

CE

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

REF PG0004



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

#### 1. Utilizare preconizată

Se utilizează pentru diagnosticare *in vitro*. RIDA<sup>®</sup>GENE Color Compensation Kit IV se utilizează pentru calibrarea culorii în cadrul testelor RIDA<sup>®</sup>GENE real-time PCR duplex sau în mai mulți pași efectuate pe LightCycler<sup>®</sup> 480 II. Cu ajutorul RIDA<sup>®</sup>GENE Color Compensation Kit IV se poate genera un fișier de compensare a culorii, pentru analiza calitativă și cantitativă a testelor RIDA<sup>®</sup>GENE real-time PCR duplex sau în mai mulți pași efectuate IDA<sup>®</sup>GENE real-time PCR duplex sau în mai mulți pași efectuate IIDA<sup>®</sup>GENE real-time PCR duplex sau în mai mulți pași efectuate pe LightCycler<sup>®</sup> 480 II.

Produsul este destinat doar utilizării profesionale.

#### 2. Scurtă prezentare și explicare a testului

În cadrul metodei PCR în timp real, semnalul fluorescent emis de un colorant raportor fluorescent poate suprapune un canal de culoare adiacent, generând astfel un semnal (diafonie). Diafonia de la semnalele fluorescente poate provoca rezultate incorecte, cu excepția cazului în care corecția este efectuată printr-un fișier de compensare a culorii. Fișierul de compensare a culorii poate compensa diafonia dintre canalele de culoare.

#### 3. Principiul testului

RIDA<sup>®</sup>GENE Color Compensation Kit IV se utilizează pentru calibrarea culorii în cadrul testelor RIDA<sup>®</sup>GENE real-time PCR duplex sau în mai mulți pași efectuate pe LightCycler<sup>®</sup> 480 II.

#### 4. Reactivi furnizați

**Tabelul 1:**Reactivii furnizați (reactivii furnizați în kit sunt suficienți pentru 3 cicluri de<br/>compensare a culorii.)

Cod set	Reactiv	Ca	ntitate	Culoare
1	Blank	1 ×	400 µL	alb, gata de utilizare
2	Dye 1	1 ×	400 µL	albastru, gata de utilizare
3	Dye 2	1 ×	400 µL	verde, gata de utilizare
4	Dye 3	1 ×	400 µL	galben, gata de utilizare
5	Dye 4	1 ×	400 µL	portocaliu, gata de utilizare
6	Dye 5	1 ×	400 µL	roșu, gata de utilizare

## 5. Instrucțiuni de depozitare

- Vă rugăm să urmați instrucțiunile de manipulare din Tabelul 2 și să păstrați trusa după utilizare conform informațiilor specificate.
- Toți reactivii trebuie păstrați într-un loc ferit de lumină, la o temperatură între
   -16 °C și -28 °C. Dacă ambalajul nu a fost deschis, pot fi utilizați până la data expirării imprimată pe etichetă. După data expirării, garanția de calitate nu mai este valabilă.
- Înainte de utilizare, toți reactivii trebuie decongelați cu grijă (de ex., în frigider, la 2 8 °C).
- Congelarea și decongelarea repetată de până la 3 ori nu afectează proprietățile testului.
- Răciți toți reactivii corespunzător în timpul pregătirii PCR (2 8 °C).

	Temperatura de depozitare	Durata maximă de depozitare
nedeschis	-16 °C la -28 °C	Se poate utiliza doar până la data expirării
deschis	-16 °C la -28 °C	3 de cicluri de decongelare-recongelare

## **Tabelul 2:** Condiții și informații pentru depozitare

## 6. Reactivi necesari care nu sunt furnizați

#### 6.1 Reactivi

Fără.

## 6.2 Echipamente de laborator

Pentru efectuarea testului RIDA<sup>®</sup>GENE Color Compensation Kit IV sunt necesare următoarele echipamente:

Echipament
Instrument PCR în timp real: LightCycler <sup>®</sup> 480 II (Roche)
Consumabile pentru PCR în timp real (plăci (profil redus, godeuri albe, cadru transparent), fiole pentru reacție, folii)
Centrifugă cu rotor pentru plăci/fiole de reacție
Agitator
Pipete (0,5 - 20 μL, 20 - 200 μL, 100 - 1.000 μL)
Vârfuri de pipetă cu filtru
Mănuși de unică folosință, fără pudră de talc
Pontru întrohări vă rugăm că contactati P. Pionharm AC la por@r bionharm do

Pentru întrebări, , vă rugăm să contactați R-Biopharm AG la pcr@r-biopharm.de.

## 7. Avertismente și măsuri de precauție pentru utilizatori

Se utilizează doar pentru diagnosticare in vitro.

Acest test trebuie efectuat doar de personal de laborator calificat. Trebuie respectate regulile de lucru ale laboratoarelor medicale.

Respectați întotdeauna cu strictețe manualul de utilizare atunci când efectuați acest test. Nu picurați cu pipeta probe sau reactivi folosind gura. Evitați contactul cu leziuni ale pielii și mucoase.

Purtați echipament de protecție personală (mănuși adecvate, halat de laborator, ochelari de protecție) când manipulați reactivii și probele. Spălați-vă pe mâini după finalizarea testului.

Nu fumați, nu mâncați și nu beți în zonele în care sunt manipulate probele.

Trebuie folosite încăperi separate, îmbrăcăminte specială și instrumente pentru extracția, pregătirea PCR și testarea PCR, pentru a se evita contaminarea încrucișată și rezultatele fals pozitive.

Probele clinice trebuie considerate ca potențial infecțioase și trebuie aruncate în mod corespunzător, la fel ca toți reactivii și materialele care vin în contact cu probele potențial infecțioase.

Nu utilizați trusa după data expirării. Utilizatorii sunt responsabili pentru eliminarea corectă a tuturor reactivilor și materialelor după utilizare. Respectați reglementările naționale privind aruncarea deșeurilor.

Puteți găsi mai multe detalii privind Fișa cu date de securitate (Safety Data Sheet, SDS) căutând după numărul articolului pe https://clinical.r-biopharm.com/search/.

Pentru utilizatorii din Uniunea Europeană: Raportați toate evenimentele adverse grave asociate produsului către R-Biopharm AG și autoritățile naționale competente.

# 8. Protocol pentru generarea unui fișier de compensare a culorii pe LightCycler<sup>®</sup> 480 II

## 8.1 Pregătirea compensării culorii

Decongelați, amestecați și centrifugați pentru scurt timp reactivii înainte de utilizare. Răciți întotdeauna toți reactivii în timpul etapelor de lucru (între 2 °C și -8 °C). Pentru un ciclu de compensare a culorii, picurați cu pipeta cinci doze de 20 µL din fiecare colorant, inclusiv fundalul (Blank), într-o placă de microtitrare (Fig. 1).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	
BLANN		DYE 1		DYE 2	DYE 3		DYE 4	DTE 0	
			1 2 3	1 2 3 4	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5 6	1       2       3       4       5       6       7         Image: Constraint of the second of the seco	1       2       3       4       5       6       7       8         1       2       3       4       5       6       7       8         1       2       3       4       5       6       7       8         1       2       3       4       5       6       7       8         1       1       1       1       1       1       1       1       1         1       0 <td< td=""><td>1       2       3       4       5       6       7       8       9         1       2       3       4       5       6       7       8       9         1       2       3       4       5       6       7       8       9         1       2       3       4       5       6       7       8       9         1</td></td<>	1       2       3       4       5       6       7       8       9         1       2       3       4       5       6       7       8       9         1       2       3       4       5       6       7       8       9         1       2       3       4       5       6       7       8       9         1

Figura 1: Schema adăugării coloranților pentru compensarea culorii pe LightCycler<sup>®</sup> 480 II.

Cod set	Reactiv	Cantitate per reacție	Picurați cu pipeta câte 20 μL în godeuri, după cum urmează
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

 Tabelul 3:
 Pregătirea compensării culorii pentru LightCycler<sup>®</sup> 480 II

După adăugarea reactivilor, sigilați placa de microtitrare cu folie optică și centrifugați, dacă este posibil. Porniți PCR în timp real conform setărilor dispozitivului.

## 8.2 Configurarea instrumentului PCR

*Notă:* Conectați-vă la software ca administrator, pentru a configura formatul detecției.

**1.** După deschiderea software-ului, dați clic pe pictograma "**Tools**", pentru a programa formatul detecției (consultați figura următoare).



 Se deschide fereastra următoare. În fereastra Tools, selectați "Detection Formats". Dați clic pe butonul "New" pentru a crea un format al detecției nou (consultați Tabelul 4) și salvați-l ca "RIDA<sup>®</sup>GENE" (consultați figura următoare).



 Tabelul 4:
 Configurarea canalului de detecție pentru LightCycler<sup>®</sup> 480 II

Combinație de filtre								
440/488								
465/510								
533/580								
533/610								
618/660								

**Notă:** Setați valoarea pentru Quant Factor, Melt Factor și Integration Time la 1 (implicită).

Dați clic pe butonul "Close", pentru a închide fereastra Tools.

**3.** După programarea formatului detecției, dați clic pe butonul "**New Experiment**" (consultați figura următoare).



**4.** Selectați formatul detecției "**RIDA<sup>®</sup>GENE**" și introduceți la cantitatea dozei 20 μL (implicită) (consultați figura următoare).

Window:	New Experiment			<u> </u>	U
Experi-	Run Protocol	Data		_	Ru
ment	Setup		Customize	Block Si e	96
Subeat					

5. Programați profilul termic (consultați Tabelul 5).

 Tabelul 5:
 Profilul termic

			Ten	nperature targ	jets
Program	Cycles / Analysis Mode	Target [°C]	Acquisition Mode	Hold [hh:mm:ss]	Ramp rate [°c/s]
Initial Denat.	1 / none	95	fără	00:00:30	4,4
Cualing	5 / Quantification	95	fără	00:00:15	4,4
Cycling	5 / Quantinication	60	unul	00:00:30	2,2
		95	fără	00:00:01	4,4
TM Analysis	1 / Color Compensation	50	fără	00:00:30	2,2
		70	continuu		Acquisitions (per °C) = 1 0.14*

#### *Notă:* Asigurați-vă că numărul de la "**Cycles**" și "**Analysis Mode**" este corect.

\* Rata de creștere poate diferi puțin, în funcție de formatul detecției selectat.

8

**6.** După finalizarea programării, experimentul trebuie să arate după cum urmează (consultați figura următoare).



7. Pentru a programa aspectul plăcii de microtitrare, comutați în "Subset Editor". Dați clic pe pictograma "Plus" pentru a crea un subset nou și introduceți un nume pentru configurare (de ex., Color Compensation). Apăsați lung tasta Ctrl și butonul stâng al mouse-ului și marcați toate godeurile care conțin reactivi din placa de microtitrare (consultați Fig. 1 și 2). Pentru a finaliza configurarea subsetului, dați clic pe butonul "Apply". Pe ecran trebuie să apară imaginea care urmează (consultați figura următoare).

Instrumer	t: Virtual LightCycler 480 96 System II / N	Not Connect	ed								Database:
Window:	New Experiment									-	User:
	Subsets-		New Subset	1 settings							
Experi-	12 Martine America Rep	v v		1	2	2	5		7		10
Editor	2 Color Compensati	×		, i	2		,	0	· ·	,	10
Sample Editor			A								
Analysis			В								
Report											
Sum.			5								
		4	D								
		•	E								
			F			·					
(	þ		G								
			н								

 Comutați în "Sample Editor". De la Pasul 1: la "Select Workflow", alegeți "Color Comp". La Pasul 2: la "Select Samples", alegeți subsetul configurat anterior (Color Compensation). Pentru a finaliza configurarea, selectați canalul predominant corespunzător fiecărui reactiv (Blank, Dye 1, Dye 2, Dye 3, Dye 4, Dye 5) în rubrica "Dominant Channel" (consultați Tabelul 6). Selectați "Water" pentru reacțiile cu fundalul de culoare (Blank) (consultați figura următoare).

Instrume	t: Virtual LightCycler 480 96 System II / Not Co	nnect	ted							Database
Window:	Now Experiment	_							-	User:
Experi- ment	Step 1: Select Workflow Abs Quant C Rel Quant C Scanning Tm Melt Geno C Endpt Ger	• •	olor Ce	omp	Select Filter	Combina ▼ 465-5	ations 10 🔽 533-580	₩ 533.610 ₩ 618.660	-	
Subse										
Editor	- Stop 2: Select Sat ples		۵ <mark>د</mark>	Color	Repl Of Sampl	Name	Dominant Channel			
	Subset: Color Compens - E	2	▶ B2		Blank		Water -			
Sample	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12		C2		Blank		Water			
Editor		z i	D2		Blank		Water			
	│ <b>₽</b> ─ <b>₽</b> ─ <b>₽</b> ─ <b>₽</b> ─ <b>₽</b>	1	E2		Blank		Water			
Analysis			F2		Blank		Water			
			B4		Dye 1		440-488			
			C4		Dye 1		440-488			
Report		-	D4		Dye 1		440-488			
			E4		Dye 1		440-488			
			F4		Dye 1		440-488			
Sum.	Dominant Channel	1	B6		Dye 2		465-510			
		-	C6		Dye 2		465-510			
	Water 440-488 465-510		D6		Dye 2		465-510			
	533-580 🔲 533-610 📃 618-660		E6		Dye 2		465-510			
		1	F6		Dye 2		465-510			
			B8		Dye 3		533-580			
			C8		Dye 3		533-580			
			D8		Dye 3		533-580			
		1	E8		Dye 3		533-580			
			F8		Dye 3		533-580			
			B10		Dye 4		533-610			
			C10		Dye 4	<u></u>	533-610			
			blo		0		533-610			
			EIO		Dye 4		533-610			
			FIO		Dye 4		533-610			
			B12		Dye 5		010-000			
			D12		Dye 5		010-000			
			D12		Dye 5		610-660			
	Stern 2: Edit Cales Come Descention		E12		Dye 5		610-660			
	- step 3: Edit Color Comp Properties		112		bye s		010-000			
	Sample Name									

Tabelul 6:	Setările canalului	predominant	pentru reactivi	(LightCycler <sup>®</sup> 480 II	)
------------	--------------------	-------------	-----------------	----------------------------------	---

Reactiv	Dominant Channel
Blank	Water
Dye 1	440/488
Dye 2	465/510
Dye 3	533/580
Dye 4	533/610
Dye 5	618/660

9. Puneți placa cu dozele pregătite în dispozitiv. Dați clic pe "Experiment" și apoi pe "Start Run", pentru a porni experimentul (consultați figura următoare).
Instrument: Virtual LightCycler 400 96 System II / Not Connected



#### 8.3 Evaluarea și crearea unui fișier de compensare a culorii

**1.** După finalizarea experimentului LightCycler<sup>®</sup>, dați clic pe butonul "**Analysis**" (consultați figura următoare).



2. În caseta de dialog "Create New Analysis", accesați "Color Compensation". Selectați și confirmați subsetul corespunzător (de ex., Color Compensation) în caseta de dialog care se deschide (consultați figura următoare).



**3.** Se deschide analiza; dați clic pe "**Calculate**" și apoi pe "**Save CC Object**" (consultați figura următoare).



**4.** Salvați fișierul de compensare a culorii ca "**RIDA<sup>®</sup>GENE CCIV**" în folderul "**CCC**" (consultați figura următoare).



Astfel, acest fișier va fi disponibil și pentru alte experimente pe LightCycler<sup>®</sup> 480 II. Generarea fișierului de compensare a culorii este acum finalizată.

## 8.4 Utilizarea fișierului de compensare a culorii

Pentru a utiliza fișierul de compensare a culorii, deschideți experimentul RIDA®GENE realtime PCR respectiv și încărcați compensarea culorii dorită în secțiunea "**Experiment**" "**Data**". În meniul vertical "**Color Comp (Off)**", selectați "**in Database**" și apoi fișierul de compensare a culorii salvat (consultați Fig.2).



## Figura 2: Utilizarea compensării culorii

După selectarea compensării culorii, butonul "**Color Comp (Off)**" devine "**Color Comp** (**On**)". Compensarea culorii selectată este aplicată automat tuturor filtrelor analizei. Testul RIDA<sup>®</sup>GENE real-time PCR poate fi analizat acum ca de obicei.

**Notă:** Fișierul de compensare a culorii este specific fiecărui LightCycler<sup>®</sup> 480 II. Dacă dispozitivul este schimbat sau unitatea optică este reparată, este necesar un nou fișier de compensare a culorii.

#### 9. Istoricul versiunilor

Numărul versiunii	Secțiune și denumire
2021-09-09	Versiunea anterioară
2022-02-03	Revizuire generală: 4. Reactivi furnizați 5. Instrucțiuni de depozitare 6. Reactivi necesari care nu sunt furnizați 7. Avertismente și măsuri de precauție pentru utilizatori

## 10. Explicația simbolurilor

Simboluri generale

IVD	Se utilizează pentru diagnosticare in vitro	
Ĩ	Respectați manualul de utilizare	
LOT	Numărul lotului	
X	A se utiliza înainte de	
X	Temperatura de depozitare	
REF	Numărul articolului	
∑∑∕	Număr de teste	
$\sim$	Data producerii	
	Producătorul	

Simboluri specifice testului

Blank	Fundal
Dye 1	Colorant 1
Dye 2	Colorant 2
Dye 3	Colorant 3
Dye 4	Colorant 4
Dye 5	Colorant 5