависят от броя положителни събития, измерени за всяка популация:

- Ако положителните събития са < 1500, CV < 15 %
- Ако положителните събития са > 1500, CV < 10 %

Лизиращ разтвор IOTest 3:

Цялостна кръв, обогатена с HPBALL клетъчна линия							
Брой положителни събития (средно) = 5539							
	Между оператори	Между цитометри	Вътрепартидна	Между партии	Между цикли	В рамките на цикъл	Общо
CV (%)	1,48	1,55	4,44	1,41	2,87	3,05	4,91
РЕЗУЛТАТИ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Лизираща система VersaLyse:

Цялостна кръв, обогатена с HPBALL клетъчна линия							
Брой положителни събития (средно) = 4034							
	Между оператори	Между цитометри	Вътрепартидна	Между партии	Между цикли	В рамките на цикъл	Общо
CV (%)	3,73	1,85	8,74	1,79	3,63	7,02	9,11
РЕЗУЛТАТИ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

ТОЧНОСТ

Точността на багирлото за жизнеспособност 7-AAD е оценена чрез сравняване на резултатите с референтен реактив като потвърждение върху група от проби от цялостна кръв, обогатени с положителни клетки, обработени на цитометър

NAVIOS. Отклонението между тестовия и референтния реактив е определено чрез разликата между резултатите от теста. Ако отклонението е в рамките на допустимия обхват на грешки или р-стойността не показва значима разлика ($> 0,05$), резултатите от теста на пациентските проби с двата реактива се считат за еквивалентни.

Получените резултати са обобщени в таблицата, дадена по-долу:

Лизиращ разтвор IOTest 3:

Брой донори = 25				
Положителна цел	Средна Δ	Критерии Δ % клетки	р-стойност	РЕЗУЛТАТИ
Цялостна кръв, обогатена с HPBALL клетъчна линия	0,31	<5	0,247	PASS

Лизираща система VersaLyse:

Брой донори = 25				
Положителна цел	Средна Δ	Критерии Δ % клетки	р-стойност	РЕЗУЛТАТИ
Цялостна кръв, обогатена с HPBALL клетъчна линия	-0,34	<5	0,289	PASS

ОГРАНИЧЕНИЯ

- Поточната цитометрия може да даде неточни резултати, ако цитометърът не е бил идеално приравнен, ако течове на флуоресценция не са били правилно компенсирани или ако регионите не са били внимателно позиционирани.
- Ще бъдат получени точни и възпроизводими резултати, при условие, че използваните процедури са в съответствие с техническата листовка и са съвместими с добрите лабораторни практики.
- 7-AAD, активната субстанция на този реагент, е оптимизиран така, че да предложи най-доброто съотношение специфичен сигнал / неспецифичен сигнал. Поради това е важно да се спазва съотношението обем на реагента / обем на пробата при всяко изследване.
- В случай на хиперлевкоцитоза кръвта се разрежда в PBS, така че да се получи стойност приблизително 5×10^9 левкоцити / L.
- При някои заболявания като тежка бъбречна недостатъчност или хемоглобинопатии, лизирането на еритроцитите може да бъде забавено, непълно или дори невъзможно. В този случай се препоръчва да се изолират мононуклеарни клетки с помощта на плътностен градиент (Ficoll, например), преди оцветяването.

Вижте Приложението за примери и справки.

ТЪРГОВСКИ МАРКИ

Beckman Coulter, стилизираното лого и марките на продуктите и услугите на Beckman Coulter, присъстващи в този документ, са търговски марки или регистрирани търговски марки на Beckman Coulter, Inc. в САЩ и в други държави.

ДОПЪЛНИТЕЛНА ИНФОРМАЦИЯ

За пациенти/потребители/трети лица в Европейския съюз и в страни с идентичен регулаторен режим (Регламент 2017/746/ЕС относно ин витро диагностичните медицински изделия); ако по време на използването на това изделие или в резултат на използването му е настъпил сериозен инцидент, моля, съобщете за това на производителя и/или неговия упълномощен представител и на Вашия национален орган.

ХРОНОЛОГИЯ НА РЕДАКЦИИТЕ

РЕДАКЦИЯ AF:		Дата на издаване: октомври 2021 г.
РЕДАКЦИЯ AW:		Дата на издаване: април 2022 г.
Актуализации с цел съответствие с Глобалната политика за етикетиране на Beckman Coulter и съгласно изискванията на Регламент (ЕС) 2017/746 за медицинските изделия за ин витро диагностика (IVD-R):		
Добавени раздели	Целеви потребител, Концентрация, Прецизност, Точност, Допълнителна информация, Предишни редакции	
Добавена информация	Вижте разделите Принцип	
Актуализирани раздели	Принцип, Предупреждение и предпазни мерки, Класифициране на опасностите по глобалната хармонизирана система (GHS), Съхранение и стабилност, Данни за влошаване, Ограничения, Приложение	
Премахнати раздели	Методология, Примери за клинично приложение, Очаквани резултати, Вътрелaboratorна възпроизводимост, Линейност	

РЕДАКЦИЯ	Дата на издаване
AX	октомври 2022 г.
Актуализирани раздели	Добавени преводи

РЕДАКЦИЯ	Дата на издаване
AY	
Актуализирани раздели	Съхранение и стабилност

Легенда на символите

Речник на символите е наличен на beckman.com/techdocs (номер на документа B60062)

	規格 7-AAD 活力染劑
劑型	液體
容量	3 mL
校準	即用型
λ 激發	488 nm
發射峰	655 nm (具有雙股 DNA 的複合物)

7-AAD 活性染色劑

REF A07704 150 次測試；3 mL，20 µL/
測試

體外診斷使用

預期用途

7-AAD 活力染劑是一種化學染色溶液，專用於使用流式細胞術的單參數或多參數分析。它可在人類白血球分析中辨認非活性細胞並將其從相關（活性）細胞中排除。

原理

7-氨基-放射菌素 D (7-AAD) 是一種類似放射菌素，其所含胺基群組成發色團中的位置 7。7-AAD 會將自身插入 DNA 的胞嘧啶頂端與鳥嘌呤底部之間 (1)。

DNA 雙股染色的進行方式為將 7-AAD 活力染劑加入檢體中一起培養。接著透過溶解去除紅血球，並使用流式細胞術分析白血球。

細胞凋亡、細胞壞死和/或細胞受損是使用流式細胞術分析活性細胞時的干擾因素之一。非活性細胞可確定其特徵並予以辨認，因為它們會以 7-AAD 染色，而活性細胞由於細胞膜尚且完整，7-AAD 無法滲透也無法染色（亦即呈現 7-AAD 陰性反應）(2)。

流式細胞分析儀器可分析細胞的光漫射和螢光。此儀器可將細胞局限在直方圖上界定的電子窗口內，其會在光的正交漫射（「側向角散射」，統稱 SS）與相當於 7-AAD 染色的螢光之間建立相互關係。細胞分析儀上有合併兩種不同參數的其他直方圖可供使用，這些直方圖亦可用於圈選階段。

為了將陽性染色事件（非存活）從未染色事件（存活）中排除，對圈選細胞的螢光進行了分析。結果可表示為無螢光事件相對於透過圈選納入考慮之所有事件的百分比。

預期使用者

本產品為實驗室專用。

樣本

靜脈血必須使用無菌試管抽取，此無菌試管中含有 EDTA 鹽作為抗凝劑。

檢體應存放在室溫 (18~25°C) 下且不可搖晃。取用測試檢體前，應將檢體輕輕攪動，使之均勻化。

檢體必須在靜脈穿刺後 24 小時內進行分析。

警告和預防措施

1. 請勿使用過期試劑。
2. 切勿冷凍。
3. 使用前，請將其恢復到室溫 (18~25°C)。
4. 儘量避免陽光直射。
5. 請避免試劑受到微生物污染，否則可能會出現錯誤結果。
6. 這款即用型試劑含有 0.005% (重量/體積) 的 7-AAD 和 1% (體積/體積) 的二甲亞砷 (DMSO)。
純 7-AAD 是可能致癌的物質，純 DMSO 則有刺激性。

即使該成分在目前的配方中已經過極度稀釋，仍可能保留所有或部分有害人體的效應。切勿用嘴吸液，並一律避免接觸皮膚、黏膜和眼睛。請遵守使用預防措施來使用這些試劑（特別注意：穿戴防護手套、防護衣和護目鏡）。


7. 7-AAD 是一種發色團，在光照下會變質。使用前請將其貯存於不透光的小瓶內避光保存。
在培養階段期間請避免檢體受到連續的光線照射，檢體在進行染色之後亦應減少光線照射。
8. 所有血液檢體必須視為具有潛在傳染性，且必須小心處理（務必穿戴防護手套、防護衣和護目鏡）。
9. 用於處理的血液試管和一次性材料應放入焚化專用的特殊容器中處置。

GHS 危害分類

7-AAD Viability Dye

警告
H316
P332+P313

造成輕微皮膚刺激。
如果出現皮膚刺激：尋求醫療建議/就醫。
二甲基亞砷 0.5 - 1.5%

 安全性資料表載於 beckman.com/techdocs

存儲和穩定性

在打開試劑瓶前後，7-AAD 活力染劑必須避光保存在 2~8°C 下。

穩定性研究的封閉式藥瓶有效期限：730 天。

開瓶後穩定性：試劑穩定性可維持 60 天。

請參閱 www.beckman.com 參閱各批次專屬的分析證書。

變質的證據

試劑外觀的任何變化表示可能發生變質，因此不應使用該試劑。

如需瞭解其他資訊，或如果收到已損壞的產品，請撥打 800-742-2345（美國或加拿大）聯絡貝克曼庫爾特客戶服務部，或聯絡您當地的貝克曼庫爾特代表。

試劑盒未提供但卻需要的材料：

- 採樣時需要採樣試管和材料。
- 20、100 和 500 µL 自動移液器（帶有一次性吸頭）。
- 塑膠溶血試管。
- 紅血球溶解試劑。例如：IOtest3 溶解液 (REF A07799)。
- 緩衝劑（PBS：0.01 M 磷酸鈉；0.145 M 氯化鈉；pH 7.2）。
- 離心機。
- 自動攪拌器（漩渦型）。
- 流式細胞分析儀器。

檢體的製備

檢體中的白血球濃度必須小於 10^4 個細胞/µL (10^{10} /L)。必要時，請在 PBS 中進行稀釋，使白血球濃度達到 5×10^3 個細胞/µL (5×10^9 /L)。

此程序使用 100 µL 的檢體、預先稀釋或未預先稀釋的試管。

附註：

- 可採取調整措施使螢光強度與 7-AAD 相當，方法是用新鮮的全血檢體並在同一試管中用非活性的經過穩定處理的細胞進行染色（參閱附錄的圖像）。在上述情況下，必須調整相當於偵測出 7-AAD 的電壓，使活性事件（亦即新鮮全血檢體）根據 7-AAD 顯示在 SS 直方圖上的第一個十進位（請參閱附錄中的範例）。
- 請勿在此程序進行期間使用含滲透劑或固定劑的試劑，以免產生人為的陽性染色情況。

程序

- 在每個測試試管中添加 20 µL 的 7-AAD 活力染劑溶液。
- 添加 100 µL 的測試檢體（亦即約相當於 5×10^5 計數的細胞）。
輕輕漩渦振盪試管。
- 在室溫 (18-25°C) 下避光培養 15~20 分鐘。
- 然後遵循所用溶解試劑的建議，進行紅血球溶解（如有必要）。
舉例而言，若想要使用 IOtest3 溶解液 (REF A07799)，請添加 2 mL 的工作溶液 (1X)，立即漩渦振盪，並在室溫下避光培養 10 分鐘。
若檢體中不包含紅血球，請勿進行溶解步驟，但請添加 0.5~1 mL 的 PBS。
- 製劑應在 1 小時內進行分析。

註：在所有情況下，將製劑在 2~8°C 間避光保存。

性能

專一性

放射菌素是發色團（2-氨基-4,6-二甲基吩噻嗪-3）以及環狀五肽的活性生物成分 (3)。它們是素來就存在於土壤中的細菌性抗生素，屬於子囊菌綱。放射菌素會與雙股脫氧核糖核酸 (DNA) 形成穩定的複合物，但無法與雙股核糖核酸 (RNA) 或 RNA-DNA 雜合體或與單股 DNA 或 RNA 形成此類複合物。

7-AAD 的光譜特性使其成為特別適用於流式細胞術分析的化合物 (3)。7-AAD/DNA 複合物的最大吸收值與細胞分析儀器（裝配有氬雷射）的 488 nm 藍色激發波長相容 (4)。將 7-AAD/DNA 複合物深紅頻段 (635~675 nm) 螢光發射波峰搭配螢光異硫氰酸鹽共軛抗體 (FITC) 與 R 藻紅素 (PE) 使用，可發揮此探針的最佳效果 (3)。確實，與用作 DNA 標誌物的另一種螢光探針碘化丙啶 (PI) 相較，7-AAD/DNA 複合物與 FITC 和 PE 的發射光譜重疊較少。

準確度

使用添加了陽性細胞的全血測定陽性百分比。每份檢體皆使用 2 個批次的 7-AAD 活力染劑，以 2 台儀器 1 天執行 2 次，共執行 4 次。使用 Navios 流式細胞分析儀器檢測結果（陽性 %）。根據 CLSI method EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods（CLSI 方法 EP5-A2：評估定量檢測方法的準確度性能）進行分析。

我們的接受標準視各族群所檢測的陽性事件數量而定：

- 若陽性事件數量 < 1,500，則 CV < 15%
- 若陽性事件數量 > 1,500，則 CV < 10%

IOtest 3 溶解液：

添加了 HPBALL 細胞株的全血							
陽性事件數量（平均值）= 5539							
	各操作者間	各台細胞分析儀器間	批內	批間	各次執行間	各次執行內	總計
CV (%)	1.48	1.55	4.44	1.41	2.87	3.05	4.91
結果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Versalyse 溶解系統：

添加了 HPBALL 細胞株的全血							
陽性事件數量（平均值）= 4034							
	各操作者間	各台細胞分析儀器間	批內	批間	各次執行間	各次執行內	總計
CV (%)	3.73	1.85	8.74	1.79	3.63	7.02	9.11
結果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

準確性

評估 7-AAD 活力染劑準確性的方式，是比較它與參考試劑同時用於添加了陽性細胞的一組全血細胞檢體，在 NAVIOS 細胞分析儀器上進行化驗時，其結果有何差異。根據測試結果間的差異，測定了測試與參考試劑之間的偏差。如果偏差值在可允許的錯誤範圍內或是 p 值指出沒有重大差異（> 0.05），則透過兩種試劑進行的患者檢體的測試結果會視為相同。

所得結果總結於下表：

IOtest 3 溶解液：

捐贈者數量 = 25				
陽性目標	平均值差	細胞標準 Δ %	P 值	結果
添加了 HPBALL 細胞株的全血	0.31	<5	0.247	PASS

Versalyse 溶解系統：

捐贈者數量 = 25				
陽性目標	平均值差	細胞標準 Δ %	P 值	結果
添加了 HPBALL 細胞株的全血	-0.34	<5	0.289	PASS

限制條件

1. 流式細胞分析儀器在下列情況下可能產生錯誤結果：細胞分析儀器未正確校正、螢光洩漏未正確補償、相關區域並未仔細定位。
2. 按照技術手冊採用相關流程並遵循優良實驗室操作規範，便可得到準確且可重複的結果。
3. 7-AAD，該試劑中的活性物質已經過最佳化處理，以提供最佳的特異性/非特異性訊號比率。因此，在每次測試中遵守試劑體積/檢體體積比率很重要。
4. 如果白血球過多，請在 PBS 中稀釋血液，以使白血球濃度值約為 5×10^9 個/L。

5. 在嚴重腎衰竭、血紅蛋白病等特定疾病狀態中，紅血球溶解可能會變得緩慢、不完全，甚至無法溶解。在這種情況下，建議在染色前使用密度梯度（例如聚蔗糖）隔離單核細胞。

請參閱附錄以閱讀舉例和參考文獻。

商標

Beckman Coulter、徽標以及本文述及的貝克曼庫爾特公司產品和服務標記是美國貝克曼庫爾特有限公司在美國和其他國家的商標或註冊商標。

其他資訊

對於患者/使用者/第三方（在歐盟和有相同監管制度（體外診斷醫療裝置法規，2017/746/EU）的國家）；如果在使用中或由於使用而導致嚴重事件，請將情況回報製造商和/或授權代表，以及貴國主管機關。

修訂歷程記錄

修訂版 AF：	發佈日期：2021 年 10 月
修訂版 AW：	發行日期：2022 年 4 月
更新以遵守貝克曼庫爾特公司全球標籤政策以及 IVD-R (EU)2017/746 規定：	
已新增部分	預期使用者、濃度、精確度、準確性、其他資訊、修訂歷史
已新增資訊	請參閱「原理」一節
已更新部分	原理、警告和預防措施、GHS 危害分類、存儲和穩定性、變質的證據、限制、附錄
已移除的部分	方法、臨床應用範例、預期結果、實驗室內的再現性、線性
修訂	發行日期
AX	2022 年 10 月
已更新部分	已新增翻譯版本
修訂	發行日期
AY	
已更新部分	存儲和穩定性

符號釋義

符號術語表請參見網站：beckman.com/techdocs（文件編號 B60062）

	Specificații
	Colorant pentru teste de viabilitate celulară 7-AAD
Formulă	Lichidă
Volum	3 ml
Calibrare	Gata de utilizare
Excitare λ	488 nm
Vârful de emisie	655 nm (complex cu ADN dublu catenar)

Colorant viabilitate 7-AAD

REF A07704 150 de teste; 3 ml, 20 µl/test

Pentru diagnosticare *in vitro*

UTILIZARE PREVĂZUTĂ

Colorantul pentru teste de viabilitate celulară 7-AAD este un agent de colorare chimic în soluție și este conceput pentru analize mono- sau multiparametrice folosind citometrie în flux. Acesta permite identificarea celulelor neviabile și excluderea lor dintre celulele de interes (viabile) în analizele pentru leucocite umane.

PRINCIPIU

7-amino-actinomomicina D (7-AAD) este un analog al actinomomicinei care conține o grupare aminică substituită în poziția 7 a cromoforului. 7-AAD se inserează între vârfurile bazelor de citozină/guanină ale ADN-ului (1).

Colorarea ADN-ului dublu catenar se efectuează prin incubarea probei cu colorant pentru teste de viabilitate celulară 7-AAD. Eritrocitele se îndepărtează apoi prin lizare, iar leucocitele se analizează prin citometrie în flux.

Celulele apoptotice, necrotice și/sau deteriorate sunt surse de interferență în analiza celulelor viabile prin citometrie în flux. Celulele neviabile pot fi caracterizate și identificate deoarece sunt colorate de 7-AAD, în timp ce celulele vii, păstrându-și integritatea membranară, sunt impermeabile la 7-AAD și sunt necolorate (adică sunt 7-AAD negative) (2).

Citometrul în flux analizează difuzia luminii și fluorescența celulelor. Acesta face posibilă localizarea celulelor în fereastra electronică definită pe o histogramă, care corelează difuzia ortogonală a luminii (Dispersia perpendiculară sau SS – Side Scatter) și fluorescența care corespunde colorării 7-AAD. În etapa de gating se folosesc și alte histograme care combină doi dintre diferiții parametri disponibili pe citometru.

Fluorescența celulelor astfel separate prin gating se analizează pentru excluderea evenimentelor colorate pozitiv (celule neviabile) de cele necolorate (celule viabile). Rezultatele pot fi exprimate ca procentaj de celule evenimente nefluorescente în raport cu toate evenimentele luate în considerare de gating.

UTILIZATOR PRECONIZAT

Acest produs este destinat utilizării profesionale în laborator.

PROBE

Sângele venos trebuie recoltat utilizând eprubete sterile care conțin o sare de EDTA drept anticoagulant.

Probele trebuie păstrate la temperatura camerei (18–25°C) și nu trebuie agitate. Acestea nu se vor scutura. Se recomandă omogenizarea probei prin agitare ușoară înainte de recoltarea probei de test.

Proba trebuie analizată în decurs de 24 de ore de la punctia venoasă.

AVERTIZĂRI ȘI MĂSURI DE PRECAUȚIE

1. Nu utilizați reactivul după data expirării.
2. Nu congelați.
3. Înainte de utilizare, lăsați reactivul să ajungă la temperatura camerei (18–25°C).
4. Reduceți la minimum expunerea la lumină.
5. Evitați contaminarea microbiană a reactivilor. În caz contrar, se pot obține rezultate false.
6. Acest reactiv gata de utilizare conține 0,005% (greutate/volum) 7-AAD și 1% (volum/volum) dimetilsulfoxid (DMSO).

În formă pură, 7-AAD este potențial cancerigen, iar DMSO este o substanță iritantă.

Deși sunt extrem de diluați în prezenta formulare, acești constituenți își pot păstra, integral sau parțial, efectele nocive. Nu pipetați niciodată cu gura și evitați orice contact cu pielea, mucoasele și ochii. Utilizați acești reactivi respectând măsurile de precauție pentru utilizare (în special purtarea de mănuși, halat și ochelari de protecție).

7. 7-AAD este un cromofor care se degradează în urma expunerii la lumină. Se depozitează într-o fiolă opacă pentru a-l proteja de lumină înainte de utilizare.

Evitați expunerea continuă la lumină în timpul etapelor de incubare și reduceți expunerea la lumină a probelor după ce s-a efectuat colorarea.

8. Toate probele de sânge trebuie considerate potențial infecțioase și trebuie manipulate cu grijă (în special: purtarea de mănuși de protecție, halate și ochelari de protecție).
9. Eprubetele pentru sânge și materialele de unică folosință utilizate pentru manipulare trebuie eliminate în recipiente ad-hoc destinate incinerării.

CLASIFICAREA RISCURILOR ÎN SISTEMUL GHS

7-AAD Viability Dye

ATENȚIE

H316

P332+P313

Provoacă iritații cutanate ușoare.

În caz de iritare a pielii: solicitați sfat medical/îngrijire medicală.

Dimetilsulfoxid 0,5 - 1,5%



Fișa tehnică de securitate este disponibilă la beckman.com/techdocs

DEPOZITAREA ȘI STABILITATEA

Înainte și după desigilarea flaconului, colorantul pentru teste de viabilitate celulară 7-AAD trebuie păstrat la o temperatură cuprinsă între 2°C și 8°C și ferit de lumină.

Perioada de valabilitate în fiolă închisă în conformitate cu studiul de stabilitate: 730 zile.

Stabilitatea fiolei desigilate: reactivul este stabil timp de 60 (de) zile.

Consultați certificatul de analiză specific lotului la adresa www.beckman.com.

DOVADĂ DE DETERIORARE

Orice modificare a aspectului fizic al reactivilor poate indica degradarea. În acest caz, nu se recomandă utilizarea reactivului.

Pentru informații suplimentare sau dacă s-a primit un produs deteriorat, sunați la Serviciul Clienți Beckman Coulter la 800-742-2345 (SUA sau Canada) sau contactați-vă reprezentantul Beckman Coulter local.

MATERIALE NECESARE, DAR NEFURNIZATE CU SETUL:

- Eprubete pentru probe și materiale necesare pentru prelevarea probelor.
- Pipete automate cu vârfuri de unică folosință pentru 20, 100 și 500 µl.
- Eprubete din plastic pentru hemoliză.
- Reactiv de lizare a eritrocitelor. De exemplu, soluție de lizare IOTest 3 (REF A07799).
- Soluție tampon (PBS: 0,01 M fosfat de sodiu; 0,145 M clorură de sodiu; pH 7,2).
- Centrifugați.
- Agitator automat (tip Vortex).
- Citometru de flux.

PREGĂTIREA PROBELOR

Concentrația de leucocite din probă trebuie să fie mai mică de 10^4 celule/µl (10^{10} celule/l). Dacă este necesar, diluați în PBS pentru a aduce concentrația de leucocite la 5×10^3 celule/µl (5×10^9 /l).

Procedura utilizează 100 µl de probă prediluată în eprubetă sau altfel.

NB:

- Reglarea intensității fluorescenței corespunzătoare 7-AAD poate fi efectuată folosindu-se colorarea unei probe de sânge integral proaspăt și celule stabilizate neviabile în aceeași eprubetă (vezi imaginea din anexă). În aceste condiții, tensiunea corespunzătoare detectării 7-AAD trebuie reglată astfel încât evenimentele viabile (adică sângele integral proaspăt) să apară în prima decadă a unei histograme SS în funcție de 7-AAD (vezi exemplul din anexă).
- Nu utilizați reactivi care conțin agenți de permeabilizare sau de fixare în cursul procedurii pentru a preveni colorarea artefactuală pozitivă.

PROCEDURĂ

1. Adăugați 20 µl de colorant pentru teste de viabilitate celulară 7-AAD în fiecare eprubetă de testare.
2. Adăugați 100 µl de probă de test (adică echivalentul a aproximativ 5×10^5 celule).
Amestecați cu grijă eprubetele în agitatorul vortex.
3. Incubați timp de 15–20 de minute la temperatura camerei (18–25°C) într-un loc ferit de lumină.
4. Apoi, dacă este necesar, efectuați liza eritrocitelor, urmând recomandările pentru reactivul de liză utilizat.

De exemplu, dacă doriți să utilizați soluție de lizare IOTest 3 (REF A07799), adăugați 2 ml de soluție de lucru (1X), amestecați imediat în agitatorul vortex și incubați timp de 10 minute la temperatura camerei și protejat de lumină.

Dacă proba nu conține eritrocite, mu efectuați această etapă de lizare, ci adăugați 0,5–1 ml de PBS.

5. Preparatele trebuie analizate în interval de 1 oră.

Observație: în toate cazurile, păstrați preparatele la temperaturi cuprinse între 2°C și 8°C și ferite de lumină.

PERFORMANȚĂ

SPECIFICITATE

Actinomicinele sunt constituenți biologici activi ai unui cromofor (2-amino-4,6-dimetil-fenoxazonă-3) și ai pentapeptidelor ciclice (3). Ele sunt antibiotice de origine bacteriană caracterizate din punct de vedere istoric în Ascomycetes de sol. Actinomicinele formează complexi stabili cu acidul dezoxiribonucleic (ADN) dublu catenar, însă nu și cu acidul ribonucleic (ARN) dublu catenar și nici cu hibridi ADN-ARN sau cu ADN ori ARN monocatenar.

Proprietățile spectrale ale 7-AAD determină ca acest compus să fie foarte adecvat pentru analize citometrice în flux (3). Absorbția maximă a complexului 7-AAD/ADN este compatibilă cu lungimea de undă de excitație de 488 nm (albastru) pentru citometrele echipate cu laser cu argon (4). Emisia fluorescentă de vârf în banda de roșu profundă (635–675 nm) a complexului 7-AAD/ADN permite utilizarea optimă a acestei sonde atunci când este combinată cu anticorpi conjugați cu izotiocianat de fluoresceină (FITC) și cu R ficoeritrină (PE) (3). Într-adevăr, în contrast cu iodura de propidiu (PI), care este o altă sondă fluorescentă utilizată ca marker ADN, complexul 7-AAD/ADN are un spectru de emisie redus de suprapunere cu FITC și PE.

PRECIZIE

Valorile procentuale pozitive au fost stabilite folosind sânge integral îmbogățit cu celule pozitive. Fiecare probă a fost analizată de 4 ori, de două ori pe zi timp de 1 zi, pe 2 instrumente, folosind 2 loturi de reactiv colorant pentru viabilitate 7-AAD. Măsurătorile (% pozitive) au fost efectuate pe un citometru în flux Navios. Analiza a fost efectuată în conformitate cu metoda CLSI EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Evaluarea performanței de precizie a metodelor de măsurare cantitativă).

Criteriile noastre de acceptare depind de numărul de evenimente pozitive măsurate pentru fiecare populație:

- Dacă evenimentul pozitiv < 1500, CV < 15%
- Dacă evenimentul pozitiv > 1500, CV < 10%

Soluție de lizare IOTest 3:

Sânge integral îmbogățit cu HPBALL linie celulară							
Număr de evenimente pozitive (medie) = 5539							
	Inter-operator	Inter-citometru	Intra-lot	Inter-lot	Inter-ciclu	Intra-testare	Total
CV (%)	1,48	1,55	4,44	1,41	2,87	3,05	4,91
REZULTATE	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Sistem de lizare VersaLyse:

Sânge integral îmbogățit cu HPBALL linie celulară							
Număr de evenimente pozitive (medie) = 4034							
	Inter-operator	Inter-citometru	Intra-lot	Inter-lot	Inter-ciclu	Intra-testare	Total
CV (%)	3,73	1,85	8,74	1,79	3,63	7,02	9,11
REZULTATE	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

ACURATEȚE

Acuratețea colorantului pentru viabilitate 7-AAD a fost evaluată prin compararea rezultatelor cu un reactiv de referință ca predicat pe un set de probe de sânge integral îmbunătățit cu celule pozitive, analizate în cadrul unui citometru NAVIOS. Eroarea sistematică dintre test și reactivul de referință a fost determinată în funcție de diferența dintre rezultatele testului. Dacă eroarea sistematică se încadrează în intervalul de eroare permis sau dacă valoarea p nu indică o diferență semnificativă (> 0,05), rezultatele testului probelor pacientului pentru cei doi reactivi sunt considerate ca fiind echivalente.

Rezultatele obținute sunt rezumate în tabelul de mai jos:

Soluție de lizare IOTest 3:

Număr de donatori = 25				
Ținta pozitivă	Medie Δ	Criterii celulă Δ%	Valoarea p	REZULTATE
Sânge integral îmbogățit cu HPBALL linie celulară	0,31	<5	0,247	PASS

Sistem de lizare VersaLyse:

Număr de donatori = 25				
Ținta pozitivă	Medie Δ	Criterii celulă Δ%	Valoarea p	REZULTATE
Sânge integral îmbogățit cu HPBALL linie celulară	-0,34	<5	0,289	PASS

LIMITĂRI

1. Citometria în flux poate furniza rezultate false dacă citometrul nu a fost aliniat perfect, dacă scurgerile de fluorescență nu au fost compensate corect și dacă regiunile nu au fost poziționate corect.
2. Se vor obține rezultate corecte și reproductibile dacă procedurile utilizate respectă prospectul tehnic și bunele practici de laborator.
3. 7-AAD, substanța activă din acest reactiv, a fost optimizat astfel încât să ofere cel mai bun raport între semnalul specific și semnalul nespecific. Prin urmare, este important ca la fiecare test să se respecte raportul volum de reactiv/volum de probă.
4. În cazul unei hiperleucocitoze, diluați sângele în PBS astfel încât să obțineți o valoare de aproximativ 5×10^9 leucocite/l.
5. În anumite stări patologice, cum ar fi insuficiența renală severă sau hemoglobinopatiile, liza eritrocitelor poate fi lentă, incompletă sau chiar imposibilă. În acest caz, se recomandă izolarea celulelor mononucleate utilizându-se un gradient de densitate (de exemplu, Ficoll) înainte de colorare.

Consultați Anexa pentru exemple și referințe.

MĂRCI COMERCIALE

Beckman Coulter, logoul stilizat și mărcile de produse și servicii Beckman Coulter menționate aici sunt mărci comerciale sau mărci comerciale înregistrate ale Beckman Coulter, Inc. în Statele Unite și în alte țări.

INFORMAȚII SUPLIMENTARE

În cazul unui pacient/utilizator/terț aflat în Uniunea Europeană sau în țări cu un regim de reglementare identic (Regulamentul 2017/746/UE privind dispozitivele medicale pentru diagnostic in vitro); dacă, în timpul utilizării acestui dispozitiv sau în urma utilizării acestuia, are loc un incident grav, raportați acest incident către producător și/sau reprezentantul său autorizat și către autoritatea națională din țara dvs.

ISTORICUL REVIZUIRILOR

REVIZIA AF:	Data publicării: octombrie 2021
REVIZIA AW:	Data publicării: Aprilie 2022
Se actualizează pentru a respecta politica globală de etichetare Beckman Coulter și cerințele regulamentului IVD-R (UE) 2017/746:	
Secțiuni adăugate	Utilizator propus, Concentrație, Precizie, Acuratețe, Informații suplimentare, Istoricul revizuirilor
Informații adăugate	Consultați secțiunile Principiu
Secțiuni actualizate	Principiu, Avertizări și măsuri de precauție, Clasificarea riscurilor în sistemul GHS, Depozitare și stabilitate, Dovadă de deteriorare, Limitări, Anexă
Secțiuni eliminate	Metodologie, Exemple de utilizări clinice, Rezultate preconizate, Reproducibilitate intralaborator, Liniaritate
REVIZIE	Data publicării
AX	Octombrie 2022
Secțiuni actualizate	Au fost adăugate traduceri
REVIZIE	Data publicării
AY	
Secțiuni actualizate	Depozitare și stabilitate

Cheie simboluri

Glosarul de simboluri este disponibil la beckman.com/techdocs (număr document B60062)

	Specifikacije Viabilno barvilo 7-AAD
Formulacija	Tekočina
Količina	3 ml
Umerjanje	Pripravljeno za uporabo
λ ekscitacija	488 nm
Vršna vrednost emisij	655 nm (kompleks z dvoverižno DNK)

Barvilo za detekcijo živih celic 7-AAD

REF A07704 150 testov; 3 ml, 20 µl/test

Za diagnostično uporabo *in vitro*

NAMEN UPORABE

Viabilno barvilo 7-AAD je kemično barvilo v raztopini, zasnovano za analizo enega ali več parametrov z uporabo pretočne citometrije. Omogoča odkrivanje neviabilnih celic in njihovo ločevanje od (viabilnih) celic zanimanja pri analizi humanih levkocitov.

NAČELO

7-amino-aktinomycin D (7-AAD) je analog aktinomicina, ki vsebuje zamenjano aminske skupino na položaju 7 kromofora. 7-AAD se vstavi med vrha baz citozin/gvanin DNK (1).

Barvanje dvoverižne DNK se izvede z inkubacijo vzorca z viabilnim barvilom 7-AAD. Rdeče krvničke nato odstranimo z lizo, levkocite pa analiziramo s pretočno citometrijo.

Apoptotične, nekrotične in/ali poškodovane celice so vir motenj pri analizi viabilnih celic z uporabo pretočne citometrije. Neviabilne celice je mogoče označiti in identificirati, ker se obarvajo z reagentom 7-AAD, medtem ko barvilo 7-AAD ne more prehajati skozi žive celice z ohranjeno neoporečno membrano, zato niso obarvane (tj. so negativne za 7-AAD) (2).

Pretočni citometer analizira difuzijo svetlobe in fluorescenco celic. Omogoča lokalizacijo celic v elektronskem oknu, opredeljenem v histogramu, ki je povezan z ortogonalno difuzijo svetlobe (stransko sipanje ali SS) in fluorescenco, ki ustreza barvanju z barvilom 7-AAD. Med fazo zajema se uporabljajo tudi drugi histogrami, ki kombinirajo dva različna parametra, ki sta na voljo na citometru.

Fluorescenco tako zajetih celic analiziramo z namenom ločevanja pozitivno obarvanih dogodkov (neviabilnih) od neobarvanih dogodkov (viabilnih). Rezultati se lahko izrazijo kot odstotek nefluorescenčnih dogodkov glede na vse zajete dogodke.

PREDVIDENI UPORABNIK

Izdelek je namenjen profesionalni laboratorijski uporabi.

VZORCI

Pri jemanju venske krvi je treba uporabiti sterilne epruvete, ki vsebujejo sol EDTA kot antikoagulant.

Vzorče je treba hraniti pri sobni temperaturi (od 18–25 °C) in se jih ne sme pretresati. Vzorec je treba homogenizirati z rahlim stresanjem pred odvzemom testnega vzorca.

Vzorče je treba analizirati v 24 urah po venepunkciji.

OPOZORILA IN PREVIDNOSTNI UKREPI

1. Ne uporabljajte reagenta po izteku roka uporabnosti.
2. Ne zamrzujte.
3. Pred uporabo počakajte, da se ogrejejo na sobno temperaturo (18–25 °C).
4. Čim manj izpostavljajte svetlobi.
5. Preprečite mikrobno kontaminacijo reagentov, sicer lahko pride do napačnih rezultatov.
6. Ta reagent, pripravljen za uporabo, vsebuje 0,005 % (masa/volumen) 7-AAD in 1 % (volumen/volumen) dimetilsulfoksida (DMSO).

V čisti obliki je 7-AAD potencialno kancerogen, DMSO pa je dražljiva snov.

Čeprav sta ti sestavini v tej formulaciji izjemno razredčeni, lahko ohranita vse ali nekatere škodljive učinke. Nikoli ne pipetirajte z usti in se izogibajte vsakršnemu stiku s kožo, sluznico in očmi. Pri uporabi teh reagentov upoštevajte previdnostne ukrepe za uporabo (predvsem: nošenje rokavic, halje in zaščitnih očal).

7. 7-AAD je kromofor, ki se ob izpostavljenosti svetlobi razgradi. Pred uporabo ga shranjujte v neprozorni viali, zaščitnega pred svetlobo.

Med fazami inkubacije preprečite neprekinjeno izpostavljenost vzorcev svetlobi, med barvanjem pa zmanjšajte izpostavljenost vzorcev svetlobi.

8. Vse vzorce krvi je treba obravnavati kot potencialno kužne in je treba z njimi ravnati previdno (predvsem je treba nositi zaščitne rokavice, halje in očala).
9. Epruvete za kri in material za enkratno uporabo je treba odstraniti v zabojnike na licu mesta, namenjene sežigu.

KLASIFIKACIJA NEVARNOSTI PO GHS

7-AAD Viability Dye

POZOR

H316

P332+P313

Povzroča rahlo draženje kože.

Če nastopi draženje kože: poiščite zdravniško pomoč/oskrbo.

Dimetilsulfoksid 0,5 - 1,5 %



Varnostni list je na voljo na spletnem mestu beckman.com/techdocs

SHRANJEVANJE IN OBSTOJNOST

Viabilno barvilo 7-AAD je treba shranjevati pri temperaturi od 2 do 8 °C ter zaščiteno pred svetlobo pred odprtjem vial in po tem.

Rok uporabnosti zaprte vial po študiji stabilnosti: 730 dni.

Stabilnost odprte stekleničke: reagent je stabilen 60 dni.

Oglejte si ustrezen certifikat o analizi za izbrano serijo na spletni strani www.beckman.com.

DOKAZ O POSLABŠANJU STANJA

Vsaka sprememba fizičnega videza reagentov lahko kaže na poslabšanje stanja in reagenta ni dovoljeno uporabljati.

Za dodatne informacije ali ob prejemu poškodovanega izdelka pokličite službo za pomoč strankam družbe Beckman Coulter na številko 800-742-2345 (ZDA ali Kanada) ali se obrnite na lokalnega predstavnika podjetja Beckman Coulter.

POTREBEN MATERIAL, KI NI PRILOŽEN V KOMPLETU:

- Epruvete za vzorčenje in material, potreben za vzorčenje.
- Samodejne pipete s konicami za enkratno uporabo za 20, 100 in 500 µl.
- Plastične epruvete za hemolizo.
- Reagent za lizo rdečih krvničk. Na primer: raztopina za lizo IOTest 3 (ref. A07799).
- Pufer (PBS: 0,01 M natrijev fosfat; 0,145 M natrijev klorid; pH 7,2).
- Centrifugirajte.
- Samodejni stresalnik (za stresanje).
- Pretočni citometer.

PRIPRAVA VZORCEV

Koncentracija levkocitov v vzorcu mora biti manjša od 10^4 celic/µl (10^{10} /l). Po potrebi razredčite v raztopini PBS, da koncentracijo levkocitov zmanjšate na 5×10^3 celic/µl (5×10^9 /l).

Pri postopku se uporabi 100 µl vzorca, vnaprej razredčenega v epruveti ali drugače.

Opomba:

- Prilagoditev intenzivnosti fluorescence, ki ustreza 7-AAD, se lahko izvede z barvanjem vzorca sveže polne krvi in neviabilnih stabiliziranih celic v eni epruveti (glejte sliko v prilogi). Pri teh pogojih je treba napetost, ki ustreza zaznavanju 7-AAD, prilagoditi tako, da se viabilni dogodki (tj. sveža polna kri) pojavijo na prvi dekadi histograma SS glede na 7-ADD (glejte primer v prilogi).
- Med postopkom ne uporabljajte reagentov, ki vsebujejo sredstva za permeabilnost ali fiksna sredstva, da preprečite lažno pozitivno barvanje.

POSTOPEK

1. Vsaki testni epruveti dodajte 20 µl raztopine viabilnega barvila 7-AAD.
2. Dodajte 100 µl testnega vzorca (tj. enakovredno količino približno 5×10^5 celic).
Nežno vrtinčite epruvete.
3. Inkubirajte 15 do 20 minut pri sobni temperaturi (18–25 °C), zaščiteno pred svetlobo.
4. Nato po potrebi izvedite lizo rdečih krvničk ob upoštevanju priporočil za reagent, ki ga uporabite za izvedbo lize.
Če želite na primer, uporabiti raztopino za lizo IOTest 3 (ref. A07799), dodajte 2 ml delovne raztopine (1-kratne), takoj vrtinčite in 10 minut zaščiteno pred svetlobo inkubirajte pri sobni temperaturi.

Če vzorec ne vsebuje rdečih krvničk, ne izvedite faze z lizo, ampak dodajte 0,5 do 1 ml PBS.

5. Pripravke je treba analizirati v 1 uri.

Opomba: v vseh primerih pripravke hranite na temperaturi od 2 do 8 °C in zaščitite pred svetlobo.

USPEŠNOST

SPECIFIČNOST

Aktinomicini so aktivne biološke sestavine kromofora (2-amino-4,6 dimetilfenoksazon-3) in cikličnih pentapeptidov (3). So antibiotiki bakterijskega izvora iz talnih zaprtotrosov (Ascomycota). Aktinomicini tvorijo stabilne komplekse z dvojno razvejano deoksiribonukleinsko kislino (DNK), vendar ne tvorijo te vrste kompleksa z dvoverižno ribonukleinsko kislino (RNK) ali hibridi RNK-DNK ali enoverižno DNK ali RNK.

Zaradi spektralnih lastnosti je barvilo 7-AAD spojina, ki je še posebej primerna za analizo s pretočno citometrijo (3). Največja absorpcija kompleksa 7-AAD/DNK je združljiva z modro ekscitabilno valovno dolžino 488 nm za citometre z argonskim laserjem (4). Vršna fluorescenčna emisija v temno rdečem pasu (od 635 do 675 nm) za kompleks 7-AAD/DNK omogoča optimalno uporabo te sonde, če se kombinira s protitelesi, konjugiranimi s fluoresceinizotiocianatom (FITC) in fikoeritrinom P (PE) (3). V nasprotju s propidijevim jodidom (PI), ki je še ena fluorescenčna sonda, ki se uporablja kot označevalec DNK, ima kompleks 7-AAD/DNK zmanjšan prekrivajoči se emisijski spekter v kombinaciji s FITC in PE.

NATANČNOST

Odstotke pozitivnih vrednosti smo določili z uporabo polne krvi, obogatene s pozitivnimi celicami. Vsak vzorec je bil obravnavan štirikrat, dvakrat dnevno en dan na dveh napravah z uporabo dveh serij reagenta viabilnega barvila 7-AAD. Meritve (% pozitivnih) so bile opravljene na pretočnem citometru Navios. Analiza je bila izvedena na podlagi metode CLSI EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Vrednotenje natančnosti kvantitativnih merilnih metod).

Naša merila sprejemljivosti so odvisna od števila pozitivnih dogodkov, izmerjenih za vsako populacijo:

- Če je pozitiven dogodek < 1.500, je CV < 15 %
- Če je pozitiven dogodek > 1.500, je CV < 10 %

Raztopina za lizo IOTest 3:

Polna kri, obogatena s HPBALL celično linijo							
Število pozitivnih dogodkov (povprečje) = 5539							
	Med upravljavci	Med citometri	Znotraj serije	Med serijami	Med postopki	Znotraj postopka	Skupaj
CV (%)	1,48	1,55	4,44	1,41	2,87	3,05	4,91
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Sistem za liziranje Versalyse:

Polna kri, obogatena s HPBALL celično linijo							
Število pozitivnih dogodkov (povprečje) = 4034							
	Med upravljavci	Med citometri	Znotraj serije	Med serijami	Med postopki	Znotraj postopka	Skupaj
CV (%)	3,73	1,85	8,74	1,79	3,63	7,02	9,11
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

TOČNOST

Točnost viabilnega barvila 7-AAD smo ocenili s primerjavo rezultatov z referenčnim reagentom kot reagentom s potrjeno skladnostjo na nizu vzorcev polne krvi, obogatene s pozitivnimi celicami, obdelane na citometru NAVIOS. Pristranskost med testom in referenčnim reagentom je bila določena na podlagi razlike med rezultati testa. Če je odstopanje znotraj dovoljenega območja napake ali vrednost p ne kaže pomembne razlike (> 0,05), se rezultati preskusov za vzorec bolnika za oba reagenta štejejo kot enakovredni.

Dobljeni rezultati so povzeti v naslednji preglednici:

Raztopina za lizo IOTest 3:

Število darovalcev = 25				
Pozitivna tarča	Povprečje Δ	Δ % celičnega kriterija	vrednost p	REZULTATI
Polna kri, obogatena s HPBALL celično linijo	0,31	<5	0,247	PASS

Sistem za liziranje Versalyse:

Število darovalcev = 25				
Pozitivna tarča	Povprečje Δ	Δ % celičnega kriterija	vrednost p	REZULTATI
Polna kri, obogatena s HPBALL celično linijo	-0,34	<5	0,289	PASS

OMEJITVE

1. S pretočno citometrijo lahko pride do napačnih rezultatov, če citometer ni bil točno nameščen, če puščanje fluorescence ni bilo ustrezno izravnano in če območja niso bila natančno pozicionirana.
2. Točne in ponovljive rezultate se bo doseglo, če se bo uporabilo postopke, ki so skladni s priloženim tehničnim listom in z načeli dobre laboratorijske prakse.
3. 7-AAD, učinkovina v tem reagentu, je bila optimizirana tako, da zagotavlja najboljše razmerje med specifičnim in nespecifičnim signalom. Zato je pomembno, da pri vsakem testu upoštevate razmerje med volumnom reagenta in volumnom vzorca.
4. V primeru hiperlevkocitoze razredčite kri v raztopini PBS, da dobite vrednost približno 5×10^9 levkocitov/l.
5. Pri nekaterih bolezenskih stanjih, kot je huda ledvična odpoved ali hemoglobinopatije, je lahko liza rdečih krvničk počasna, nepopolna ali celo nemogoča. V tem primeru je priporočljivo izolirati mononuklearne celice z uporabo gradienta gostote (na primer Ficoll) pred obarvanjem.

Primere in reference si oglejte v prilogi.

BLAGOVNE ZNAMKE

Beckman Coulter, stiliziran logotip ter znamke izdelkov in storitev podjetja Beckman Coulter, omenjene v tem dokumentu, so blagovne znamke ali registrirane blagovne znamke podjetja Beckman Coulter, Inc. v Združenih državah Amerike in drugih državah.

DRUGI PODATKI

Za bolnike/uporabnike/tretje osebe v Evropski uniji in v državah z enakim regulativnim režimom (Uredba 2017/746/EU o medicinskih pripomočkih za in vitro diagnostiko): če med uporabo tega pripomočka ali kot rezultat njegove uporabe pride do resnega incidenta, o tem poročajte proizvajalcu in/ali njegovemu pooblaščenemu predstavniku in svojemu nacionalnemu organu.

ZGODOVINA REVIZIJ

REVIDIRANA IZDAJA AF:	Datum izdaje: oktober 2021
REVIDIRANA IZDAJA AW:	Datum izdaje: April 2022
Posodobitve za skladnost z globalno politiko označevanja Beckman Coulter in v skladu z zahtevami IVD-R (EU) 2017/746:	
Dodana poglavja	Predvideni uporabnik, Koncentracija, Natančnost, Točnost, Druge informacije, Zgodovina revizij
Dodatne informacije	Oglejte si poglavje Načelo
Posodobljena poglavja	Načelo, Opozorila in previdnostni ukrepi, Razvrstitev glede na nevarnosti skladno z globalnim usklajenim sistemom, Shranjevanje in stabilnost, Dokazi o poslabšanju stanja, Omejitve, Priloga
Odstranjena poglavja	Metodologija, Primeri klinične uporabe, Pričakovani rezultati, Ponovljivost znotraj laboratorija, Linearnost
REVIZIJA	Datum izdaje
AX	Oktober 2022
Posodobljena poglavja	Dodani prevodi
REVIZIJA	Datum izdaje
AY	
Posodobljena poglavja	Shranjevanje in stabilnost

Seznam simbolov

Glosar simbolov je na voljo na beckman.com/techdocs (številka dokumenta B60062)

	Specifikacije 7-AAD boja za vijabilnost ćelija
Formulacija	Tečno
Zapremina	3 ml
Kalibracija	Spremno za upotrebu
λ ekscitacija	488 nm
Vršna vrednost emisije	655 nm (kompleks sa dvolančanom DNK)

7-AAD boja za održivost

REF A07704 150 testova; 3 ml, 20 µl/testu

Za *in vitro* dijagnostičku upotrebu

NAMENA

7-AAD boja za vijabilnost ćelija je hemijsko sredstvo za bojenje u rastvoru, koje je predviđeno za monoparametarsku ili multiparametarsku analizu korišćenjem protočne citometrije. Ona omogućava da se nevijabilne ćelije identifikuju i isključe od (vijabilnih) ćelija od interesa u analizi ljudskih leukocita.

PRINCIP

7-amino-aktinomicin D (7-AAD) je analog of aktinomicina koji sadrži amino grupu zamenjenu u položaju 7 hromofora. 7-AAD se umeće između vrhova citozinskih/guaninskih baza DNK (1).

Bojenje dvolančane DNK se vrši inkubiranjem uzorka sa 7-AAD bojom za vijabilnost ćelija. Eritrociti se zatim uklanjaju liziranjem a leukociti se analiziraju protočnom citometrijom.

Apoptotične nekrotične i/ili oštećene ćelije predstavljaju izvor smetnji u analizi vijabilnih ćelija korišćenjem protočne citometrije. Nevijabilne ćelije mogu biti okarakterisane i identifikovane jer su bojene bojom 7-AAD, dok žive ćelije, koje zadržavaju integritet svoje membrane, ne propuštaju 7-AAD i ne bivaju obojene (tj, one su negativne na 7-AAD) (2).

Protočni citometar meri difuziju svetlosti i fluorescenciju ćelija. On omogućava lokalizaciju ćelija unutar elektronskog prozora definisanog na histogramu, što je u korelaciji sa ortogonalnom difuzijom svetlosti („bočno rasejanje“ ili SS) i fluorescencijom koja odgovara bojenju 7-AAD. Drugi histogrami koji kombinuju dva različita parametra koja postoje na citometru se takođe koriste u fazi regulacije.

Fluorescencija tako regulisanih ćelija se analizira kako bi se pozitivno obojeni događaji (nevijabilni) isključili od neobojenih događaja (vijabilnih). Rezultati se mogu prikazati kao procenat nefluorescentnih događaja u odnosu na sve događaje uzete u obzir putem regulacije.

PREDVIĐENI KORISNIK

Ovaj proizvod je namenjen za stručnu upotrebu u laboratoriji.

UZORCI

Uzorci iz venske krvi moraju se uzimati sterilnim epruvetama koje sadrže EDTA so kao antikoagulans.

Uzorke treba čuvati na sobnoj temperaturi (18–25°C) i ne tresti. Uzorak treba pre uzimanja test uzorka homogenizovati blagim mešanjem.

Uzorci se moraju analizirati u roku od 24 sati od venepunkcije.

UPOZORENJE I MERE OPREZA

1. Ne koristite reagens nakon isteka roka trajanja.
2. Ne zamrzavajte.
3. Pre upotrebe sačekajte da se približi sobnoj temperaturi (18–25°C).
4. Izbegavati izloženost svetlosti.
5. Sprečite mikrobску kontaminaciju reagenasa ili se mogu javiti netačni rezultati.
6. Ovaj reagens spreman za upotrebu sadrži 0,005% (težina/zapremina) 7-AAD i 1% (zapremina/zapremina) dimetil sulfoksida (DMSO).

U čistom obliku, 7-AAD je potencijalno karcinogen, a DMSO može da izazove iritaciju.

Iako su ekstremno razblaženi u ovoj formulaciji, ovi konstituenti mogu da zadrže sve ili deo štetnih efekata. Pipetiranje nikada ne vršite ustima i izbegavajte sav kontakt sa kožom, sluzokožom i očima. Koristite ove reagens uz poštovanje mera predostrožnosti za upotrebu (posebno: nošenje rukavica, odeće i zaštitnih naočara).

7. 7-AAD je hromofor koji podleže razgradnji usled izloženosti svetlosti. Skladišti se u tamnoj bočici da bi se zaštitio od svetlosti pre upotrebe.

Izbegavajte kontinuirano izlaganje svetlosti tokom faza inkubacije i smanjite izlaganje uzoraka svetlosti nakon započetog bojenja.

8. Svi uzorci krvi moraju se smatrati potencijalno infektivnim i njima se mora pažljivo rukovati (posebno: nošenje zaštitnih rukavica, odeće i zaštitnih naočara).
9. Epruvete za uzorak krvi i potrošni materijal koji je korišćen za rukovanje treba odložiti u ad hoc kontejnere predviđene za spaljivanje.

GHS KLASIFIKACIJA OPASNOSTI

7-AAD Viability Dye

UPOZORENJE

H316

P332+P313

Izaziva blagu iritaciju kože.

Ako dođe do iritacije kože: Potražiti medicinski savet/mišljenje.

Dimetil sulfoksid 0,5 - 1,5%



Bezbednosni list je dostupan na adresi beckman.com/techdocs

SKLADIŠTENJE I STABILNOST

7-AAD boja za vijabilnost ćelija se mora čuvati na temperaturi od 2 do 8°C zaštićeno od svetlosti, pre i posle otvaranja bočice.

Ispitivanje roka trajanja zatvorene bočice u odnosu na stabilnost: 730 dana.

Stabilnost otvorene bočice: reagens je stabilan 60 dan(a).

Pogledajte dokument „Certificate of Analysis“ (Sertifikat analize) za određeni lot na veb-sajtu www.beckman.com.

DOKAZI POGORŠANJA

Bilo koja promena u fizičkom izgledu reagensa može ukazivati na pogoršanje i reagens ne treba koristiti.

Za dodatne informacije ili ako dobijete oštećen proizvod, pozovite korisnički servis kompanije Beckman Coulter na broj 800-742-2345 (SAD ili Kanada) ili pozovite svog lokalnog predstavnika kompanije Beckman Coulter.

POTREBNI MATERIJALI KOJI SE NE ISPORUČUJU UZ KOMPLET:

- Epruvete za uzorkovanje i materijal potreban za uzorkovanje.
- Automatske pipete sa nastavcima za jednokratnu upotrebu za 20, 100 i 500 µl.
- Plastične epruvete za hemolizu.
- Reagens za liziranje eritrocita. Na primer: IOTest 3 rastvor za liziranje (REF. A07799).
- Pufer (PBS: 0,01 M natrijum-fosfat; 0,145 M natrijum-hlorid; pH 7,2).
- Centrifuga.
- Automatska mešalica (vrtložnog tipa).
- Protočni citometar.

PRIPREMA UZORAKA

Koncentracija leukocita u uzorku mora biti manja od 10^4 ćelija/µl (10^{10} /l). Ako je potrebno razredite u PBS-u da biste koncentraciju leukocita spustili na 5×10^3 ćelija/µl (5×10^9 /l).

U postupku se koristi 100 µl uzorka, prethodno razblaženog u epruveti za uzorak ili na drugi način.

Napomena:

- Podešavanje intenziteta fluorescencije koje odgovara 7-AAD može da se obavi korišćenjem bojenja uzorka sveže pune krvi i nevijabilnih stabilizovanih ćelija u istoj epruveti za uzorak (pogledati sliku u dodatku). Pod ovim uslovima, napon koji odgovara detekciji 7-AAD mora da se prilagodi tako da se održivi događaji (tj. sveža puna krv) prikazuju u prvoj dekadi SS histograma, u zavisnosti od 7-AAD (pogledati primer u dodatku).
- Tokom postupka ne koristite reagense koji sadrže sredstva za prodiranje ili fiksaciju kako bi se sprečilo artefaktno pozitivno bojenje.

POSTUPAK

1. Dodajte 20 µl rastvora 7-AAD boje za vijabilnost ćelija u svaku testnu epruvetu za uzorak.
2. Dodajte 100 µl test uzorka (tj., ekvivalent od približno 5×10^5 ćelija).
Pažljivo izmešajte epruvete za uzorak u vrtložnoj mešalici.
3. Inkubirajte 15 do 20 minuta na sobnoj temperaturi (18–25°C), zaštićeno od svetlosti.
4. Zatim izvršite liziranje crvenih krvnih ćelija preteći preporuke za korišćeni reagens za liziranje, ukoliko je to potrebno.

Primeru radi, ako želite da koristite IOTest 3 rastvor za liziranje (REF. A07799), dodajte 2 ml radnog rastvora (1X), odmah izmešajte u vrtložnoj mešalici i inkubirajte 10 minuta na sobnoj temperaturi, zaštićeno od svetlosti.

Ako uzorak ne sadrži eritrocite, ne pokrećite fazu liziranja već dodajte 0,5 do 1 ml PBS-a.

5. Preparate treba analizirati u roku od 1 sata.

Napomena: U svim slučajevima preparate čuvajte na temperaturi između 2 i 8°C i zaštićene od svetlosti.

PERFORMANSE

SPECIFIČNOST

Aktinomicini su aktivni biološki konstituenti hromofora (2-amino-4,6dimetilfenoksazon-3) i cikličnih pentapeptida (3). To su antibiotici bakterijskog porekla istorijski okarakterisani u gljivama klase Ascomycetes. Aktinomicini formiraju stabilne komplekse sa dvolančanom dezoksiribonukleinskom kiselinom (DNK), ali ne formiraju ovu vrstu kompleksa niti sa dvolančanom ribonukleinskom kiselinom (RNK) ili RNK-DNK hibridima, ni sa jednolančanom DNK ili RNK.

Spektralna svojstva 7-AAD čine ga jedinjenjem koje je naročito pogodno za analizu protočnom citometrijom (3). Maksimalna apsorpcija 7-AAD/DNK kompleksa kompatibilna je sa talasnom dužinom eksitacije plave svetlosti od 488 nm za citometre opremljene argonskim laserom (4). Vršna fluorescentna emisija u dubokom crvenom pojasu (od 635 do 675 nm) 7-AAD/DNK kompleksu dozvoljava optimalno korišćenje ove sonde kada se koristi zajedno sa antitelima konjugovanim fluorescein izotiocijanatom (FITC) i sa R fikoeritrinom (PE) (3). Zaista, za razliku od propidijum-jodida (PI), koji je još jedna fluorescentna sonda koja se koristi kao DNK marker, 7-AAD/DNK kompleks ima spektar emisije smanjenog preklapanja sa FITC i PE.

PRECIZNOST

Procenat pozitivnih vrednosti utvrđen je pomoću pune krvi obogaćene pozitivnim ćelijama. Svaki uzorak je analiziran 4 puta, dva puta dnevno tokom 1 dana na 2 instrumenta pomoću 2 lota reagensa 7-AAD boje za provodljivost. Merenja (% pozitivnog) su izvršena na Navios protočnom citometru. Analiza je obavljena na osnovu CLSI metoda EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Evaluacija preciznog utvrđivanja performansi kvantitativnih metoda merenja).

Naši kriterijumi prihvatljivosti zavise od broja pozitivnih događaja izmerenih za svaku populaciju:

- Ako je pozitivan događaj <1.500, CV <15%
- Ako je pozitivan događaj >1.500, CV <10%

IOTest 3 rastvor za liziranje:

Puna krv obogaćena HPBALL ćelijskom linijom							
Broj pozitivnih događaja (srednja vrednost) = 5539							
	Između više operatera	Između više citometara	Unutar jednog lota	Između više lotova	Između više analiziranja	Unutar jednog analiziranja	Ukupno
CV (%)	1,48	1,55	4,44	1,41	2,87	3,05	4,91
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Sistem za liziranje Versalyse:

Puna krv obogaćena HPBALL ćelijskom linijom							
Broj pozitivnih događaja (srednja vrednost) = 4034							
	Između više operatera	Između više citometara	Unutar jednog lota	Između više lotova	Između više analiziranja	Unutar jednog analiziranja	Ukupno
CV (%)	3,73	1,85	8,74	1,79	3,63	7,02	9,11
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

TAČNOST

Tačnost testa 7-AAD boje za provodljivost procenjena je poređenjem rezultata sa referentnim reagensom kao osnovom na kompletu uzoraka pune krvi obogaćene pozitivnim ćelijama analiziranim na NAVIOS citometru. Odstupanje između testa i referentnog reagensa je određeno na osnovu razlike između rezultata testiranja. Ako je odstupanje u okvirima dozvoljenog opsega greške ili p-vrednost ne ukazuje na značajnu razliku (>0,05), onda se rezultati testova na uzorcima pacijenata za dva reagensa smatraju ekvivalentnim.

Kratak pregled dobijenih rezultata naveden je u sledećoj tabeli u nastavku:

IOTest 3 rastvor za liziranje:

Broj donora = 25				
Pozitivan cilj	Srednja vrednost Δ	Δ % ćelijskih kriterijuma	p-vrednost	REZULTATI
Puna krv obogaćena HPBALL ćelijskom linijom	0,31	<5	0,247	PASS

Sistem za liziranje Versalyse:

Broj donora = 25				
Pozitivan cilj	Srednja vrednost Δ	Δ % ćelijskih kriterijuma	p-vrednost	REZULTATI
Puna krv obogaćena HPBALL ćelijskom linijom	-0,34	<5	0,289	PASS

OGRANIČENJA

1. Protočna citometrija može proizvesti netačne rezultate ako citometar nije pravilno postavljen, ako fluorescentna curenja nisu ispravno kompenzirana ili ako regioni nisu pažljivo postavljeni.
2. Tačni i ponovljivi rezultati će se dobijati sve dok su korišćeni postupci u skladu sa listom sa tehničkim podacima i postupci kompatibilni sa smernicama dobre laboratorijske prakse.
3. 7-AAD, aktivna supstanca u ovom reagensu, je optimizovan tako da ponudi najbolji odnos specifičnog i nespecifičnog signala. Prema tome, važno je u svakom testu koristiti utvrđeni odnos zapremine reagensa i zapremine uzorka.
4. U slučaju hiperleukocitoze, razredite krv u PBS-u kako biste dobili vrednost od približno 5×10^9 leukocita/l.
5. U određenim stanjima bolesti, kao što su teška bubrežna insuficijencija ili hemoglobinopatije, liziranje eritrocita može biti sporo, nepotpuno ili čak nemoguće. U tom slučaju, pre bojenja se preporučuje izoliranje mononuklearnih ćelija upotrebom gradijenta gustine (na primer, ficol).

Za primere i referentne materijale pogledati Dodatak.

ŽIGOVI

Beckman Coulter, stilizovani logotip i Beckman Coulter robni i servisni žigovi koji se navode u ovom dokumentu jesu žigovi ili registrovani žigovi kompanije Beckman Coulter, Inc. u Sjedinjenim Američkim Državama i drugim zemljama.

DODATNE INFORMACIJE

Za pacijenta/korisnika/treću stranu u Evropskoj uniji i zemljama sa identičnim regulatornim režimom (Uredba 2017/746/EU o in vitro dijagnostičkim medicinskim sredstvima); ako je tokom upotrebe ovog uređaja ili kao rezultat njegove upotrebe došlo do ozbiljnog incidenta, prijavite ga proizvođaču i/ili njegovom ovlašćenom predstavniku i svom nacionalnom organu.

ISTORIJA REVIZIJA

REVIZIJA AF:	Datum izdavanja: Oktobar, 2021.
REVIZIJA AW:	Datum izdavanja: april, 2022.
Ažurirano radi usklađenosti sa smernicama za globalno obeležavanje kompanije Beckman Coulter u skladu sa zahtevima IVD-R (EU)2017/746:	
Dodati odeljci	Predviđeni korisnik, koncentracija, preciznost, tačnost, dodatne informacije, istorija revizija
Dodate informacije	Pogledati odeljke Princip
Dopunjeni odeljci	Princip, upozorenje i mere opreza, GHS klasifikacija opasnosti, skladištenje i stabilnost, dokazi pogoršanja, ograničenja, dodatak
Uklonjeni odeljci	Metodologija, primeri kliničke primene, očekivani rezultati, međulaboratorijska reproduktivnost, linearnost
REVIZIJA	Datum izdavanja
AX	Oktobar 2022.
Dopunjeni odeljci	Dodati prevodi
REVIZIJA	Datum izdavanja
AY	
Dopunjeni odeljci	Skladištenje i stabilnost

Ključ za simbole

Rečnik simbola je dostupan na adresi beckman.com/techdocs (broj dokumenta B60062)

	Specifikācijas 7-AAD dzīvotspējas krāsviela
Formulēšana	Šķidrums
Tilpums	3 ml
Kalibrēšana	Gatavs lietošanai
λ ierosme	488 nm
Emisijas maksimālā vērtība	655 nm (komplekss ar divkārtās spirāles DNS)

7-AAD dzīvotspējas krāsviela

REF A07704 150 testi; 3 ml, 20 µl/testā

In vitro diagnostikas lietošanai

PAREDZĒTĀ LIETOŠANA

7-AAD dzīvotspējas krāsviela ir ķīmiska krāsviela šķīdumā, ko paredzēts izmantot viena vai daudzu parametru analīzei, izmantojot plūsmas citometriju. Tā ļauj identificēt dzīvotnespējīgas šūnas un atšķirt tās no (dzīvotspējīgām) šūnām, kuras izmanto cilvēka leikocītu analīzē.

PRINCIPS

7-amino-aktinomicīns D (7-AAD) ir amīnu grupu, kas aizvietota hromofora 7. pozīcijā, saturošs aktinomicīna analogs. 7-AAD ievietojas starp DNS citozīna/guanīna bāzes virsotnēm (1).

DNS dubultās šķiedras krāsošana notiek, inkubējot paraugu ar 7-AAD dzīvotspējas krāsvielu. Pēc tam eritrocīti tiek atdalīti līzēšanas procesā, un leikocīti tiek analizēti, izmantojot plūsmas citometriju.

Izmantojot plūsmas citometriju, dzīvotspējīgu šūnu analīzē poptotiskas nekrotiskas un/vai bojātas šūnas ir traucējumu avots. Dzīvotnespējīgas šūnas var raksturot un identificēt, jo tās ir iekrāsotas ar 7-AAD, bet dzīvās šūnas, saglabājot membrānas integritāti, ir necaurlaidīgas pret 7-AAD, un tās nav iekrāsotas (t. i., tās ir 7-AAD negatīvas). (2).

Plūsmas citometrs analizē gaismas difūziju un šūnu fluorescenci. Tādējādi iespējams atrast šūnas elektroniskajā logā, kas definēts histogrammā, ko veido ortogonālās gaismas difūzijas (sānu izkliedes jeb SS (Side scatter)) korelācija un fluorescence, kas atbilst 7-AAD iekrāsošanai. Atsijāšanas procesā tiek izmantotas arī citas histogrammas, kurās iespējams kombinēt divus dažādus citometrā pieejamos parametrus.

Tiek analizēta atsijāto šūnu fluorescence, lai atšķirtu pozitīvi iekrāsotos (nederīgos) gadījumus no neiekrāsotajiem (derīgajiem). Rezultāti var tikt izteikti kā nefluorescējošu notikumu procentuālais lielums attiecībā pret visiem notikumiem, kas ņemti vērā, veicot atsijāšanu.

PAREDZĒTAIS LIETOTĀJS

Šis produkts ir paredzēts profesionālai lietošanai laboratorijā.

PARAUGI

Venozās asinis jāņem, izmantojot sterilas mēģenes, kurās kā antikoagulants ir izmantots EDTA sāls.

Paraugi ir jāuzglabā istabas temperatūrā (18–25 °C), un tos nedrīkst sakratīt. Pirms testa parauga ņemšanas ir jāveic parauga homogenizācija, viegli saskalinot paraugu.

Paraugu analīze ir jāveic 24 stundu laikā pēc vēnas punkcijas.

BRĪDINĀJUMI UN PIESARDZĪBAS PASĀKUMI

1. Neizmantojiet reaģentu pēc derīguma termiņa beigām.
2. Nedrīkst sasaldēt.
3. Pirms izmantošanas ļaujiet tam sasilt līdz istabas temperatūrai (18–25 °C).
4. Minimizējiet ekspozīciju gaismas iedarbībai.
5. Izvairieties no reaģentu bakteriālas kontaminācijas, jo iespējami viltus rezultāti.
6. Šajā lietošanai gatavajā reaģentā ir 0,005 % (svars/tilpums) 7-AAD un 1 % (tilpums/tilpums) dimetilsulfoksīda (DMSO).

Tīrā veidā 7-AAD ir iespējami kancerogēns, bet DMSO ir kairinošs.

Lai gan šobrīd ļoti atšķaidītā formā, šīs sastāvdaļas var saglabāt visu vai daļu no to kaitīgās ietekmes. Nekādā gadījumā neizmantojiet muti, lai darbotos ar pipeti, un novērsiet jebkādu saskarni ar ādu, glotādu un acīm. Izmantojiet šos reaģentus, ievērojot lietošanas norādījumus (it īpaši par: cimdu, aizsargtērpu un aizsargbrīļu valkāšanu).

7. 7-AAD ir hromofors, kurš noārdās, ja tiek pakļauts gaismas iedarbībai. Pirms lietošanas to uzglabā necaurspīdīgā flakonā, lai pasargātu no gaismas.

Izvairieties no nepārtrauktas gaismas iedarbības inkubācijas stadijās un pēc tam, kad ir veikta krāsošana, samaziniet gaismas iedarbību uz paraugiem.

8. Visi asins paraugi ir jāuzskata par potenciāli infekcioziem, un ar tiem jārikojas, ievērojot piesardzību (respektīvi, jāvalkā aizsargcimdi, aizsargtērpi un brilles).
9. Darbā izmantotās asiņu mēģenes un vienreizlietojamie materiāli ir jāizmet ad hoc konteineros, kas paredzēti sadedzināšanai.

KĪMISKO VIELU KLASIFICĒŠANAS UN MARKĒŠANAS VISPĀRĒJI SASKAŅOTĀS SISTĒMAS BĪSTAMĪBAS KLASIFIKĀCIJA

7-AAD Viability Dye

UZMANĪBU

H316

P332+P313

Izraisa nelielu ādas kairinājumu.

Ja rodas ādas kairinājums: Lūdziet mediķu palīdzību.

Dimetilsulfoksīds 0,5 - 1,5 %



Drošības datu lapa ir pieejama vietnē: beckman.com/techdocs

GLABĀŠANA UN STABILITĀTE

Pirms un pēc flakona atvēršanas 7-AAD dzīvotspējas krāsviela ir jāuzglabā 2–8 °C temperatūrā, kur tai nevar piekļūt gaisma.

Aizvērtā flakona glabāšanas laiks saskaņā ar stabilitātes pētījumu: 730 dienas.

Atvērtā flakona stabilitāte: reaģents ir stabils 60 dienas.

Konkrētai partijai atbilstošo analīzes sertifikātu skatiet vietnē www.beckman.com.

SADALĪŠANĀS PAZĪMES

Jebkuras reaģentu pazīmju izmaiņas var norādīt, ka reaģents sadalās un to nedrīkst izmantot.

Lai iegūtu papildu informāciju vai arī ja saņemtais izstrādājums ir bojāts, zvaniet Beckman Coulter klientu servisam pa tālruni 800-742-2345 (ASV vai Kanāda) vai sazinieties ar vietējo Beckman Coulter pārstāvi.

NEPIECIEŠAMIE MATERIĀLI, KAS NEIETILPST KOMPLEKTĀ

- Paraugu ņemšanai nepieciešamās mēģenes un materiāli.
- Automātiskās pipetes ar vienreizlietojamiem uzgaļiem, paredzētas 20, 100 un 500 µl.
- Plastmasas hemolīzes mēģenes.
- Eritrocītu līzes reaģents. Piemēram: IOTest3 Lysing Solution (REF A07799).
- Buferšķīdums (PBS: 0,01 M nātrija fosfāts; 0,145 M nātrija hlorīds; pH 7,2).
- Centrifugējiet.
- Automātisks maisītājs (samaišīšanas tipa).
- Plūsmas citometrs.

PARAUGU SAGATAVOŠANA

Leikocītu koncentrācijai paraugā ir jābūt mazākai par 10^4 šūnām/µl (10^{10} /l). Ja nepieciešams, atšķaidiet ar PBS, lai balto asinsķermenīšu koncentrācija sasniegtu 5×10^3 šūnas/µl (5×10^9 /l).

Procedūrā izmanto 100 µl parauga, kas ir atšķaidīts mēģenē vai citādi.

NB:

- Fluorescences intensitātes pielāgošanu, kas atbilst 7-AAD, var veikt, izmantojot visu svaigu pilnasins un dzīvotnespējīgu stabilizētu šūnu paraugu iekrāsošanu vienā tajā pašā mēģenē (skatiet attēlu pielikumā). Šādos apstākļos spriegums, kas palīdz noteikt 7-AAD, ir jāpielāgo tā, lai SS histogrammas pirmajā dekadē, atkarībā no 7-AAD, parādītos dzīvotspējīgi notikumi (t. i., svaiga pilnasins) (skat. piemēru pielikumā).
- Neizmantojiet reaģentus, kas procedūras laikā satur iesūcošos vai fiksējošas vielas, lai novērstu artefaktiski pozitīvu iekrāsošanos.

RĪCĪBA

1. Iepildiet 20 µl 7-AAD dzīvotspējas krāsvielas šķīdumu katrā mēģenē.
2. Pievienojiet 100 µl testa parauga (t. i., daudzumu, kas ekvivalents aptuveni 5×10^5 šūnu).
Saudzīgi samaisiet stobriņus.
3. Inkubējiet 15–20 minūtes istabas temperatūrā (18–25 °C), sargājot no gaismas.
4. Pēc tam veiciet eritrocītu lizēšanu, ja nepieciešams, ievērojot izmantotajam lizēšanas reaģentam atbilstošos lietošanas norādījumus.

Piemēram, ja vēlaties izmantot IOTest3 Lysing Solution (Ref. A07799), pievieno 2 ml darba šķīduma (1X), nekavējoties samaisa un 10 minūtes inkubē istabas temperatūrā, pasargājot no gaismas.

Ja paraugs nesatur sarkanos asinsķermenīšus, neveiciet līzes fāzi, bet pievienojiet 0,5–1 ml PBS.

5. Sagataves jāanalizē 1 stundas laikā.

Piezīme. Vienmēr uzglabāji sagataves 2–8 °C temperatūrā, sargājot no gaismas.

VEIKTSPĒJA

SPECIFIKA

Aktinomicīni ir hromofora (2-amino-4,6dimetilfenoksazons-3) un ciklisko pentapeptīdu aktīvās bioloģiskās sastāvdaļas (3). Tās ir baktēriju izcelsmes antibiotikas, kas vēsturiski raksturīgas augsnes askusēnēm. Aktinomicīni veido stabilus kompleksus ar divkāršu šķiedru dezoksiribonukleīnskābi (DNS), bet nesastāda šāda veida kompleksu ne ar divkāršu šķiedru ribonukleīnskābi (RNA), ne ar RNA-DNS hibrīdiem, vai ar vienas šķiedras DNS vai RNA.

7-AAD spektrālās īpašības padara to par savienojumu, kas ir īpaši piemērots plūsmas citometrijas analīzei (3). 7-AAD/DNS kompleksa maksimālā absorbcija ir saderīga ar 488 nm zilo ierosmes viļņa garumu citometriem, kas aprīkoti ar argona lāzeru (4). Maksimālā fluorescences emisija 7-AAD/DNS kompleksa dziļajā sarkanajā joslā (no 635 līdz 675 nm) ļauj optimāli izmantot šo zondi, kad to apvieno ar fluorescēna izotiocianāta konjugētām antivielām (FITC) un ar R fikoeritrīnu (PE) (3). Patiešām, atšķirībā no propīdija jodīda (PI), kas ir vēl viena fluorescējoša zonde, ko izmanto kā DNS marķieri, 7-AAD/DNS kompleksam ir samazināts pārkļāšanās emisijas spektrs ar FITC un PE.

PRECIZITĀTE

Procentuāli pozitīvās vērtības tika noteiktas, izmantojot pilnasinis, kam pievienotas pozitīvas šūnas. Katrs paraugs tika analizēts 4 reizes: divreiz dienā 1 dienu 2 instrumentos, izmantojot 2 partijas — 7-AAD dzīvotspējas krāsvielas reaģentu. Mērījumus (% pozitīvs) veica Navios plūsmas citometrā. Analīzi veica, pamatojoties uz CLSI metodi EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Kvantitatīvo mērīšanas metožu precizitātes veikspējas novērtēšana).

Mūsu pieņemšanas kritēriji ir atkarīgi no katrai populācijai noteikto pozitīvo notikumu skaita.

- Ja pozitīvs notikums < 1500, variācijas koeficients < 15 %
- Ja pozitīvs notikums > 1500, variācijas koeficients < 10 %

IOTest 3 lizēšanas šķīdums:

Pilnasins, kam pievienota HPBALL šūnu līnija							
Pozitīvo notikumu skaits (aritmētiskais vidējais) = 5539							
	Starp operatoriem	Starp citometriem	Partijā	Starp partijām	Starp analizēm	Analīzē	Kopā
Variācijas koeficients (%)	1,48	1,55	4,44	1,41	2,87	3,05	4,91
REZULTĀTI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

VersaLyse lizēšanas sistēma:

Pilnasins, kam pievienota HPBALL šūnu līnija							
Pozitīvo notikumu skaits (aritmētiskais vidējais) = 4034							
	Starp operatoriem	Starp citometriem	Partijā	Starp partijām	Starp analizēm	Analīzē	Kopā
Variācijas koeficients (%)	3,73	1,85	8,74	1,79	3,63	7,02	9,11
REZULTĀTI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

PRECIZITĀTE

7-AAD dzīvotspējas krāsvielas precizitāti novērtēja, pilnasins paraugu kopas, kuriem pievienotas pozitīvas šūnas un kas analizēti NAVIOS citometrā, rezultātus salīdzinot ar atsauces reaģentu kā predikātu. Novirze starp testa un atsauces reaģentu tika noteikta, pamatojoties uz testu rezultātu atšķirību. Ja novirze atbilst pieļaujamajam kļūdas diapazonam vai p vērtība neliecina par nozīmīgu atšķirību (> 0,05), pacienta paraugu testu rezultāti ar abiem reaģentiem uzskatāmi par līdzvērtīgiem.

Iegūtie rezultāti ir apkopoti nākamajā tabulā.

IOTest 3 lizēšanas šķīdums:

Donoru skaits = 25				
Pozitīvais mērķis	Aritmētiskais vidējais Δ	Δ % šūnu kritēriji	p vērtība	REZULTĀTI
Pilnasins, kam pievienota HPBALL šūnu līnija	0,31	<5	0,247	PASS

VersaLyse lizēšanas sistēma:

Donoru skaits = 25				
Pozitīvais mērķis	Aritmētiskais vidējais Δ	Δ % šūnu kritēriji	p vērtība	REZULTĀTI
Pilnasins, kam pievienota HPBALL šūnu līnija	-0,34	<5	0,289	PASS

IEROBEŽOJUMI

1. Ja citometrs nav novietots precīzi līdzeni, ja nav pareizi kompensētas fluorescences noplūdes un ja reģioni nav uzmanīgi novietoti, plūsmas citometrija var radīt viltus rezultātus.
2. Iegūtie rezultāti ir precīzi un reproducējami, ja visas izmantotās procedūras tiek izpildītas atbilstoši tehniskajai lietošanas instrukcijai un ir saskaņā ar labu laboratorijas praksi.
3. 7-AAD, šī reaģenta aktīvā viela, ir optimizēts tā, lai nodrošinātu vislabāko specifiskā signāla/ nespecifiskā signāla attiecību. Tāpēc ir ļoti svarīgi ievērot reaģenta tilpuma/parauga tilpuma attiecību katrā testā.
4. Hiperleikocitozes gadījumā atšķaidiet asinis ar PBS, iegūstot vērtību apmēram 5×10^9 leikocīti/l.
5. Dažos slimību stāvokļos, piemēram, izteiktas nieru mazspējas vai hemoglobīnopātijas gadījumā, sarkano asinsķermenīšu lizēšana var būt lēna, nepilnīga vai pat neiespējama. Šajā gadījumā pirms iekrāsošanas ir ieteicams izolēt mononukleārās šūnas, izmantojot blīvuma gradientu (piemēram, Ficoll).

Pielikumā skatiet piemērus un atsauces.

PREČU ZĪMES

Beckman Coulter, stilizētais logotips un Beckman Coulter preču un pakalpojumu zīmes, kas minētas šeit, ir Beckman Coulter, Inc. preču zīmes vai reģistrētas preču zīmes Amerikas Savienotajās Valstīs un citās valstīs.

PAPILDINFORMĀCIJA

Attiecībā uz pacientiem/lietotājiem/trešajām personām Eiropas Savienībā vai valstīs ar identisku regulatīvo režīmu (Regula (ES) 2017/746 par in vitro diagnostikas medicīniskām ierīcēm); ja ierīces lietošanas laikā vai tās lietošanas rezultātā rodas nopietns negadījums, informējiet par to ražotāju un/vai tā pilnvaroto pārstāvi, kā arī valsts iestādi.

PĀRSKATĪŠANAS VĒSTURE

AF VERSIJA:	Laidiena datums: 2021. gada oktobris
AW VERSIJA:	Izdošanas datums: 2022. gada aprīlis
Atjauninājumi atbilst Beckman Coulter vispārējai marķēšanas politikai un IVD-R (ES)2017/746 prasībām:	
Pievienotas iedaļas	Paredzētais lietotājs, koncentrācija, precizitāte, precizitāte, papildinformācija, pārskatīšanas vēsture
Pievienota informācija	Skatīt sadaļas Principi
Atjauninātās sadaļas	Principi, brīdinājumi un piesardzības pasākumi, GHS bīstamības klasifikācija, glabāšana un stabilitāte, sadalīšanās pazīmes, ierobežojumi, pielikums
Izņemtās iedaļas	Metodoloģija, klīniskā pielietojuma piemēri, paredzētie rezultāti, atkārtamība laboratorijā, linearitāte
PĀRSKATĪJUMS	Laidiena datums
AX	2022. gada oktobris
Atjauninātās sadaļas	Pievienoti tulkojumi
PĀRSKATĪJUMS	Laidiena datums
AY	
Atjauninātās sadaļas	Glabāšana un stabilitāte

Simbolu skaidrojumi

Simbolu glosārijs ir pieejams vietnē beckman.com/techdocs (dokumenta numurs B60062)

	Технічні характеристики барвника життєздатних клітин 7-AAD
Приготування препарату	Рідина
Об'єм	3 мл
Калібрування	Готовий до використання
λ-збудження	488 нм
Пік випромінювання	655 нм (комплекс з дволанцюговою ДНК)

Барвник для визначення життєздатності 7-AAD

REF A07704 150 тестів; 3 мл, 20 мкл/тест

Для діагностики *in vitro*.

ПРИЗНАЧЕННЯ

Барвник життєздатних клітин 7-AAD являє собою хімічний барвник в розчині, який призначений для моно- або мультипараметричного аналізу з використанням проточної цитометрії. Він дозволяє виявляти нежиттєздатні клітини та виключати їх з (життєздатних) досліджуваних клітин для аналізу лейкоцитів людини.

ПРИНЦИП

7-аміно-актиноміцин D (7-AAD) є аналогом актиноміцину, що містить амінну групу, заміщену в положенні 7 хромофору. 7-AAD вставляє себе між вершинами основ цитозину/гуаніну ДНК (1).

Забарвлення подвійного ланцюга ДНК відбувається шляхом інкубування зразка з барвником життєздатних клітин 7-AAD. Еритроцити потім видаляють шляхом лізису, а лейкоцити аналізують методом проточної цитометрії.

Апоптичні некротичні та/або пошкоджені клітини є джерелом інтерференції при аналізі життєздатних клітин методом проточної цитометрії. Нежиттєздатні клітини можуть бути охарактеризовані та ідентифіковані при забарвленні фарбником 7-AAD, тоді як живі клітини, які зберігають свою мембранну цілісність, є непроникні для 7-AAD і не забарвлюються ним (тобто, вони є 7-AAD негативними) (2).

Проточний цитометр аналізує розсіювання світла та флуоресценцію клітин. Це дає можливість розміщати клітини всередині електронного вікна, визначеного на гістограмі, яка співвідносить ортогональне розсіювання світла (бокове розсіювання, або БР) і флуоресценцію, що відповідає забарвленню 7-AAD. На етапі налаштування гейтів також використовуються інші гістограми, що поєднують два різних параметри, вимірювані в цитометрі.

Флуоресценція гейтованих таким чином клітин аналізується, щоб виключити події з позитивно забарвленими (нежиттєздатними) клітинами з незабарвлених (життєздатних). Результати можуть виражатися як відсоток нефлуоресцентних подій відносно всіх подій, які враховуються під час гейтування.

ЦІЛЬОВИЙ КОРИСТУВАЧ

Цей продукт призначений для професійного використання в лабораторії.

ПРОБИ

Венозну кров потрібно брати в стерильні пробірки, що містять ангікоагулянт — сіль ЕДТА.

Зразки слід зберігати при кімнатній температурі (18–25°C), і їх не слід струшувати. Перш ніж узяти досліджуваний зразок, його необхідно гомогенізувати шляхом обережного перемішування.

Проби потрібно проаналізувати не пізніше ніж через 24 години після венепункції.

ПОПЕРЕДЖЕННЯ Й ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.
2. Не заморожуйте.
3. Доведіть до кімнатної температури (18–25°C) перед використанням.
4. Зведіть до мінімуму вплив світла.
5. Уникайте мікробної контамінації реагентів, інакше можуть бути отримані помилкові результати.
6. Цей готовий для використання реагент містить 0,005% (маса/об'єм) 7-AAD і 1% (об'єм/об'єм) диметилсульфоксиду (ДМСО).

7-AAD, у чистому вигляді, є потенційно канцерогенним, а ДМСО є подразником.

Незважаючи на те, що в даній композиції вони дуже сильно розбавлені, їх складова може зберігати весь або частину свого шкідливого впливу. Ніколи не піпетуйте ротом та уникайте потрапляння на шкіру, слизові оболонки та в очі. Використовуйте ці реагенти, дотримуючись запобіжних заходів при використанні (зокрема, використовуючи захисні рукавички, халати й окуляри).

7. 7-AAD — це хромофор, що підлягає деградації під впливом світла. Він зберігається в непрозорому флаконі, який захищає його від світла перед використанням.
- Уникайте постійного впливу світла на стадії інкубації та зменште дію світла на зразки після проведення фарбування.
8. Усі проби крові слід розглядати як потенційно інфекційні та поводитися з ними обережно (зокрема, використовуючи захисні рукавички, халати й окуляри).
9. Пробірки для крові та одноразові матеріали, які використовуються для оброблення, слід викидати в спеціальні контейнери, вміст яких призначений для спалювання.

КЛАСИФІКАЦІЯ НЕБЕЗПЕКИ ЗА СИСТЕМОЮ GHS

7-AAD Viability Dye

ПОПЕРЕДЖЕННЯ

H316

P332+P313

Викликає незначне подразнення шкіри.

У випадку подразнення шкіри: звернутися до лікаря.

Диметилсульфоксид 0,5 - 1,5%



Паспорт безпеки доступний на сайті beckman.com/techdocs

ЗБЕРІГАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ

Барвник життєздатних клітин 7-AAD потрібно зберігати при температурі від 2 до 8°C в захищеному від світла місці, як до, так і після відкриття флакона.

Термін придатності вмісту закритого флакону відповідно до дослідження стабільності: 730 день.

Стабільність після відкриття флакона: реагент стабільний 60 діб.

Див. сертифікат аналізу для серії на вебсайті www.beckman.com.

ОЗНАКИ ПСУВАННЯ

Будь-яка зміна зовнішнього вигляду реагентів може вказувати на псування, і реагент не слід використовувати.

Щоб отримати додаткову інформацію або повідомити про отримання пошкодженого продукту, зателефонуйте до Служби обслуговування клієнтів Beckman Coulter за номером 800-742-2345 (США або Канада) чи зверніться до місцевого представника компанії Beckman Coulter.

ПОТРІБНІ МАТЕРІАЛИ, ЩО НЕ ВХОДЯТЬ У КОМПЛЕКТ

- Пробірки для проб і матеріали, потрібні для забору проб.
- Автоматичні піпетки з одноразовими наконечниками на 20, 100 і 500 мкл.
- Пластикові пробірки для гемолізу.
- Реагент для лізису еритроцитів. тобто: розчин для лізису IOTest3 (Ref. A07799).
- Буфер (забуферений фосфатом фізіологічний розчин, ФСБ: 0,01 моль фосфату натрію; 0,145 моль хлориду натрію; pH 7,2).
- Центрифугування.
- Автоматичний змішувач (типу вортекс).
- Проточний цитометр.

ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Концентрація лейкоцитів в зразку не має перевищувати значення 10^4 клітин/мкл ($10^{10}/л$). За необхідності розведіть зразок за допомогою буферного розчину PBS для доведення концентрації лейкоцитів до значення 5×10^3 клітин/мкл ($5 \times 10^9/л$).

Під час процедури використовується 100 мкл проби, попередньо розведеної в пробірці або іншим способом.

ПРИМІТКА.

- Коригування інтенсивності флуоресценції, що відповідає 7-AAD, можна здійснювати за допомогою фарбування зразка свіжої цільної крові та нежиттєздатних стабілізованих клітин у тій самій пробірці (див. зображення у додатку). У цих умовах напруга, що відповідає виявленню 7-AAD, повинна бути скоригована таким чином, щоб життєздатні події (тобто, свіжа цільна кров) з'являлися у першій декаді гістограми SS залежно від 7-AAD (див. приклад у додатку).
- Не використовуйте реагенти, що містять проникні або фіксуючі агенти під час процедури, щоб запобігти виникненню штучного позитивного забарвлення.

МЕТОДИКА

1. Додайте 20 мкл розчину барвника життєздатних клітин 7-AAD до кожної тестової пробірки.
2. Додайте 100 мкл тестового зразка (тобто, приблизний еквівалент 5×10^5 клітин).
Обережно перемішайте вміст пробірок у вортексі.
3. Витримайте протягом 15–20 хвилин при кімнатній температурі (18–25°C) в захищеному від світла місці.
4. Потім, якщо потрібно, виконайте лізис еритроцитів, дотримуючись рекомендацій щодо реагенту для лізису, який використовується.
тобто, якщо бажаєте використати розчин для лізису IOTest3 (Ref. A07799), додайте 2 мл робочого розчину (1X), негайно перемішайте у вортексі і інкубуйте протягом 10 хвилин при кімнатній температурі в захищеному від світла місці.
Якщо зразок не містить еритроцитів, не виконуйте етап лізису, але додайте 0,5–1 мл ФСБ.
5. Препарати слід аналізувати протягом 1 години.

Примітка. У всіх випадках препарати слід зберігати в захищеному від світла місці при температурі 2–8°C.

ЕФЕКТИВНІСТЬ

СПЕЦИФІЧНІСТЬ

Актиноміцини є активними біологічними складовими хромофору (2-аміно-4,6 диметилфеноксазон-3) та циклічних пентапептидів (3). Вони є антибіотиками бактеріального походження, історично відомими за наявності в ґрунті як аскоміцети. Актиноміцини утворюють стабільні комплекси з дволанцюговою дезоксирибонуклеїновою кислотою (ДНК), але не утворюють цей тип комплексу ні з дволанцюговою рибонуклеїновою кислотою (РНК), ні з гібридами РНК-ДНК, ні з одноланцюговою ДНК або РНК.

Спектральні властивості 7-AAD роблять його сполукою, яка особливо добре підходить для аналізу методом проточної цитометрії (3). Максимальне поглинання комплексу 7-AAD/ДНК сумісно з синьою довжиною хвилі збудження 488 нм для цитометрів, оснащеним аргонним лазером (4). Піковий викид флуоресценції в глибокому червоному діапазоні (635-675 нм) комплексу 7-AAD/ДНК дозволяє оптимально використовувати цей зонд при комбінації з антитілами кон'югованими флуоресцеїну ізотиоціанатом (FITC) і R фікоеритрином (PE) (3). Насправді, на відміну від пропідію йодиду (PI), який є ще одним флуоресцентним зондом, що використовується у якості маркера ДНК, комплекс 7-AAD/ДНК має зменшений спектр випромінювання, який перекривається, з FITC та PE.

ПРЕЦИЗІЙНІСТЬ

Відсоток позитивних значень визначали з використанням цільної крові з додаванням позитивних клітин. Кожну пробу обробляли 4 рази, двічі на добу впродовж 1 доби на 2 приладах, використовуючи 2 партії реагенту барвника для оцінки життєздатності клітин 7-AAD. Вимірювання (% позитивних значень) виконували на проточному цитометрі Navios. Аналіз проводився на основі методу CLSI EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Оцінювання прецизійності кількісних методів вимірювання).

Наші критерії прийнятності залежать від кількості позитивних подій, виміряних для кожної популяції.

- Якщо кількість позитивних подій < 1500, КВ < 15%
- Якщо кількість позитивних подій > 1500, КВ < 10%

Лізуючий розчин IOTest 3:

Цільна кров з додаванням HPBALL клітинної лінії							
Кількість позитивних подій (середнє значення) = 5539							
	Між операторами	Між цитометрами	У межах однієї серії	Між серіями	Між серіями вимірювань	У межах однієї серії вимірювань	Усього
КВ (%)	1,48	1,55	4,44	1,41	2,87	3,05	4,91
РЕЗУЛЬТАТИ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Система для лізису Versalyse:

Цільна кров з додаванням HPBALL клітинної лінії							
Кількість позитивних подій (середнє значення) = 4034							
	Між операторами	Між цитометрами	У межах однієї серії	Між серіями	Між серіями вимірювань	У межах однієї серії вимірювань	Усього
КВ (%)	3,73	1,85	8,74	1,79	3,63	7,02	9,11
РЕЗУЛЬТАТИ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

ТОЧНІСТЬ

Точність барвника для оцінки життєздатності клітин 7-AAD оцінювали шляхом порівняння результатів з еталонним реагентом як контролем якості для набору проб цільної крові з додаванням позитивних клітин, оброблених на цитометрі NAVIOS. Розходження між тестовим та еталонним реагентами визначали на основі різниці між результатами тесту. Якщо зсув знаходиться в межах допустимого діапазону помилок або р-значення вказує на відсутність суттєвої відмінності ($> 0,05$), то результати вимірювань проб пацієнта двома реагентами вважаються еквівалентними.

Отримані результати підсумовано в таблиці, наведеній нижче.

Лізуючий розчин IOTest 3:

Кількість донорів = 25				
Цільова позитивна популяція	Середня Δ	Критерії Δ % клітин	р-значення	РЕЗУЛЬТАТИ
Цільна кров з додаванням HPBALL клітинної лінії	0,31	<5	0,247	PASS

Система для лізису Versalyse:

Кількість донорів = 25				
Цільова позитивна популяція	Середня Δ	Критерії Δ % клітин	р-значення	РЕЗУЛЬТАТИ
Цільна кров з додаванням HPBALL клітинної лінії	-0,34	<5	0,289	PASS

ОБМЕЖЕННЯ

1. Результати проточної цитометрії можуть бути помилковими, якщо вказане нижче не було виконано належним чином: вирівняно цитометр, скомпенсовано витік флуоресценції, здійснено позиціонування ділянок.
2. Буде отримано точні й відтворювані результати, якщо процедури застосовуються відповідно до технічної інструкції, що додається, і стандартів належної лабораторної практики.
3. 7-AAD, діюча речовина в цьому реагенті, була оптимізована таким чином, щоб запропонувати найкращий коефіцієнт специфічних/неспецифічних сигналів. Тому важливо дотримуватися співвідношення об'єму реагенту та об'єму зразка в кожному випробуванні.
4. У разі гіперлейкоцитозу кров слід розводити в розчині ФСБ так, щоб отримати концентрацію приблизно 5×10^9 лейкоцитів/л.
5. При деяких захворюваннях, таких як важка ниркова недостатність або гемоглобінопатії, лізис еритроцитів може бути повільним, неповним або навіть неможливим. У цьому випадку рекомендується виділяти мононуклеарні клітини за градієнтом щільності (з використанням фіколу, тобто) до фарбування.

Див. приклади й посилання в додатку.

ТОРГОВЕЛЬНІ МАРКИ

Beckman Coulter, стилізований логотип, товарні знаки й сервісні марки Beckman Coulter, вказані тут, є торговельними марками або зареєстрованими торговельними марками компанії Beckman Coulter, Inc. у Сполучених Штатах Америки й інших країнах.

ДОДАТКОВА ІНФОРМАЦІЯ

Для пацієнта / користувача / третьої сторони в Європейському Союзі та в країнах з ідентичною системою нормативного регулювання (Регламент 2017/746/ЄС про медичні вироби для діагностики in vitro); якщо під час використання цього пристрою або в результаті його використання стався серйозний інцидент, повідомте про це виробнику й (або) його уповноваженому представнику та місцевому національному органу.

ІСТОРІЯ ЗМІН

РЕДАКЦІЯ AF	Дата випуску: Жовтень 2021 р.
РЕДАКЦІЯ AW	Дата випуску: квітень 2022 р.
Оновлення мають відповідати Глобальній політиці щодо маркування компанії Beckman Coulter і вимогам IVD-R (ЄС)2017/746:	
Додані розділи	Цільовий користувач, Концентрація, Прецизійність, Точність, Додаткова інформація, Історія змін
Додана інформація	Див. розділ «Принцип»

Оновлені розділи	Принцип, Попередження та запобіжні заходи, Класифікація небезпек GHS, Зберігання та стабільність, Ознаки псування, Обмеження, Додаток
Видалені розділи	Методологія, Приклади клінічного застосування, Очікувані результати, Внутрішньолaborаторна відтворюваність, Лінійність

РЕДАКЦІЯ	Дата випуску
AX	Жовтень 2022 р.
Оновлені розділи	Додано переклади

РЕДАКЦІЯ	Дата випуску
AY	
Оновлені розділи	Зберігання й стабільність

Список символів

Глосарій символів доступний на сайті beckman.com/techdocs (документ № B60062)

	Especificações Corante de viabilidade 7-AAD
Formulação	Líquido
Volume	3 mL
Calibração	Pronto para uso
λ de excitação	488 nm
Pico de emissão	655 nm (complexo com DNA de dupla hélice)

Corante 7-AAD para verificação de viabilidade

REF A07704 150 testes; 3 mL, 20 µL/teste

Para uso em diagnóstico *in vitro*

USO PREVISTO

O corante de viabilidade 7-AAD é um agente corante químico em solução, que é projetado para análise mono ou multiparamétrica usando a citometria de fluxo. Ele permite que as células não viáveis sejam identificadas e excluídas das células de interesse (viáveis) na análise de leucócitos humanos.

PRINCÍPIO

A 7-amino-actinomicina D (7-AAD) é um análogo da actinomicina que contém um grupo amino substituído na posição 7 do cromóforo. A 7-AAD insere-se entre os topos das bases de citosina/guanina do DNA (1).

A coloração da dupla hélice de DNA é realizada por meio da incubação da amostra com o corante de viabilidade 7-AAD. Os glóbulos vermelhos são então removidos pela lise e os leucócitos são analisados por citometria de fluxo.

As células necróticas apoptóticas e/ou danificadas são uma fonte de interferência na análise de células viáveis usando citometria de fluxo. As células não viáveis podem ser caracterizadas e identificadas, já que são coradas pela 7-AAD, enquanto as células vivas, que mantêm a integridade de sua membrana, são impermeáveis para a 7-AAD e permanecem não coradas (isto é, elas são negativas para coloração por 7-AAD) (2).

O citômetro de fluxo analisa a difusão da luz e a fluorescência das células. Ele possibilita a localização de células dentro da janela eletrônica definida em um histograma, que correlaciona a difusão ortogonal da luz ("dispersão lateral" ou SS) e a fluorescência correspondente à coloração de 7-AAD. Outros histogramas que combinam dois dos diferentes parâmetros disponíveis no citômetro também são usados na etapa de delimitação.

A fluorescência das células assim delimitadas é analisada para excluir os eventos de coloração positiva (não viáveis) daqueles sem coloração (viáveis). Os resultados podem ser expressos como uma porcentagem dos eventos não fluorescentes em relação a todos os eventos considerados pela delimitação.

USUÁRIO PREVISTO

Este produto destina-se ao uso laboratorial profissional.

AMOSTRAS

Sangue venoso deve ser coletado usando tubos estéreis contendo um sal de EDTA como anticoagulante.

As amostras devem ser mantidas a temperatura ambiente (18–25°C) e não devem ser agitadas. A amostra deve ser homogeneizada por agitação suave antes de retirar a amostra para teste.

As amostras devem ser analisadas no prazo de 24 horas após a coleta.

AVISOS E PRECAUÇÕES

1. Não use o reagente após o prazo de validade.
2. Não congele.
3. Deixe atingir a temperatura ambiente antes de usar (18–25°C).
4. Minimize a exposição à luz.
5. Evite a contaminação microbiana dos reagentes, pois isso pode gerar falsos resultados.
6. Este reagente pronto para o uso contém 0,005% (peso/volume) de 7-AAD e 1% (volume/volume) de dimetilsulfóxido (DMSO).

Na sua forma pura, o 7-AAD é possivelmente carcinogênico e o DMSO é um irritante.

Embora esteja extremamente diluído na presente formulação, esses constituintes podem manter todos ou parte dos seus efeitos nocivos. Nunca coloque a pipeta na boca e evite qualquer contato com a pele, mucosas e olhos. Utilize esses reagentes seguindo as precauções para o uso (especialmente: o uso de luvas, jaleco e óculos de proteção).

7. A 7-AAD é um cromóforo sujeito à degradação por exposição à luz. Ele é armazenado em um frasco opaco para protegê-lo da luz antes do uso.

Evite a exposição contínua à luz durante os estágios de incubação e reduza a exposição à luz das amostras após a coloração ter sido realizada.

8. Todas as amostras de sangue devem ser consideradas como potencialmente infecciosas e devem ser manipuladas com cuidado (em particular: uso de luvas, jalecos e óculos de proteção).
9. Os tubos de sangue e o material descartável utilizado para manuseio deve ser descartado em recipientes ad hoc destinados à incineração.

CLASSIFICAÇÃO DE PERIGO DO GHS

7-AAD Viability Dye

AVISO

H316

P332+P313

Provoca irritação moderada à pele.

Em caso de irritação cutânea: consulte um médico.

Dimetilsulfóxido 0,5 - 1,5%



A Folha de dados de segurança está disponível em beckman.com/techdocs

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

O corante de viabilidade 7-AAD deve ser mantido entre 2 e 8°C e protegido da luz, antes e depois de o frasco ter sido aberto.

Validade do frasco fechado de acordo com o estudo de estabilidade: 730 dias.

Estabilidade do frasco aberto: o reagente é estável por 60 dias.

Consulte o certificado de análise específico do lote em www.beckman.com.

EVIDÊNCIA DE DETERIORAÇÃO

Qualquer alteração no aspecto físico dos reagentes poderá indicar deterioração e o reagente não deverá ser utilizado.

Para obter informações adicionais ou se o produto recebido estiver danificado, entre em contato com o serviço de atendimento ao cliente da Beckman Coulter através do número 800-742-2345 (EUA ou Canadá) ou entre em contato com o representante local da Beckman Coulter.

MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS COM O KIT:

- Tubos de amostra e material necessário para amostragem.
- Pipetas automáticas com pontas descartáveis para 20, 100 e 500 µL.
- Tubos plásticos de hemólise.
- Reagente de lise de glóbulos vermelhos. Por exemplo: Solução de lise IOTest3 (Ref. A07799).
- Tampão (PBS: fosfato de sódio a 0,01 M; cloreto de sódio a 0,145 M; pH 7,2).
- Centrífuga.
- Agitador automático (tipo vórtex).
- Citômetro de fluxo.

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

A concentração de leucócitos na amostra deve ser inferior a 10^4 células/µL (10^{10} /L). Se necessário, dilua em PBS para obter uma concentração de leucócitos de 5×10^3 células/µL (5×10^9 /L).

O procedimento utiliza 100 µL de uma amostra pré-diluída em tubo ou não.

NB:

- O ajuste da intensidade da fluorescência correspondente à 7-AAD pode ser realizado usando a coloração de uma amostra de sangue total fresco e de células estabilizadas não viáveis no mesmo tubo (consulte a imagem no anexo). Sob essas condições, a voltagem correspondente à detecção da 7-AAD deve ser ajustada de modo que os eventos viáveis (isto é, sangue total fresco) apareçam na primeira década de um histograma de SS, dependendo da 7-AAD (consulte o exemplo no anexo).
- Para evitar a coloração artificialmente positiva, não use reagentes que contenham agentes de permeação ou de fixação durante o procedimento.

PROCEDIMENTO

1. Adicione 20 µL da solução de corante de viabilidade 7-AAD em cada tubo de teste.
2. Adicione 100 µL da amostra de teste (isto é, o equivalente a aproximadamente 5×10^5 células).
Agite os tubos cuidadosamente em vórtex.

- Incube por 15 a 20 minutos em temperatura ambiente (18–25°C), protegido da luz.
- Em seguida, execute a lise das hemácias, se necessário, seguindo as recomendações do reagente de lise utilizado.
Por exemplo, se desejar usar a solução de lise IOTest3 (Ref. A07799), adicione 2 mL da solução de trabalho (1X), agite em vórtex imediatamente e incube durante 10 minutos em temperatura ambiente, protegida da luz.
Se a amostra não contiver glóbulos vermelhos, não realize o estágio de lise, mas adicione 0,5 a 1 mL de PBS.
- As preparações devem ser analisadas em um prazo de até 1 hora.

Nota: Em qualquer dos casos, mantenha as preparações entre 2 e 8°C e protegidas da luz.

DESEMPENHO

ESPECIFICIDADE

As actinomicinas são os constituintes biologicamente ativos formados por um cromóforo (2-amino-4,6-dimetilfenoxazona-3) e por pentapeptídeos cíclicos (3). Elas são antibióticos de origem bacteriana, caracterizadas tradicionalmente em ascomicetos do solo. As actinomicinas formam complexos estáveis com o ácido desoxirribonucleico de dupla hélice (DNA), mas não formam esse tipo de complexo com o ácido ribonucleico de dupla hélice (RNA) nem com os híbridos RNA-DNA ou com DNA ou RNA de hélice simples.

As propriedades espectrais da 7-AAD a tornam um composto que é particularmente adequado para a análise por citometria de fluxo (3). A absorção máxima do complexo 7-AAD/DNA é compatível com o comprimento de onda de excitação azul de 488 nm para citômetros equipados com um laser de argônio (4). A emissão máxima de fluorescência na banda do vermelho profundo (635 a 675 nm) do complexo 7-AAD/DNA permite o uso ideal desta sonda quando ela é combinada com anticorpos conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e com R-ficoeritrina (FE) (3). Na verdade, ao contrário do iodeto de propídio (IP), que é outra sonda fluorescente usada como um marcador de DNA, o complexo 7-AAD/DNA tem um espectro de emissão com sobreposição reduzida com o FITC e a FE.

PRECISÃO

Os valores percentuais positivos foram determinados usando-se sangue total enriquecido com células positivas. Cada amostra foi processada 4 vezes, duas vezes por dia durante 1 dia em 2 instrumentos, usando 2 lotes do reagente de corante de viabilidade 7-AAD. As medições (% de positivos) foram realizadas no citômetro de fluxo Navios. A análise foi realizada com base no método EP5-A2 do CLSI: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Avaliação de desempenho de precisão de métodos de medição quantitativos).

Nossos critérios de aceitação dependem do número de eventos positivos medidos para cada população:

- Se eventos positivos <1.500, CV <15%
- Se eventos positivos >1.500, CV <10%

Solução de lise IOTest 3:

Sangue total enriquecido com a linhagem celular HPBALL							
Número de eventos positivos (média) = 5539							
	Entre operadores	Entre citômetros	Dentro do lote	Entre lotes	Entre processamentos	Dentro do processamento	Total
CV (%)	1,48	1,55	4,44	1,41	2,87	3,05	4,91
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Sistema de lise VersaLyse:

Sangue total enriquecido com a linhagem celular HPBALL							
Número de eventos positivos (média) = 4034							
	Entre operadores	Entre citômetros	Dentro do lote	Entre lotes	Entre processamentos	Dentro do processamento	Total
CV (%)	3,73	1,85	8,74	1,79	3,63	7,02	9,11
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

EXATIDÃO

A exatidão do corante de viabilidade 7-AAD foi avaliada comparando-se os resultados com um reagente de referência como o predicado em um conjunto de amostras de sangue total enriquecidas com células positivas processadas em um citômetro NAVIOS. O viés entre o reagente de teste e o de referência foi determinado com base na diferença entre os resultados dos testes. Se o viés estiver dentro da faixa de erro aceitável ou o valor p não indicar diferenças significativas (>0,05), então os resultados dos testes das amostras de pacientes para os dois reagentes são considerados equivalentes.

Os resultados obtidos estão resumidos na tabela a seguir:

Solução de lise IOTest 3:

Número de doadores = 25				
Alvo positivo	Δ média	Crítérios de Δ % de células	valor p	RESULTADOS
Sangue total enriquecido com a linhagem celular HPBALL	0,31	<5	0,247	PASS

Sistema de lise VersaLyse:

Número de doadores = 25				
Alvo positivo	Δ média	Crítérios de Δ % de células	valor p	RESULTADOS
Sangue total enriquecido com a linhagem celular HPBALL	-0,34	<5	0,289	PASS

LIMITAÇÕES

1. A citometria de fluxo pode produzir resultados falsos se o citômetro não for alinhado perfeitamente, se os vazamentos de fluorescência não forem corretamente compensados e se as regiões não forem cuidadosamente posicionadas.
2. Serão obtidos resultados exatos e reproduzíveis desde que os procedimentos utilizados estejam em conformidade com o folheto técnico e sejam compatíveis com as boas práticas de laboratório.
3. A 7-AAD, a substância ativa neste reagente, foi otimizada para oferecer a melhor razão sinal específico/não específico. Por isso, é importante manter a razão entre volume do reagente e volume da amostra em cada teste.
4. No caso de uma hiperleucocitose, dilua o sangue em PBS de modo a obter um valor de aproximadamente 5×10^9 leucócitos/L.
5. Em alguns estados de doença, tais como insuficiência renal grave ou hemoglobinopatias, a lise dos glóbulos vermelhos pode ser lenta, incompleta ou até mesmo impossível. Nesse caso, recomenda-se isolar os glóbulos mononucleados utilizando um gradiente de densidade (por exemplo, Ficoll) antes da coloração.

Consulte o anexo para obter exemplos e referências.

MARCAS COMERCIAIS

Beckman Coulter, o logotipo estilizado e as marcas dos produtos e serviços da Beckman Coulter mencionados neste documento são marcas comerciais ou marcas comerciais registradas da Beckman Coulter, Inc. nos Estados Unidos e em outros países.

INFORMAÇÕES ADICIONAIS

Para um paciente/usuário/terceiro na União Europeia e em países com regime regulatório idêntico (Regulamentação 2017/746/UE sobre In vitro Diagnostic Medical Devices [Dispositivos médicos de diagnóstico in vitro]), se, durante o uso deste dispositivo ou como resultado de seu uso, ocorrer um incidente grave, relate-o ao fabricante e/ou ao seu representante autorizado e à sua autoridade nacional.

HISTÓRICO DE REVISÃO

REVISÃO AF:	Data de publicação: outubro de 2021
REVISÃO AW:	Data de publicação: abril de 2022
Atualizações para o cumprimento da Global labelling Policy (Política de rotulagem global) da Beckman Coulter e de acordo com os requisitos da IVD-R (UE)2017/746:	
Seções adicionadas	Usuário pretendido, Concentração, Precisão, Exatidão, Informações adicionais, Histórico de revisão
Informações adicionadas	Consulte a seção Princípio
Seções atualizadas	Princípio, Avisos e precauções, Classificação de perigo do SGH, Armazenamento e estabilidade, Evidência de deterioração, Limitações, Anexo
Seções removidas	Metodologia, Exemplos de aplicação clínica, Resultados esperados, Reprodutibilidade intralaboratorial, Linearidade
REVISÃO	Data de publicação
AX	Outubro de 2022
Seções atualizadas	Foram adicionadas traduções
REVISÃO	Data de publicação
AY	
Seções atualizadas	Armazenamento e estabilidade

Legenda dos símbolos

O Glossário de símbolos está disponível em beckman.com/techdocs (documento número B60062)

	Specificaties 7-AAD-levensvatbaarheidskleurstof
Samenstelling	Vloeibaar
Volume	3 mL
Kalibratie	Klaar voor gebruik
λ excitatie	488 nM
Emissiepiek	655 nm (complex met dubbelstrengs DNA)

7-AAD levensvatbaarheidskleurstof

REF A07704 150 tests; 3 mL, 20 μ L/test

Voor *in vitro* diagnostisch gebruik

BEOOGD GEBRUIK

7-AAD-levensvatbaarheidskleurstof is een chemische kleurstof in oplossing, die is ontworpen voor mono- of multiparametrische analyse met behulp van flowcytometrie. Het maakt het mogelijk niet-levensvatbare cellen te identificeren en uit te sluiten van (levensvatbare) cellen die van belang zijn voor de analyse van menselijke leukocyten.

PRINCIPE

7-amino-actinomycine D (7-AAD) is een analoog van actinomycine dat een aminogroep bevat die gesubstitueerd is op positie 7 van de chromofoor. 7-AAD voegt zich tussen de toppen van de cytosine/guanine-basen in DNA (1).

Kleuring van de dubbele streng DNA double strand wordt uitgevoerd door het monster te incuberen met de 7-AAD-levensvatbaarheidskleurstof. De rode cellen worden vervolgens door middel van lysis verwijderd en de leukocyten worden geanalyseerd met behulp van flowcytometrie.

Apoptotische necrotische en/of beschadigde cellen zijn een bron van interferentie bij de analyse van levensvatbare cellen met behulp van flowcytometrie. Niet-levensvatbare cellen kunnen worden gekarakteriseerd en geïdentificeerd omdat ze gekleurd zijn met 7-AAD, terwijl levende cellen met behoud van hun membraanintegriteit ondoordringbaar zijn voor 7-AAD en ongekleurd zijn (d.w.z. ze zijn 7-AAD negatief) (2).

De flowcytometer analyseert de lichtdiffusie en de fluorescentie van cellen. Dit maakt het mogelijk cellen te lokaliseren binnen het elektronische venster gedefinieerd op een histogram, wat de orthogonale verspreiding van licht (zijwaartse verstrooiing of ZV) in verband brengt met de fluorescentie die overeenkomt met de 7-AAD-kleuring. In de gatingfase worden ook andere histogrammen gebruikt die twee van de beschikbare parameters op de cytometer combineren.

De fluorescentie van de cellen met deze gating wordt geanalyseerd om de positief gekleurde gebeurtenissen (niet-levensvatbaar) uit te sluiten van de ongekleurde (levensvatbaar). De resultaten kunnen worden uitgedrukt als een percentage van niet-fluorescente gebeurtenissen ten opzichte van alle gebeurtenissen inbegrepen door de gating.

BEOOGDE GEBRUIKER

Dit product is bedoeld voor professioneel gebruik in het laboratorium.

MONSTERS

Veneus bloed moet worden afgenomen met steriele buisjes die EDTA-zout bevatten als anticoagulans.

De monsters moeten op kamertemperatuur (18-25 °C) worden gehouden en mogen niet worden geschud. Het monster moet gehomogeniseerd worden door licht te schudden voordat het testmonster wordt afgenomen.

De monsters moeten worden geanalyseerd binnen 24 uur van venapunctie.

WAARSCHUWINGEN EN VOORZORGSMAATREGELEN

1. Gebruik het reagens niet na de uiterste houdbaarheidsdatum.
2. Niet invriezen.
3. Laat het op kamertemperatuur (18-25 °C) komen voor gebruik.
4. Beperk de blootstelling aan licht.
5. Vermijd microbiële verontreiniging van de reagentia, anders kunnen verkeerde resultaten optreden.
6. Dit gebruiksklare reagens bevat 0,005% (gewicht/volume) 7-AAD en 1% (volume/volume) dimethylsulfoxide (DMSO).

In zuivere vorm is 7-AAD potentieel kankerverwekkend en is DMSO irriterend.

Hoewel extreem verdund in de huidige formulering, kunnen deze bestanddelen hun schadelijke effecten geheel of gedeeltelijk behouden. Pipetteer nooit met de mond en vermijd elk contact met de huid, slijmvlies en ogen. Gebruik deze reagentia in navolging van de voorzorgsmaatregelen voor gebruik (in het bijzonder: het dragen van handschoenen, jas en veiligheidsbril).

7. 7-AAD is een chromofoor, waarvan de kwaliteit verslechtert bij blootstelling aan licht. Het wordt vóór gebruik in een ondoorzichtig buisje bewaard om het tegen licht te beschermen.
Vermijd continue blootstelling aan licht tijdens de incubatiefasen en verminder de blootstelling aan licht van de monsters nadat ze zijn gekleurd.
8. Alle bloedmonsters moeten worden beschouwd als mogelijk besmettelijk en moeten voorzichtig worden gehanteerd (met name: veiligheidshandschoenen, -jas en -bril dragen).
9. Bloedbuisjes en wegwerpmateriaal die gebruikt zijn, moeten verwijderd worden in afvalcontainers bestemd voor verbranding.

GHS GEVARENCLASSIFICATIE

7-AAD Viability Dye

WAARSCHUWING

H316

P332+P313

Veroorzaakt lichte huidirritatie.

Bij huidirritatie: een arts raadplegen.

Dimethylzwaveloxide 0,5 - 1,5%



Het veiligheidsinformatieblad is beschikbaar op beckman.com/techdocs

OPSLAG EN STABILITEIT

De 7-AAD-levensvatbaarheidskleurstof moet tussen 2 en 8 °C en beschermd tegen licht worden bewaard, voor- en nadat het buisje wordt geopend.

Houdbaarheidsdatum van ongeopend buisje volgens stabiliteitsstudie: 730 dagen.

Stabiliteit van geopend buisje: het reagens is stabiel gedurende 60 dagen.

Zie batch-specifiek analysecertificaat op www.beckman.com.

BEWIJS VAN BEDERF

Elke wijziging in de fysieke verschijning van de reagentia kan wijzen op aantasting; het reagens mag dan niet langer gebruikt worden.

Bel voor meer informatie, of als het product beschadigd is, met de klantenservice van Beckman Coulter op 800-742-2345 (VS of Canada) of neem contact op met uw plaatselijke vertegenwoordiger van Beckman Coulter.

BENODIGD MATERIAAL DAT NIET IS MEEGELEVERD IN DE KIT:

- Monsterbuisjes en materiaal vereist voor monsterneming.
- Automatische pipetten met wegwerptips voor 20, 100 en 500 µL.
- Plastic hemolysebuisjes.
- Ontbindingsreagens voor rode bloedcellen. Bijvoorbeeld: IOTest3-ontbindingsoplossing (ref. A07799).
- Buffer (PBS: 0,01 M natriumfosfaat; 0,145 M natriumchloride; pH 7,2).
- Centrifugeer.
- Automatische schudder (vortextype).
- Flowcytometer.

BEREIDING VAN DE MONSTERS

De concentratie aan leukocyten in het monster moet minder dan 10^4 cellen/µL (10^{10} /L) bedragen. Indien nodig verdunnen in PBS om de leukocytenconcentratie op 5×10^3 cellen/µL (5×10^9 /L) te brengen.

De procedure maakt gebruik van 100 µL monster, ongeacht of het buisje is voorverdund.

NB:

- De intensiteit van de fluorescentie die overeenkomt met 7-AAD kan worden aangepast door middel van het kleuren van een monster van vers bloed en van niet-levensvatbare gestabiliseerde cellen in dezelfde buis (zie afbeelding in bijlage). Onder deze omstandigheden moet de spanning die overeenkomt met de detectie van 7-AAD zodanig worden aangepast dat levensvatbare gebeurtenissen (d.w.z. volledig vers bloed) op het eerste decennium van een ZV-histogram verschijnen, afhankelijk van het 7-AAD (zie voorbeeld in de bijlage).
- Gebruik tijdens de procedure geen reagentia die doordringende of fixerende middelen bevatten om kunstmatige positieve kleuring te voorkomen.

PROCEDURE

1. Voeg 20 µL van de 7-AAD-levensvatbaarheidskleurstofoplossing toe aan elke reageerbuis.
2. Voeg 100 µL van het testmonster toe (d.w.z. het equivalent van ongeveer 5×10^5 cellen).

Wervel de buisjes voorzichtig.

- Incubeer 15 tot 20 minuten op kamertemperatuur (18-25 °C), beschermd tegen licht.
- Lyseer vervolgens de rode cellen, indien nodig, door de aanbevelingen bij het gebruikte ontbindingsreagens op te volgen.
Als u bijvoorbeeld de IOTest3-ontbindingsoplossing (ref. A07799) wil gebruiken, voeg dan 2 mL van de werkoplossing (1X) toe, wervel onmiddellijk en incubeer 10 minuten bij kamertemperatuur, beschermd tegen licht.
Als het monsters geen rode cellen bevat, voert u de lysis niet uit, maar voegt u 0,5 tot 1 mL PBS toe.
- De bereidingen moeten binnen 1 uur worden geanalyseerd.

Opmerking: houd de bereidingen in alle gevallen tussen 2 en 8 °C en beschermd tegen licht.

PRESTATIES

SPECIFICITEIT

Actinomycines zijn de actieve biologische bestanddelen van een chromofoor (2-amino-4,6-dimethylfenoxazon-3) en van cyclische pentapeptiden (3). Het zijn antibiotica van bacteriële oorsprong die historisch gekarakteriseerd worden in bodem-ascomyceten. De actinomycines vormen stabiele complexen met dubbelstrengs deoxyribonucleïnezuur (DNA), maar vormen dit type complex niet met dubbelstrengs ribonucleïnezuur (RNA) of met RNA-DNA-hybriden, of met eenstrengs DNA of RNA.

De spectrale eigenschappen van 7-AAD maken het een verbinding die bijzonder geschikt is voor flowcytometrie-analyse (3). De maximale absorptie van het 7-AAD/DNA-complex is compatibel met de blauwe excitatiegolflengte van 488 nm voor cytometers met een argonlaser (4). De maximale fluorescentie-emissie in de dieprode band (635 tot 675 nm) van het 7-AAD/DNA-complex maakt een optimaal gebruik van deze sonde mogelijk wanneer deze wordt gecombineerd met geconjugeerde fluoresceïne-isothiocyanaatantilichamen (FITC) en met R-fycoerytrine (PE) (3). In tegenstelling tot propidiumjodide (PI), een andere fluorescerende sonde die als DNA-marker wordt gebruikt, heeft het 7-AAD/DNA-complex namelijk een verminderd overlappend emissiespectrum met FITC en PE.

PRECISIE

Het percentage positieve waarden werd bepaald met behulp van volbloed verrijkt met positieve cellen. Elk monster werd 4 maal getest, tweemaal per dag gedurende 1 dag op 2 instrumenten, waarbij gebruik werd gemaakt van 2 batches reagens met 7-AAD-levensvatbaarheidskleurstof. Metingen (% positief) werden uitgevoerd op de Navios-flowcytometer. Analyse werd uitgevoerd op basis van de CLSI-methode EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Evaluatie van de precisie van kwantitatieve meetmethoden).

Onze acceptatiecriteria zijn afhankelijk van het aantal positieve gebeurtenissen dat voor elke populatie wordt gemeten:

- In het geval van een positieve gebeurtenis <1500, VC <15%
- In het geval van een positieve gebeurtenis >1500, VC <10%

IOTest 3-lyseeroplossing:

Volbloed verrijkt met HPBALL cellijn							
Aantal positieve gebeurtenissen (gemiddelde) = 5539							
	Tussen gebruikers	Tussen cytometers	Van dezelfde batch	Tussen batches	Tussen runs	Tijdens run	Totaal
VC (%)	1,48	1,55	4,44	1,41	2,87	3,05	4,91
RESULTATEN	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Versalyse-lyseersysteem:

Volbloed verrijkt met HPBALL cellijn							
Aantal positieve gebeurtenissen (gemiddelde) = 4034							
	Tussen gebruikers	Tussen cytometers	Van dezelfde batch	Tussen batches	Tussen runs	Tijdens run	Totaal
VC (%)	3,73	1,85	8,74	1,79	3,63	7,02	9,11
RESULTATEN	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

NAUWKEURIGHEID

De nauwkeurigheid van 7-AAD-levensvatbaarheidskleurstof werd beoordeeld door de resultaten bij een reeks volbloedmonsters verrijkt met positieve cellen die op een NAVIOS-cytometer werden gemeten, te vergelijken met een referentiereagens als vergelijkingsmateriaal. De afwijking tussen test- en referentiereagens werd bepaald op basis van het verschil tussen de testresultaten. Als de afwijking binnen het toegestane foutbereik ligt of de p-waarde geen significant verschil (>0,05) aangeeft, worden de testresultaten van de patiëntmonsters van de twee reagentia als gelijkwaardig beschouwd.

De resultaten worden samengevat in de onderstaande tabel:

IOTest 3-lyseeroplossing:

Aantal donoren = 25				
Positieve target	Gemiddelde Δ	Δ % Celcriteria	p-waarde	RESULTATEN
Volbloed verrijkt met HPBALL cellijn	0,31	<5	0,247	PASS

Versalyse-lyseersysteem:

Aantal donoren = 25				
Positieve target	Gemiddelde Δ	Δ % Celcriteria	p-waarde	RESULTATEN
Volbloed verrijkt met HPBALL cellijn	-0,34	<5	0,289	PASS

BEPERKINGEN

1. Flowcytometrie kan leiden tot verkeerde resultaten indien de cytometer niet perfect is uitgelijnd, indien fluorescentielekken niet juist zijn gecompenseerd en indien de gebieden niet zorgvuldig zijn gepositioneerd.
2. Nauwkeurige en reproduceerbare resultaten worden verkregen zolang de gebruikte procedures in overeenstemming zijn met de technische brochure en compatibel met goede laboratoriumpraktijken.
3. 7-AAD, de actieve stof in dit reagens, is geoptimaliseerd om de beste verhouding tussen specifiek en niet-specifiek signaal te bieden. Daarom is het belangrijk dat de verhouding van reagensvolume/monstervolume in acht wordt genomen bij elke test.
4. In het geval van een hyperleukocytose verdunt u het bloed in PBS om een waarde van ongeveer 5×10^9 leukocyten/L te verkrijgen.
5. In sommige stadia van een aandoening, zoals ernstig nierfalen of hemoglobinoopathiën, kan de ontbinding van rode cellen traag verlopen, onvolledig of zelfs onmogelijk zijn. In dit geval wordt het geadviseerd om cellen met één kern te isoleren met een dichtheidsgradiënt (bijvoorbeeld Ficoll) voorafgaand aan de kleuring.

Zie de bijlage voor voorbeelden en referenties.

Handelsmerken

Beckman Coulter, het gestileerde logo en de merken van Beckman Coulter-producten en -services in dit document zijn handelsmerken of gedeponeerde handelsmerken van Beckman Coulter, Inc. in de Verenigde Staten en andere landen.

AANVULLENDE INFORMATIE

Voor patiënten/gebruikers/derden in de EU en in landen met soortgelijke regelgeving (Verordening 2017/746/EU inzake in-vitro diagnostische medische apparaten); als er zich tijdens of als gevolg van het gebruik van dit apparaat een ernstig incident voordoet, dient u dit te melden bij de fabrikant en/of diens bevoegde vertegenwoordiger en bij uw nationale autoriteiten.

REVISIEGESCHIEDENIS

REVISIE AF:	Uitgiftedatum: oktober 2021
REVISIE AW:	Uitgiftedatum : April 2022
Bijgewerkt om te voldoen aan het wereldwijde etiketteringsbeleid van Beckman Coulter en volgens de vereisten van IVD-R (EU)2017/746:	
Toegevoegde paragrafen	Beeoogde gebruiker, Concentratie, Precisie, Nauwkeurigheid, Aanvullende informatie, Revisiegeschiedenis
Toegevoegde informatie	Zie paragrafen Principe
Bijgewerkte paragrafen	Principe, Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen, GHS-gevaarclassificatie, Opslag en stabiliteit, Bewijs van bederf, Beperkingen, Bijlage
Verwijderde paragrafen	Methodologie, Voorbeelden van klinische toepassingen, Verwachte resultaten, Intra-lab reproduceerbaarheid, Lineariteit
HERZIENING	Uitgiftedatum
AX	Oktober 2022
Bijgewerkte paragrafen	Vertalingen toegevoegd
HERZIENING	Uitgiftedatum
AY	
Bijgewerkte paragrafen	Opslag en stabiliteit

Verklaring van symbolen

Overzicht met verklaring van symbolen is beschikbaar op beckman.com/techdocs (documentnummer B60062)

	Độ đặc hiệu Thuốc nhuộm đánh giá tỷ lệ sống 7-AAD
Công thức	Lỏng
Thể tích	3 mL
Hiệu chuẩn	Có thể dùng ngay
Kích thích λ	488 nm
Đỉnh phát xạ	655 nm (phức hợp có DNA mạch kép)

Thuốc nhuộm đánh giá tỷ lệ sống 7-AAD

REF A07704 150 xét nghiệm; 3 mL,
20 µL/xét nghiệm

Dùng để chẩn đoán *In Vitro*

MỤC ĐÍCH SỬ DỤNG

Thuốc nhuộm đánh giá tỷ lệ sống 7-AAD là chất tạo màu hóa học trong dung dịch, được thiết kế để phân tích đơn thông số hoặc đa thông số bằng phương pháp đếm tế bào dòng chảy. Thuốc nhuộm này cho phép xác định các tế bào không sống được và cần loại trừ khỏi các tế bào (có thể sống được) liên quan đến việc phân tích bạch cầu ở người.

NGUYÊN TẮC

7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) là chất tương tự của Actinomycin chứa nhóm amin được thay thế ở vị trí 7 của chất mang màu. 7-AAD tự chèn vào giữa đỉnh của các bazơ Cytosine/Guanine của DNA (1).

Nhuộm sợi kép DNA được thực hiện bằng cách ủ mẫu với thuốc nhuộm đánh giá tỷ lệ sống 7-AAD. Sau đó, các tế bào hồng cầu bị loại bỏ bằng cách ly giải và các tế bào bạch cầu sẽ được phân tích bằng phương pháp đếm tế bào dòng chảy.

Tế bào chết, tế bào hoại tử và/hoặc tế bào bị tổn thương là những nguồn gây ảnh hưởng đến việc phân tích tế bào sống bằng phương pháp đếm tế bào dòng chảy. Các tế bào không sống được có thể được xác định và biểu thị đặc trưng vì các tế bào này được nhuộm bằng 7-AAD, trong khi các tế bào sống, giữ được tính toàn vẹn của màng, không thấm nước với 7-AAD và không bị ố (tức là những tế bào này âm tính với 7-AAD) (2).

Máy đếm tế bào dòng chảy sẽ phân tích mức khuếch tán ánh sáng và phát huỳnh quang của các tế bào. Quy trình này giúp xác định nơi khu trú của tế bào trong cửa sổ điện tử trên biểu đồ, tương quan với sự khuếch tán trực giao ánh sáng (Tán xạ góc bên hay SS) với huỳnh quang tương ứng với thuốc nhuộm 7-AAD. Các biểu đồ khác kết hợp hai trong các thông số khác nhau có sẵn trên máy đếm tế bào cũng được sử dụng trong giai đoạn khoanh vùng.

Huỳnh quang của các tế bào đã phân định được phân tích để phân biệt các biến cố nhuộm dương tính (không sống được) với các biến cố không nhuộm (có thể sống được). Kết quả được biểu thị bằng tỷ lệ phần trăm số biến cố không có huỳnh quang so với tất cả các biến cố tính đến việc khoanh vùng.

ĐỐI TƯỢNG NGƯỜI DÙNG

Sản phẩm này chỉ dùng cho mục đích chuyên môn trong phòng xét nghiệm.

MẪU

Phải lấy mẫu máu tĩnh mạch vào ống vô trùng sử dụng chất kháng đông bằng muối EDTA.

Phải bảo quản mẫu ở nhiệt độ phòng (18–25°C) và không lắc mẫu. Phải khuấy nhẹ mẫu trước khi lấy mẫu xét nghiệm để mẫu có trạng thái đồng nhất.

Phải phân tích các mẫu trong vòng 24 giờ sau khi lấy từ tĩnh mạch.

CẢNH BÁO VÀ BIỆN PHÁP PHÒNG NGỪA

1. Không dùng thuốc thử đã hết hạn sử dụng.
2. Không làm đông lạnh.
3. Để dung dịch trong nhiệt độ phòng (18–25°C) trước khi sử dụng.
4. Giảm thiểu tiếp xúc với ánh sáng.
5. Tránh làm thuốc thử bị nhiễm khuẩn, nếu không, có thể dẫn đến kết quả sai.
6. Thuốc thử có thể dùng ngay này chứa 0,005% (khối lượng/thể tích) 7-AAD và 1% (thể tích/thể tích) Dimethyl Sulfoxit (DMSO).

Ở dạng tinh khiết, 7-AAD có khả năng gây ung thư và DMSO là chất gây kích ứng.

Mặc dù được pha rất loãng trong công thức, các thành phần này có thể giữ lại tất cả hoặc một phần các tác hại của mình. Tuyệt đối không dùng pipet bằng miệng và tránh mọi tiếp xúc với da, niêm mạc và mắt. Sử dụng các thuốc thử này theo các biện pháp phòng ngừa sau đây (chú ý: đeo găng tay, mặc áo choàng và đeo kính bảo hộ).


7. 7-AAD là một chất mang màu bị thoái hóa do tiếp xúc với ánh sáng. Chất này được lưu trữ trong một lọ thủy tinh mờ để tránh tiếp xúc với ánh sáng trước khi sử dụng.
Tránh để mẫu tiếp xúc liên tục với ánh sáng trong giai đoạn ủ và giảm tiếp xúc với ánh sáng sau khi thực hiện nhuộm.
8. Phải coi tất cả mẫu máu là có nguy cơ lây nhiễm và xử lý cẩn thận (cụ thể: đeo găng tay, mặc áo choàng và đeo kính bảo vệ).
9. Phải bỏ ống máu và vật liệu dùng một lần đã dùng để xử lý trong thùng chứa đặc biệt cho mục đích tiêu hủy.

PHÂN LOẠI MỐI NGUY HIỂM THEO GHS

Thuốc nhuộm đánh giá tỷ lệ sống 7-AAD CẢNH BÁO

H316
P332+P313

Gây kích ứng da nhẹ.
Nếu kích ứng da xảy ra: Tìm tư vấn/chăm sóc y tế.
Dimethyl sunfoxit 0,5 - 1,5%

 Bảng dữ liệu an toàn có sẵn tại beckman.com/techdocs

BẢO QUẢN VÀ ĐỘ ỔN ĐỊNH

Phải bảo quản Thuốc nhuộm đánh giá tỷ lệ sống 7-AAD ở 2 đến 8°C và tránh ánh sáng, trước và sau khi mở lọ.

Hạn sử dụng của ống khi chưa mở nắp theo nghiên cứu về độ ổn định: 730 ngày.

Độ ổn định của ống đã mở: thuốc thử ổn định trong 60 ngày.

Xem Giấy chứng nhận phân tích theo lô cụ thể tại www.beckman.com.

BẢNG CHỨNG BIẾN CHẤT

Mọi sự biến đổi về vẻ ngoài của thuốc thử có thể là dấu hiệu suy giảm chất lượng và bạn không nên dùng thuốc thử đó.

Để biết thêm thông tin hoặc nếu bạn nhận được sản phẩm bị hỏng, hãy gọi điện cho Dịch vụ khách hàng của Beckman Coulter theo số 8007422345 (Hoa Kỳ hoặc Canada) hoặc liên hệ với Đại diện của Beckman Coulter tại địa phương bạn.

VẬT LIỆU CẦN DÙNG (KHÔNG KÈM THEO BỘ THUỐC THỬ):

- Ống lấy mẫu và vật liệu cần dùng để lấy mẫu.
- Pipet tự động có đầu hút dùng một lần để lấy mẫu có thể tích 20, 100 và 500 µL.
- Ống chứa mẫu tan huyết bằng nhựa.
- Thuốc thử ly giải hồng cầu. Ví dụ: Dung dịch ly giải IOTest 3 (Số tham chiếu A07799).
- Dung dịch đệm (PBS: 0,01 Mol natri photphat; 0,145 Mol natri clorua; pH 7,2).
- Máy ly tâm.
- Máy trộn tự động (loại khuấy).
- Máy đếm tế bào dòng chảy.

CHUẨN BỊ MẪU

Nồng độ bạch cầu trong mẫu phải dưới 10^4 tế bào/µL (10^{10} /L). Nếu cần, hãy pha loãng trong PBS để thu được nồng độ bạch cầu 5×10^3 tế bào/µL (5×10^9 /L).

Quy trình này dùng 100 µL mẫu, pha loãng sẵn hoặc chưa pha loãng cho mỗi ống.

Chú ý:

- Có thể thực hiện điều chỉnh cường độ huỳnh quang tương ứng với 7-AAD bằng cách nhuộm một mẫu máu tươi toàn phần và các tế bào ổn định không sống được trong cùng một ống (xem hình ảnh trong phần phụ lục). Trong những điều kiện này, điện áp tương ứng với việc phát hiện 7-AAD phải được điều chỉnh sao cho các biến cố sống được (tức là mẫu máu tươi toàn phần) xuất hiện trên chu kỳ đầu tiên của biểu đồ phân bố SS, tùy thuộc vào 7-AAD (xem ví dụ trong phần phụ lục).
- Không sử dụng các thuốc thử có chứa chất thấm hoặc thuốc thử cố định trong suốt quy trình để tránh nhuộm dương tính về mặt vật lý.

QUY TRÌNH

1. Thêm 20µL dung dịch Thuốc nhuộm đánh giá tỷ lệ sống 7-AAD vào từng ống xét nghiệm.
2. Thêm 100µL mẫu xét nghiệm (tức là khoảng 5×10^5 tế bào).

Lắc nhẹ các ống.

- Ủ trong 15 đến 20 phút ở nhiệt độ phòng (18–25°C), tránh ánh sáng.
- Sau đó, ly giải hồng cầu theo khuyến nghị của thuốc thử ly giải được sử dụng, nếu cần.
Ví dụ: nếu một người muốn dùng Dung dịch ly giải IOTest 3 (Số tham chiếu A07799), họ cần thêm 2 mL dung dịch làm việc (1X), lắc ngay và ủ trong 10 phút ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng.
Nếu mẫu không chứa hồng cầu, không thực hiện giai đoạn ly giải, nhưng thêm 0,5 đến 1 mL PBS.
- Phải phân tích chế phẩm trong vòng 1 giờ.

Lưu ý: Trong mọi trường hợp, phải bảo quản chế phẩm ở 2 đến 8°C và tránh ánh sáng.

HIỆU SUẤT

ĐỘ ĐẶC HIỆU

Actinomycin là các thành phần sinh học hoạt tính của nhóm mang màu (2-Amino-4,6Dimethylphenoxazone-3) và của các pentapeptit mạch vòng (3). Đây là các loại kháng sinh có nguồn gốc từ vi khuẩn có biểu thị đặc trưng trong đất Ascomycetes. Actinomycin tạo phức bền với axit deoxyribonucleic (DNA) sợi đôi nhưng không tạo phức bền với axit ribonucleic sợi đôi (RNA), với RNA-DNA lai, hoặc với DNA hoặc RNA sợi đơn.

Các đặc tính quang phổ của 7-AAD làm cho thuốc nhuộm này trở thành một hợp chất đặc biệt phù hợp với phương pháp phân tích đếm tế bào dòng chảy (3). Độ hấp thụ tối đa của phức hợp 7-AAD/DNA tương thích với bước sóng kích thích màu xanh lam 488 nm đối với máy đếm tế bào có laser argon (4). Phát xạ huỳnh quang đỉnh trong dải màu đỏ sâu (635 đến 675 nm) của phức hợp 7-AAD/DNA cho phép sử dụng tối ưu đầu dò này khi kết hợp với các kháng thể cộng hợp Fluorescein Isothiocyanat (FITC) và R Phycoerythrin (PE) (3). Thật vậy, trái ngược với Propidium Iodide (PI) – một đầu dò huỳnh quang khác được sử dụng làm điểm đánh dấu DNA – phức hợp 7-AAD/DNA có phổ phát xạ chéo chéo giảm so với FITC và PE.

ĐỘ CHỤM

Tỷ lệ phần trăm của các giá trị dương tính được xác định bằng cách sử dụng máu toàn phần pha với tế bào dương tính. Mỗi mẫu được chạy 4 lần, 2 lần/ngày trong 1 ngày trên 2 thiết bị sử dụng 2 lô thuốc thử Thuốc nhuộm đánh giá tỷ lệ sống 7-AAD. Các phép đo (% dương tính) được thực hiện trên máy đếm tế bào dòng chảy Navios. Tiến hành phân tích dựa trên phương pháp CLSI EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Đánh giá hiệu suất độ chụm của phương pháp đo định lượng).

Tiêu chí chấp nhận của chúng tôi phụ thuộc vào số lượng sự kiện dương tính đo được cho mỗi quần thể:

- Nếu sự kiện dương tính <1.500, CV <15%
- Nếu sự kiện dương tính >1.500, CV <10%

Dung dịch ly giải IOTest 3:

Máu toàn phần pha với dòng tế bào HPBALL							
Số sự kiện dương tính (Giá trị trung bình) = 5539							
	Giữa những người thao tác	Giữa các máy đếm tế bào	Trong lô	Giữa các lô	Giữa các lần chạy	Trong lần chạy	Toàn phần
CV (%)	1,48	1,55	4,44	1,41	2,87	3,05	4,91
KẾT QUẢ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Hệ thống ly giải VersaLyse:

Máu toàn phần pha với dòng tế bào HPBALL							
Số sự kiện dương tính (Giá trị trung bình) = 4034							
	Giữa những người thao tác	Giữa các máy đếm tế bào	Trong lô	Giữa các lô	Giữa các lần chạy	Trong lần chạy	Toàn phần
CV (%)	3,73	1,85	8,74	1,79	3,63	7,02	9,11
KẾT QUẢ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

ĐỘ CHÍNH XÁC

Độ chính xác của Thuốc nhuộm đánh giá tỷ lệ sống 7-AAD được đánh giá bằng cách so sánh kết quả với thuốc thử tham chiếu để khẳng định trên một tập hợp các mẫu máu toàn phần pha với tế bào dương tính chạy trên máy đếm tế bào dòng chảy NAVIOS. Độ chênh lệch giữa xét nghiệm và thuốc thử tham chiếu được xác định dựa trên sự khác biệt giữa các kết quả xét nghiệm. Nếu sự chênh lệch nằm trong phạm vi sai số cho phép hoặc giá trị p cho thấy không có sự khác biệt đáng kể (>0,05), thì kết quả xét nghiệm mẫu bệnh phẩm cho hai thuốc thử được coi là tương đương.

Kết quả thu được sẽ được tóm tắt trong bảng sau:

Dung dịch ly giải IOTest 3:

Số người hiến = 25				
Mục tiêu dương tính	Giá trị trung bình Δ	Tiêu chí tế bào Δ %	giá trị p	KẾT QUẢ
Máu toàn phần pha với dòng tế bào HPBALL	0,31	<5	0,247	PASS

Hệ thống ly giải VersaLyse:

Số người hiến = 25				
Mục tiêu dương tính	Giá trị trung bình Δ	Tiêu chí tế bào Δ %	giá trị p	KẾT QUẢ
Máu toàn phần pha với dòng tế bào HPBALL	-0,34	<5	0,289	PASS

GIỚI HẠN

- Phương pháp đếm tế bào dòng chảy có thể cho kết quả sai nếu điều chỉnh máy đếm tế bào không phù hợp, nếu mức bù huỳnh quang rò rỉ không phù hợp và nếu định vị các vùng không cần thận.
- Sẽ thu được kết quả chính xác và có thể tái lập nếu sử dụng quy trình theo tờ hướng dẫn kỹ thuật và phù hợp với biện pháp xét nghiệm hợp lý.
- Hoạt chất 7-AAD trong thuốc thử này đã được tối ưu hóa để cung cấp tỷ lệ tín hiệu đặc hiệu/tín hiệu không đặc hiệu tốt nhất. Do đó, điều quan trọng là phải tuân thủ tỷ lệ thể tích thuốc thử/thể tích mẫu trong mỗi xét nghiệm.
- Trong trường hợp tăng bạch cầu, hãy pha loãng máu trong PBS để thu được giá trị xấp xỉ 5×10^9 bạch cầu/L.
- Trong một số tình trạng bệnh, chẳng hạn như suy thận nặng hoặc bệnh rối loạn máu, hồng cầu có thể ly giải chậm, ly giải không hoàn toàn, hoặc thậm chí là không thể ly giải. Trong trường hợp này, bạn nên phân lập tế bào đơn nhân bằng phương pháp ly tâm phân lớp theo tỷ trọng (ví dụ: Ficoll) trước khi nhuộm.

Xem Phụ lục để biết ví dụ và tài liệu tham khảo.

NHÃN HIỆU

Beckman Coulter, logo cách điệu và các nhãn hiệu sản phẩm cũng như dịch vụ của Beckman Coulter nêu trong tài liệu này là nhãn hiệu hoặc nhãn hiệu đã đăng ký của Beckman Coulter, Inc. ở Hoa Kỳ và các quốc gia khác.

THÔNG TIN BỔ SUNG

Đối với bệnh nhân/người dùng/bên thứ ba tại Liên minh Châu Âu và ở các quốc gia có chế độ quản lý giống nhau (Quy định 2017/746/EU về Thiết bị y tế chẩn đoán In vitro); nếu xảy ra sự cố nghiêm trọng trong quá trình sử dụng thiết bị này hoặc do sử dụng thiết bị này, vui lòng báo cáo cho nhà sản xuất và/hoặc đại diện ủy quyền của nhà sản xuất cũng như cơ quan có thẩm quyền tại quốc gia của bạn.

LỊCH SỬ SỬA ĐỔI

PHIÊN BẢN AF:	Ngày phát hành: Tháng 10 năm 2021
PHIÊN BẢN AW:	Ngày phát hành: Tháng 04 năm 2022
Cập nhật để tuân thủ Chính sách ghi nhãn toàn cầu của Beckman Coulter và theo các yêu cầu IVD-R (EU) 2017/746:	
Bổ sung các phần	Đối tượng sử dụng, Nồng độ, Độ chụm, Độ chính xác, Thông tin bổ sung, Lịch sử sửa đổi
Bổ sung thông tin	Xem phần Nguyên tắc
Các phần cập nhật	Nguyên tắc, Cảnh báo và Biện pháp phòng ngừa, Phân loại mối nguy hiểm theo GHS, Bảo quản và Độ ổn định, Bảng chứng biến chất, Giới hạn, Phụ lục
Các phần bị xóa	Phương pháp, Ví dụ về các ứng dụng lâm sàng, Kết quả dự kiến, Khả năng tái lập trong phòng xét nghiệm, Độ tuyến tính
PHIÊN BẢN	Ngày phát hành
AX	Tháng 10 năm 2022
Các phần cập nhật	Thêm các bản dịch
PHIÊN BẢN	Ngày phát hành
AY	
Các phần cập nhật	Bảo quản và độ ổn định

Bảng chú giải các ký hiệu

Danh mục thuật ngữ ký hiệu có sẵn tại beckman.com/techdocs (số tài liệu B60062)

	Техникалық сипаттамалар 7-AAD өміршеңдік бояғышы
Дәрілік түрі	Сұйықтық
Көлем	3 мл
Калибрлеу	Қолдануға дайын
λ қозу	488 нМ
Эмиссияның жоғарғы шегі	655 нм (қос тізбекті DNA бар күрделі)

7-AAD өміршеңдік бояғышы

REF A07704 150 сынақ; 3 мл,
20 мкл/сынақ

In Vitro диагностикасында пайдалануға арналған

ПАЙДАЛАНУ МАҚСАТЫ

7-AAD өміршеңдік бояғышы – ағын цитометриясын пайдаланып моно- немесе мульти параметрлі талдауға арналған ерітіндідегі химиялық бояу. Ол адамның лейкоциттерін талдауға қызығушылық тудыратын (өмір сүруге қабілетті) жасушалардан өміршең емес жасушаларды анықтауға және шығаруға мүмкіндік береді.

ҚАҒИДА

7-Аминоактиномицин D (7-AAD) – хромофордың 7-позициясында алмастырылған амин тобы бар актиномициннің аналогы. 7-AAD DNA цитозин/гуанин негіздерінің төбелерінің арасына енгізіледі (1).

Екі тізбекті DNA бояуы үлгіні 7-AAD өміршеңдік бояғышымен инкубациялау арқылы орындалады. Сол кезде эритроциттер лизис арқылы шығарылады, ал лейкоциттерге ағын цитометриясы арқылы талданады.

Апоптотикалық, некротикалық жасушалар және/немесе зақымдалған жасушалар ағын цитометриясы әдісімен өміршең жасушаларды талдауда кедергі көзі болып табылады. Тіршілікке қабілетсіз жасушаларды сипаттауға және анықтауға болады, өйткені олар 7-AAD-мен боялады, ал мембрана тұтастығын сақтайтын тірі жасушалар 7-AAD-ге төзімді және боялмайды (яғни, олар 7-AAD теріс).2

Ағын цитометрі жарық диффузиясы мен жасуша флуоресценциясын талдайды. Бұл жасушалардың 7-AAD бояуына сәйкес келетін ортогональды жарық шашырауын (бүйірлік шашырау немесе SS) және флуоресценттенуді корреляциялайтын гистограммада анықталған электронды терезеде локализациялауға мүмкіндік береді. Цитометрде қол жетімді екі түрлі параметрді біріктіретін басқа гистограммалар да қақпа қадамында қолданылады.

Оң боялған объектілерді (өмір сүруге жарамсыз) боялмаған (өмір сүруге қабілетті) заттардан шығаратындай етіп жасушалардың флуоресценттенуін талдаңыз. Нәтижелерді қақпа арқылы ескерілген барлық оқиғаларға қатысты флуоресцентті емес оқиғалардың пайызы ретінде көрсетуге болады.

МАҚСАТТЫ ПАЙДАЛАНУШЫ

Бұл өнім зертханалық жағдайда кәсіби пайдалануға арналған.

ҮЛГІЛЕР

Көктамыр қанын антикоагулянт ретінде EDTA тұзы бар стерильді түтіктердің көмегімен алу керек.

Үлгілерді бөлме температурасында (18–25°C) сақтау керек және оларды шайқауға болмайды. Үлгіні сынақ үлгісін алмастан бұрын жеңіл араластыру жолымен гомогендеу керек.

Үлгілерді көк тамырды тескен соң 24 сағат ішінде талдау қажет.

ЕСКЕРТУ ЖӘНЕ САҚТЫҚ ШАРАЛАРЫ

1. Жарамдылық мерзімі өткеннен кейін реагентті қолдануға болмайды.
2. Қатыруға болмайды.
3. Оны пайдаланбас бұрын, температурасының бөлме температурасына (18–25°C) жетуін күтіңіз.
4. Жарық әсерін азайтыңыз.
5. Реагенттердің микробтармен ластануына жол бермеңіз немесе жалған нәтижелер орын алуы мүмкін.
6. Бұл пайдалануға дайын реагенттің құрамында 0,005% (салм/көлем) 7-AAD және 1% (көлем/көлем) диметил сульфоксиді (DMSO) бар.

Таза түрінде 7-AAD ықтимал канцерогенді және DMSO тітіркендіргіш болып табылады.

Осы құрамда жоғары сұйылтылғанына қарамастан, бұл компоненттер өздерінің зиянды әсерлерін толығымен немесе ішінара сақтауы мүмкін. Ешқашан оны аузыңызға құймаңыз және теріге, шырышты қабыққа және көзге тигізбеңіз. Осы реагенттерді пайдалану кезінде тиісті сақтық шараларын сақтай отырып пайдаланыңыз (атап айтқанда: қолғап, халат және көзілдірік кию).

7. 7-AAD - жарық әсерінен деградацияға ұшырайтын хромофор. Қолданылғанға дейін жарықтан қорғау үшін мөлдір емес құтыда сақталады.
Инкубация қадамдары кезінде үздіксіз жарық әсерінен аулақ болыңыз және бояудан кейін үлгілердің әсерге ұшырауын азайтыңыз.
8. Қанның барлық үлгілері ықтимал жұқпалы деп есептелуі және сақтықпен өңделуі (атап айтқанда: қорғаныс қолғабын, халат және көзілдірік кию) керек.
9. Өңдеу үшін пайдаланылатын қан түтіктері мен бір реттік материалдарды өртеуге арналған арнайы контейнерлерге тастау керек.

GHS ҚАУІПТЕР КЛАССИФИКАЦИЯСЫ

7-AAD өміршеңдік
бояғышы

ЕСКЕРТУ

H316
P332+P313

Терінің әлсіз тітіркенуін тудырады.
Егер тері тітіркенсе: медициналық кеңес/көмек алыңыз.
Диметилсульфоксид 0.5 - 1.5%



Қауіпсіздік төлқұжаты beckman.com/techdocs мекенжайында қолжетімді

САҚТАУ ЖӘНЕ ТҰРАҚТЫЛЫҚ

7-AAD өміршеңдік бояғышын 2–8°C температурада сақтау керек және құтыны ашқанға дейін және ашқаннан кейін жарықтан қорғау керек.

Тұрақтылық зерттеуіне сәйкес жабық күйіндегі сауыт сөресінің жарамдылық мерзімі: 730 күндер.

Ашық құтының тұрақтылығы: реагент 60 күн бойы тұрақты болады.

Нақты топтама бойынша талдау сертификатын мына сайттан қараңыз www.beckman.com.

ЗАҚЫМДАЛУ БЕЛГІЛЕРІ

Реагенттердің сыртқы түрінің кез келген өзгерісі олардың зақымдалғандығын көрсетуі мүмкін және реагентті пайдаланбаған жөн.

Қосымша ақпарат алу үшін немесе зақымдалған өнімді алған жағдайда 800-742-2345 (АҚШ немесе Канада) арқылы Beckman Coulter тұтынушыларға қызмет көрсету орталығына қоңырау шалыңыз немесе жергілікті Beckman Coulter компаниясының өкіліне хабарласыңыз.

ҚАЖЕТТІ, БІРАҚ ЖИНАҚПЕН БІРГЕ ЖЕТКІЗІЛМЕГЕН МАТЕРИАЛДАР

- Үлгі алу түтіктері және үлгі алу үшін қажетті материал.
- 20, 100 және 500 мкл ерітінділерге арналған бір реттік ұшы бар автоматты тамызғыштар.
- Эритроциттер гемолизіне арналған пластикалық түтіктер.
- Эритроциттердің лизисі реагент. Мысалы: IOTest 3 лизистік ерітінді (Сілт. A07799).
- Буфер (PBS: 0,01 М натрий фосфаты; 0,145 М натрий хлориді; pH 7,2).
- Центрифугалау
- Автоматты араластырғыш (араластырғыш түрі).
- Ағын цитометрі.

ҮЛГІЛЕРДІ ДАЙЫНДАУ

Үлгідегі лейкоциттер концентрациясы 10^4 жасуша/мкл (10^{10} /л) шамадан аз болуы шарт. Қажет болған жағдайда лейкоцит концентрациясын 5×10^3 жасушалар/мкл (5×10^9 /л) шамаға әкелу үшін PBS ерітіндісінде сұйылтыңыз.

Процедура түтікте немесе басқа жолмен алдын ала сұйылтылған 100 мкл үлгіні пайдаланады.

NB:

- 7-AAD сәйкес флуоресценттену қарқындылығын бір түтіктегі жаңа толық қан үлгісін және өміршең емес тұрақтандырылған жасушаларды бояу арқылы реттеуге болады (қосымшадағы суретті қараңыз). Осы шарттарда 7-AAD анықтауына сәйкес кернеуді 7-AAD-ге байланысты өміршең оқиғалар (мысалы, тұтас жаңа қан) SS гистограммасының бірінші онкүндігінде пайда болатындай етіп реттеу керек (қосымшадағы мысалды қараңыз).
- Оң бояу артефактілерін болдырмау үшін процедура кезінде енетін немесе бекітетін агенттері бар реагенттерді пайдаланбаңыз.

ПРОЦЕДУРА

1. Әрбір түтікке 20 мкл 7-AAD өміршеңдік бояғыш ерітіндісін қосыңыз.
2. Сынақ үлгісінің 100 мкл қосыңыз (яғни, шамамен 5×10^5 ұяшыққа тең).
Түтіктерді абайлап араластырыңыз.
3. Жарықтан қорғалған бөлме температурасында (18–25°C) 15–20 минут инкубациялаңыз.
4. Содан кейін, қажет болған жағдайда, лизиске қолданылатын реагенттің ұсыныстарына сүйене отырып, эритроциттердің лизисін жүргізіңіз.
Мысалы, IOTest 3 лизис ерітіндісін (Сілт. A07799) пайдаланғыңыз келсе, 2 мл жұмыс ерітіндісін (1X) қосыңыз, дереу араластырыңыз және жарықтан қорғалған бөлме температурасында 10 минут инкубациялаңыз.
Егер үлгіде эритроциттер болмаса, лизис қадамын өткізіп жіберіп, 0,5–1 мл PBS қосыңыз.
5. Дайындықтарды 1 сағат ішінде талдау керек.

Ескертпе: барлық жағдайда препараттарды 2–8°C температурада, күн көзінен алыс жерде сақтау керек.

ӨНІМДІЛІК

ЕРЕКШЕЛІГІ

Актиномициндер хромофордың (2-Амино-4,6-Диметилфеноксазон-3) және циклдік пентапептидтердің белсенді биологиялық компоненттері болып табылады (3). Бұл топырақ аскомицеттеріне тарихи тән бактериялық текті антибиотиктер. Актиномициндер қос тізбекті дезоксирибонуклеин қышқылымен (DNA) тұрақты комплекстер түзеді, бірақ қос тізбекті рибонуклеин қышқылымен (RNA), RNA-DNA гибридтерімен де, бір тізбекті DNA немесе RNA-мен де кешендердің мұндай түрін түзбейді.

7-AAD спектрлік қасиеттері оны ағын цитометриясы арқылы талдау үшін өте қолайлы қосылыс етеді (3). 7-AAD/DNA кешенінің максималды абсорбция аргон лазерімен жабдықталған цитометрлер үшін, 488 нм көк қозу толқын ұзындығымен үйлесімді (4). 7-AAD/DNA кешенінің қою қызыл жолағындағы (635–675 нм) флуоресценцияның ең жоғары эмиссиясы осы датчигті флуоресцеин-изотиоцианат (FITC) конъюгацияланған антиденелермен және R-фикоэритринмен (PE) ұштастыра отырып оңтайлы пайдалануға мүмкіндік береді (3). Шынында да, DNA маркері ретінде пайдаланылатын басқа флуоресцентті датчик болып табылатын пропидий йодидінен (PI) айырмашылығы, 7-AAD/DNA кешені FITC және PE-мен қабаттасатын эмиссия спектрі төмендеген.

ДӘЛДІК

Оң мәндердің пайызы оң жасушаларды қосу арқылы жаңа алынған қанды қолдану арқылы анықталды. Әрекет үлгі 4 рет, күніне екі рет 1 күн бойы 2 аспапта 7-AAD өміршеңдік бояғыш реагентінің 2 лотын пайдаланып орындалды. Өлшемдер (% оң) Navios ағын цитометрінде жүргізілді. Талдау CLSI EP5-A2 әдісі негізінде жүргізілді: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Сандық өлшеу әдістерінің дәлдік өнімділігін бағалау).

Біздің қабылдау критерийлері әрбір популяция үшін өлшенген оң оқиғалардың санына байланысты:

- Оң оқиға болса <1500, CV <15%
- Оң оқиға болса >1500, CV <10%

IOTest 3 лизистік ерітінді:

Жаңа алынған қанHPBALLжасуша сызығы бар							
Оң оқиғалар саны (Орташа мән) = 5539							
	Аралық оператор	Цитометраралық	Топтама ішілік	Топтама аралық	Жүгіру арасында	Жүгіру ішінде	Жалпы
CV (%)	1.48	1.55	4.44	1.41	2.87	3.05	4.91
НӘТИЖЕЛЕР	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Versalyse лизис жүйесі:

Жаңа алынған қанHPBALLжасуша сызығы бар							
Оң оқиғалар саны (Орташа мән) = 4034							
	Аралық оператор	Цитометраралық	Топтама ішілік	Топтама аралық	Жүгіру арасында	Жүгіру ішінде	Жалпы
CV (%)	3.73	1.85	8.74	1.79	3.63	7.02	9.11
НӘТИЖЕЛЕР	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

ДҰРЫСТЫҚ

7-AAD өміршеңдік бояғышының дұрыстығы NAVIOS цитометрінде өңделген, жасушалық оң жаңа алынған қан үлгілерінің жинағындағы, предикат ретінде анықтамалық реагентпен нәтижелерді салыстыру арқылы бағаланды. Сынақ пен анықтамалық реагент арасындағы ауытқу, сынақ нәтижелері арасындағы айырмашылық негізінде анықталды. Егер қиғаштық қатеге төзімділік ауқымында болса немесе р-мәні айтарлықтай айырмашылықты көрсетпесе (>0,05), онда екі реагенттермен емделуші үлгілерін сынау нәтижелері баламалы болып саналады.

Алынған нәтижелер келесі кестеде толық көрсетілген:

ЮТест 3 лизистік ерітінді:

Донорлар саны = 25				
Оңтайлы нысана	Орташа мән Δ	Δ % Жасуша критерийлері	p-мәні	НӘТИЖЕЛЕР
Жаңа алынған қанHVBALLжасуша сызығы бар	0.31	<5	0.247	PASS

Versalyse лизис жүйесі:

Донорлар саны = 25				
Оңтайлы нысана	Орташа мән Δ	Δ % Жасуша критерийлері	p-мәні	НӘТИЖЕЛЕР
Жаңа алынған қанHVBALLжасуша сызығы бар	-0.34	<5	0.289	PASS

ШЕКТЕУЛЕР

1. Цитометр дұрыс бапталмаған, флуоресценттенудің ағып кетуі дұрыс өтелмеген және аймақтар мұқият орналастырмаған жағдайда, ағын цитометриясы қате нәтижелер беруі мүмкін.
2. Жүргізілген процедуралар техникалық нұсқау брошюрасына сәйкес және тиісті зертханалық тәжірибемен үйлесімді болған жағдайда ғана дұрыс, әрі жаңғыртылуы мүмкін нәтижелерді алуға болады.
3. 7-AAD, осы реагенттегі белсенді зат ең жақсы спецификалық/спецификалық емес сигнал қатынасын ұсыну үшін оңтайландырылған. Сондықтан әрбір сынақты жүргізгенде реагент көлемінің үлгі көлеміне қатынасын сақтау маңызды.
4. гиперлейкоцитоз жағдайында шамамен 5×10^9 лейкоциттер/л () мәнін алу үшін PBS ерітіндісінде қанды сұйылтыңыз.
5. Кейбір жіті бүйрек жеткіліксіздігі немесе гемоглобинопатия сияқты аурулар жағдайында, эритроциттер лизисі баяу, толық емес немесе тіпті мүмкін емес болуы мүмкін. Бұл жағдайда бояудан бұрын тығыздық градиентін (мысалы, Ficoll) пайдаланып, моноклеарлы жасушаларды оқшаулап алу ұсынылады.

Мысалдар мен анықтамалар алу үшін қосымшаны қараңыз.

САУДА БЕЛГІЛЕРІ

Beckman Coulter, стильденген логотип, сонымен қатар Beckman Coulter өнім мен қызмет көрсету белгілері — бұл АҚШ және басқа елдердегі Beckman Coulter, Inc. сауда белгілері немесе тіркелген сауда белгілері.

ҚОСЫМША АҚПАРАТ

Еуропалық Одақтағы және бірдей реттеу режимі (зертханалық жағдайдағы медициналық диагностикалық құрылғылар туралы 2017/746/ЕО қаулысы) бар елдердегі пациент/пайдаланушы/үшінші тарап үшін; егер осы құрылғыны пайдалану кезінде немесе оны пайдалану нәтижесінде елеулі оқиға орын алса, өндірушіге және/немесе оның уәкілетті өкіліне және ұлттық органыңызға хабарлаңыз.

Өзгерту тарихы

AF ҚАЙТА ҚАРАУ:	Шығарылған күні: Қазан 2021
AW РЕДАКЦИЯСЫ:	Шығарылған күні: Сәуір 2022
Beckman Coulter ғаламдық таңбалау саясатына және IVD-R (EO) 2017/746 талаптарына сәйкес жасалған жаңартулар:	
Қосылған бөлімдер	Мақсатты пайдаланушы, концентрация, дәлдік, дұрыстық, қосымша ақпарат, Өзгерту тарихы
Қосылған ақпарат	Қағида бөлімдерін қараңыз
Жаңартылған бөлімдер	Қағида, ескерту және сақтық шаралары, GHS қауіптер классификациясы, сақтау және тұрақтылық, Зақымдалу белгілері, шектеулер, қосымша
Жойылған бөлімдер	Әдістеме, Клиникалық қолдану мысалдары, Күтілетін нәтижелер, Зертханаішілік жаңғыртылу, Сызықтық
РЕДАКЦИЯ	Шығарылған күні
AX	Қазан 2022
Жаңартылған бөлімдер	Қосылған аудармалар
РЕДАКЦИЯ	Шығарылған күні
AY	
Жаңартылған бөлімдер	Сақтау және тұрақтылық

Таңбалар пернесі

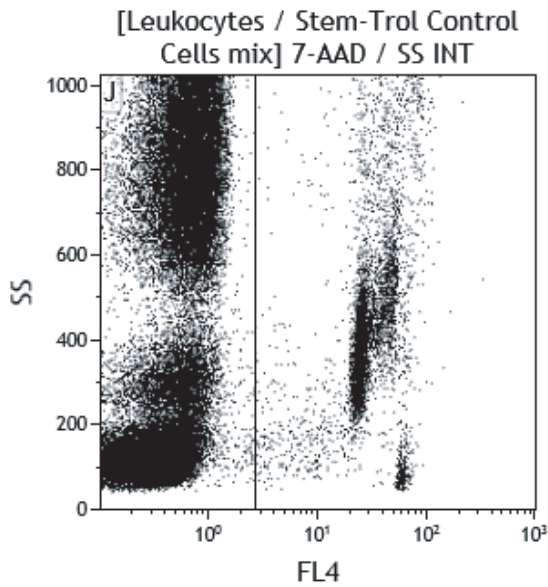
Таңбалар глоссарийі beckman.com/techdocs сайтында (құжат нөмірі: B60062) қолжетімді

APPENDIX

- EXAMPLES

The graph below is a biparametric representation (Fluorescence Intensity vs. Side Scatter) of a lyzed fresh whole blood sample from an healthy donor spiked with Stem-Trol Control Cells (Ref. IM3632). Since Stem-Trol Control Cells are stabilized cells, they are not viable and are stained with the the 7-AAD Viability Dye (visible in the right part of the histogram). In contrast, a majority of the fresh whole blood cells are not stained (visible in the left part of the histogram).

Acquisition is performed with a Beckman Coulter Navios flow cytometer equipped with the Navios analysis software.



REFERENCES

1. Lecoeur, H., Ledru, E., Prévost, M-C., Gougeon, M-L., "Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods", 1997, J. Immunol. Methods, 209, 111-123.
2. Gill, J.E., Jotz, M.M., Young, S.G., Modest, E.J., Sengupta, S.K., "7-Amino-actinomycin D as a cytochemical probe. I. Spectral properties", 1975, J. Histochem. Cytochem., 23, 793-799.
3. Schmid, I., Krall, W.J., Uittenbogaart, C.H., Braun, J., Giorgi, J.V., "Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry", 1992, Cytometry, 13, 204-208.
4. Zelenin, A.V., Poletaev, A.I., Stepanova, N.G., Barsky, V.E., Kolesnikov, V.A., Nikitin, S.M., Zhuze, A.L., Gnatchev, N.V., "7-Amino-actinomycin D as a specific fluorophore for DNA content analysis by laser flow cytometry", 1984, Cytometry, 5, 348-354.

IMMUNOTECH SAS 是贝克曼库尔特公司的旗下公司, 地址: 130, Avenue de Lattre de Tassigny,

BP 177, 13276 Marseille Cedex 9, France, 电话: +(33) 4 91 17 27 27

www.beckman.com

Beckman Coulter do Brasil Com. e Imp. de Prod. de Lab. Ltda
Alameda Rio Negro, 500, 15º andar, Torre B Alphaville Industrial

CEP 06.454-00 Barueri, São Paulo, Brasil

CNPJ: 42.160.812/0001-44 Telefone: 0800-771-8818

製造販売業者: ベックマン・コールター株式会社

〒135-0063

東京都江東区有明三丁目5番7号

TOC有明ウエストタワー

ООО «Бекмен Культер», 109004 Москва, Россия, ул. Станиславского, д. 21, стр. 3.

Тел. +7 (495) 228 67 00, e-mail: beckman.ru@beckman.com



IMMUNOTECH SAS A Beckman Coulter Company, 130, Avenue de Lattre de Tassigny,

BP 177, 13276 Marseille Cedex 9, France, +(33) 4 91 17 27 27

www.beckman.com