

# **RIDA<sup>®</sup>GENE** Color Compensation Kit IV

REF PG0004



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstrasse 17, 64297 Darmstadt, Alemanha

### 1. Uso previsto

Para diagnóstico *in vitro*. O RIDA<sup>®</sup>GENE Color Compensation Kit IV é usado para a calibração de cor em execuções PCR em tempo real RIDA<sup>®</sup>GENE 2-plex e superior no LightCycler<sup>®</sup> 480 II. O RIDA<sup>®</sup>GENE Color Compensation Kit IV pode ser usado para gerar um arquivo de compensação de cor para permitir a análise qualitativa e quantitativa de testes PCR em tempo real RIDA<sup>®</sup>GENE 2-plex e superior no LightCycler<sup>®</sup> 480 II.

O produto é destinado ao uso profissional.

### 2. Sumário e explicação do teste

Em uma PCR em tempo real, o sinal fluorescente emitido de um corante de repórter fluorescente pode sobrepor um canal de cor adjacente, gerando assim, um sinal (interferência) neste canal. A interferência de sinais fluorescentes pode causar resultados incorretos, a menos que uma correção seja realizada por um arquivo de compensação de cor. Um arquivo de compensação de cor pode compensar a interferência entre os canais de cor.

### 3. Princípio do teste

O RIDA<sup>®</sup>GENE Color Compensation Kit IV é usado para a calibração de cor em execuções PCR em tempo real RIDA<sup>®</sup>GENE 2-plex e superior no LightCycler<sup>®</sup> 480 II.

### 4. Reagentes fornecidos

**Tabela 1:** Reagentes fornecidos (Os reagentes fornecidos no kit são suficientes paraexecuções de compensação de 3 cores).

Código do kit	Reagente	Quantidade		Cor da tampa
1	Blank	1 ×	400 µl	Branco
2	Dye 1	1 ×	400 µl	Azul
3	Dye 2	1 ×	400 µl	Verde
4	Dye 3	1 ×	400 µl	Amarelo
5	Dye 4	1 ×	400 µl	Laranja
6	Dye 5	1 ×	400 µl	Vermelho

### 5. Instruções de armazenamento

- Proteja o RIDA<sup>®</sup>GENE Color Compensation Kit IV da luz e armazene a -20 °C. Se não for aberto, pode ser usado até a data de validade impressa no rótulo. Nenhuma garantia de qualidade poderá ser assegurada após o término do prazo de validade.
- Antes de usar, descongele cuidadosamente o RIDA<sup>®</sup>GENE Color Compensation Kit IV (por exemplo, em um refrigerador a 2 8 °C).
- Durante a preparação da compensação de cor, todos os reagentes devem ser resfriados adequadamente (2 - 8 °C).

### 6. Reagentes necessários, mas não fornecidos

O RIDA<sup>®</sup>GENE Color Compensation Kit IV é apropriado para uso com o seguinte dispositivo de PCR em tempo real:

### Tabela 2: Equipamento necessário

Dispositivo de PCR em tempo real	
Roche	LightCycler <sup>®</sup> 480 II

Caso queira usar outros dispositivos PCR em tempo real, entre em contato com a R-Biopharm para verificar a compatibilidade em <u>mdx@r-biopharm.de</u>.

- Consumíveis de PCR em tempo real (placa de microtitulação, lâmina óptica)
- Centrífuga com rotor para tubos de ensaio ou placas
- Pipetas (0,5 a 20  $\mu l,$  20 a 200  $\mu l,$  100 a 1,000  $\mu l)$
- Pontas da pipeta com filtros
- Luvas descartáveis sem pó

### 7. Avisos e medidas preventivas para os usuários

Apenas para diagnóstico in vitro.

- Esse teste deve ser realizado apenas por pessoal de laboratório treinado. As diretrizes para trabalho em laboratórios médicos devem ser seguidas.
- Sempre cumpra estritamente as instruções de uso para a realização desse teste.
- Não pipete amostras ou reagentes usando a boca. Evite o contato com membranas mucosas e pele lesionada.
- Utilize equipamentos de segurança pessoal (luvas adequadas, jaleco, óculos de segurança) ao manusear os reagentes e as amostras, e lave as mãos após concluir o teste.
- Não fume, coma ou beba em áreas onde as amostras estiverem sendo manipuladas.
- Garanta que a extração, a preparação da PCR e a PCR sejam realizadas em salas diferentes, a fim de evitar contaminações cruzadas.
- As amostras clínicas devem ser vistas como potencialmente infecciosas e devem ser descartadas adequadamente, como todos os reagentes e materiais que entram em contato com amostras potencialmente infecciosas.
- Não use o kit após o prazo de validade. Os usuários são os responsáveis por descartar de modo adequado todos os reagentes e materiais após sua utilização. Para o descarte, cumpra com os regulamentos nacionais.

Para maiores detalhes, consulte as Folhas de Dados de Segurança (SDSs) em www.r-biopharm.com.

# 8. Protocolo para a geração de arquivo de compensação de cor no LightCycler<sup>®</sup> 480 II

### 8.1 Preparação da compensação de cor

Para uma execução de compensação de cor, pipete cinco reações com 20 µl de cada corante incluindo o fundo (branco) em uma placa de microtitulação (ver Fig.1).



Fig. 1: Esquema de pipetagem para compensação de cor no LightCycler<sup>®</sup> 480 II.

Descongele, misture e centrifugue brevemente os reagentes antes de usá-los. Sempre resfrie os reagentes adequadamente durante as etapas de trabalho (2 °C a 8 °C).

Código do kit	Reagente	Quantidade por reaçãoPipete 20 µl cada um no seguintes poços	
1	Blank	20 µl	B2, C2, D2, E2, F2
2	Dye 1	20 µl	B4, C4, D4, E4, F4
3	Dye 2	20 µl	B6, C6, D6, E6, F6
4	Dye 3	20 µl	B8, C8, D8, E8, F8
5	Dye 4	20 µl	B10, C10, D10, E10, F10
6	Dye 5	20 µl	B12, C12, D12, E12, F12

Tabela 3: Prepa	aracão da co	npensacão	de cor L	.iahtCvcler®	480 II

Após pipetar os reagentes, selar a placa de microtitulação com lâmina óptica e centrifugar, se possível. Iniciar a PCR em tempo real de acordo com as configurações do dispositivo.

### 8.2 Configuração do instrumento de PCR

- *Nota:* Faça o login no software como administrador para configurar o formato de detecção.
- 1. Após abrir o software, clique no ícone "Tools" para programar o formato de detecção.



 A janela a seguir é aberta. Na janela Ferramentas, selecione "Detection Formats". Clique no botão "New" para criar um novo formato de detecção (ver Tab. 5) e salve como "RIDA®GENE". Clique no botão "Close" para sair da janela Ferramentas.

Tools		
User Access Current Password System Settings Report Settings Proc Log Database Information View Logged In Users Update Query Engine Detection Formats	New   Copy     New   Copy     New   Copy     Delete   Delete	Filter Combination Selection E mission E 488 510 580 610 640 660 × 440 F F F F F F F i 465 F F F F F F i 533 F F F F F Selected Filter Combination List Excitation Emission Name Factor Factor Time (Soc) 440 488 440-488 1 1 1 1 533 610 533-510 1 1 1 533 610 533-610 1 1 1 618 660 618-660 1 1 1
		Close

Tab. 4: Configuração do canal de detecção para o LightCycler® 480 II

Combinação de filtros	
440 / 488	
465 / 510	
533 / 580	
533 / 610	
618 / 660	

*Nota:* Defina o valor para Quant Factor, Fator de fusão e Tempo de integração para 1 (padrão).

- Roche 0 Ð LightCycler® 480 Software release 1.5.1.62 SP3 Version 1.5.1.62 6= 뮲 **Relative Quantification**  $\Diamond$  $\otimes$ **Gene Scanning** Ъ **Melt Curve Genotyping Endpoint Genotyping Absolute Quantification** 100 efore setting up a new run efore setting up a new run
- 3. Após programar o formato de detecção, clique no botão "New Experiment".

4. Selecione o formato de detecção "**RIDA®GENE**" e insira um volume de reação de 20 l (padrão).

Window:	New Experiment			<u>.</u>	User: System Admin	
Experi-	[	Run Protocol	Data		Run Notes	
ment	Detection Format RIDA®GENE			Customize Block Size	96 Plate ID	Reaction Volum
Subset Editor	Color Comp ID		Lot No	Test ID		

5. Programe o perfil térmico (ver Tab. 5).

Tabela 5: Perfil térmico

		Temperatura-alvo			
Programa	Modo de ciclos/análise	Alvo [°C]	Modo de aquisição	Retenção [hh:mm:ss]	Índice de subida [°C/s]
Denat. inicial	1 / nenhum	95	nenhum	00:00:30	4,4
Ciologom	5 / Quantificação	95	nenhum	00:00:15	4,4
Ciciagem	ciagem 57 Quantincação		individual	00:00:30	2,2
		95	nenhum	00:00:01	4,4
	1 / Compensação	50	nenhum	00:00:30	2,2
Análise TM	álise TM de cor		contínuo		
					Aquisições (por °C) = 1 0,14*

*Nota:* Certifique-se de que os números de "Ciclos" e "Modo análise" estejam corretos.

\* O índice de subida pode variar ligeiramente dependendo do formato do detector selecionado.



6. Após a conclusão da programação, o experimento deve parecer da seguinte forma.

7. Para programar o layout da placa de microtitulação, mude para o "Subset Editor". Clique no ícone "Plus" para criar um novo subconjunto e digite um nome para o layout (por exemplo, Compensação de cor). Mantenha pressionada a tecla Ctrl e o botão esquerdo do mouse e marque todos os poços contendo reagentes na placa de microtitulação (ver Fig. 1 e 2). Clique no botão "Apply" para terminar o subconjunto. A tela deve aparecer da seguinte forma.



8. Mude para o "Sample Editor". A partir da Etapa 1: "Select Workflow", escolha "Color Comp". Na etapa 2: "Select Samples", escolha o subconjunto previamente definido (Compensação de cor). Para terminar o layout, selecione o canal dominante correspondente para cada reagente (Blank, Dye 1, Dye 2, Dye 3, Dye 4, Dye 5) no campo "Dominant Channel" (ver Tab. 6). Selecione "Water" para as reações com o fundo de cor (Em branco).



Tabela 6: Configuração dos Canais Dominantes para os reagentes (LightCycler<sup>®</sup> 480 II)

Reagente	Canal dominante
Blank	Água
Dye 1	440 / 488
Dye 2	465 / 510
Dye 3	533 / 580
Dye 4	533 / 610
Dye 5	618 / 660

9. Coloque a placa com as reações preparadas dentro do dispositivo. Clique em "Experiment" e depois em "Start Run" para iniciar o experimento.



### 8.3 Avaliação e criação de um arquivo de compensação de cor

1. Após completar o experimento LightCycler<sup>®</sup>, clique no botão "Analysis".



 Na caixa de diálogo "Create New Analysis", vá para "Color Compensation". Selecione e confirme o subconjunto apropriado (por exemplo, Compensação de cor) na caixa de diálogo que se abre.



3. A análise se abre; clique em "Calculate" em seguida "Save CC Object".



4. Salve o arquivo de compensação de cor como "RIDA®GENE CCIV" na pasta "CCC".



Este arquivo estará então disponível para outros experimentos no LightCycler<sup>®</sup> 480 II. A geração do arquivo de compensação de cor está agora completa.

### 8.4 Utilização do arquivo de compensação de cor

Para usar o arquivo de compensação de cor, abra o experimento de PCR em tempo real RIDA®GENE e carregue a compensação de cor desejada em "**Experiment**" "**Data**". No menu suspenso "Color Comp (Off)", selecione "**in Database**" e, então, o arquivo de compensação de cor salvo.



Quando a compensação de cor é selecionada, o botão "**Color Comp (Off)**" muda para "**Color Comp (On)**". A compensação de cor selecionada é aplicada automaticamente a todos os filtros da análise. A PCR em tempo real RIDA<sup>®</sup>GENE pode agora ser analisada como usualmente.

*Nota*: O arquivo de compensação de cor é específico para cada LightCycler<sup>®</sup> 480 II. Um novo arquivo de compensação de cor é necessário se o dispositivo for trocado ou se a unidade óptica for reparada.

### 9. Histórico de versões

Número da versão	Seção e designação
16/03/2021	Versão anterior
09/09/2021	Adaptação / Correção Página de título

## 10. Explicação dos símbolos

## Símbolos gerais

IVD	Para utilização em diagnóstico in vitro
Ĩ	Respeitar as instruções de utilização
LOT	Número do lote
$\Sigma$	Data de validade
X	Temperatura de conservação
REF	Número do item
Σ Σ	Número de testes
~	Data de fabricação
	Fabricante

# Símbolos específicos do teste

Blank
Dye 1
Dye 2
Dye 3
Dye 4

Dye 5