

CE

RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV

REF PG0004



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstrasse 17, 64297 Darmstadt, Nemecko \$+49 (0) 61 51 81 02-0 / +49 (0) 61 51 81 02-20 / www.r-biopharm.com

1. Zamýšľané použitie

Na diagnostické použitie *in vitro*. Súprava na kompenzáciu farieb RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV sa používa na farebnú kalibráciu 2-plexných a vyšších cyklov RIDA[®]GENE real-time PCR na prístroji LightCycler[®] 480 II. Súpravu na kompenzáciu farieb RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV možno použiť na vytvorenie súboru kompenzácie farieb, ktorý umožní analýzu kvalitatívnych a kvantitatívnych 2-plexných a vyšších testov RIDA[®]GENE real-time PCR na prístroji LightCycler[®] 480 II.

Produkt je určený na profesionálne použitie.

2. Zhrnutie a vysvetlenie testu

Pri PCR v reálnom čase môže emitovaný fluorescenčný signál fluorescenčného reportérového farbiva prekryť susedný farebný kanál, čím sa vytvorí signál (presluch). Presluchy z fluorescenčných signálov môžu mať za následok nesprávne výsledky, pokiaľ sa nevykoná korekcia pomocou súboru kompenzácie farieb. Súbor kompenzácie farieb môže kompenzovať presluchy medzi farebnými kanálmi.

3. Princíp testu

Súprava na kompenzáciu farieb RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV sa používa na farebnú kalibráciu 2-plexných a vyšších cyklov RIDA[®]GENE real-time PCR na prístroji LightCycler[®] 480 II.

4. Dodané činidlá

Kód súpravy	Činidlo	Množstvo		Farba veka
1	Blank	1 ×	400 µL	biela, pripravené na použitie
2	Dye 1	1 ×	400 µL	modrá, pripravené na použitie
3	Dye 2	1 ×	400 µL	zelená, pripravené na použitie
4	Dye 3	1 ×	400 µL	žltá, pripravené na použitie
5	Dye 4	1 ×	400 µL	oranžová, pripravené na použitie
6	Dye 5	1 ×	400 µL	červená, pripravené na použitie

Tabuľka 1:Dodané činidlá (Činidlá dodané v súprave postačujú na 3 cykly farebnej
kompenzácie.)

2

5. Pokyny na skladovanie

- Postupujte podľa pokynov na manipuláciu v tabuľke 2 a súpravu uskladnite priamo po použití podľa uvedených informácií.
- Všetky činidlá sa musia uchovávať mimo dosahu svetla pri teplote -16° C až -28 °C a ak nie sú otvorené, môžu sa používať do dátumu exspirácie vytlačeného na štítku. Po dátume exspirácie záruka kvality prestáva platiť.
- Všetky činidlá sa musia pred použitím opatrne rozmraziť (napr. v chladničke pri teplote 2 - 8 °C).
- Opakované zmrazovanie a rozmrazovanie až 3-krát nemá vplyv na vlastnosti testu.
- Počas prípravy PCR všetky činidlá ochlaďte vhodným spôsobom (2 8 °C).

	Teplota skladovania	Maximálna doba skladovania
neotvorené	-16 °C až -28 °C	Možno použiť do vytlačeného dátumu exspirácie
otvorené	-16 °C až -28 °C	3 cykly rozmrazovania a zmrazovania

Tabuľka 2: Podmienky skladovania a informácie

6. Činidlá, ktoré sa vyžadujú, ale nie sú súčasťou dodávky

6.1 Činidlá

Žiadne.

6.2 Laboratórne vybavenie

Na vykonanie testu RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV sa vyžaduje nasledujúce vybavenie:

Vybavenie

Prístroj PCR v reálnom čase: LightCycler[®] 480 II (Roche)

Spotrebný materiál PCR v reálnom čase (doštičky (nízkoprofilové, biele jamky, číry rám), reakčné liekovky, filmy)

Centrifúga s rotorom na doštičky/reakčné liekovky

Vortex

Pipety (0,5 - 20 µL, 20 - 200 µL, 100 - 1 000 µL)

Pipetové špičky s filtrami

Jednorazové rukavice bez prášku

V prípade otázok sa obráťte na spoločnosť R-Biopharm AG na adrese pcr@rbiopharm.de.

Varovania a bezpečnostné opatrenia pre používateľov

Len na diagnostické použitie in vitro.

Tento test smie vykonávať iba kvalifikovaný laboratórny personál. Musia sa dodržiavať usmernenia pre prácu v zdravotníckych laboratóriách.

Pri vykonávaní tohto testu vždy prísne dodržiavajte návod na obsluhu.

Nepipetujte vzorky ani činidlá ústami. Zabráňte kontaktu s porušenou pokožkou a sliznicami.

Pri manipulácii s činidlami a vzorkami noste osobné ochranné prostriedky (vhodné rukavice, laboratórny plášť, ochranné okuliare) a po dokončení testu si umyte ruky.

V priestoroch, kde sa manipuluje so vzorkami, nefajčite, nejedzte ani nepite.

Na zabránenie krížovej kontaminácii a falošne pozitívnym výsledkom je nutné použiť oddelené miestnosti, špeciálne oblečenie a nástroje na extrakciu, prípravu PCR a PCR. Klinické vzorky sa musia považovať za potenciálne infekčné a musia sa náležite zlikvidovať, rovnako ako všetky činidlá a materiály, ktoré prichádzajú do kontaktu s potenciálne infekčnými vzorkami.

Nepoužívajte súpravu po dátume exspirácie. Používatelia sú zodpovední za správnu likvidáciu všetkých činidiel a materiálov po použití. Pri likvidácii dodržiavajte národné predpisy.

Ďalšie podrobnosti o karte bezpečnostných údajov (Safety Data Sheet, SDS) nájdete pod číslom položky na stránke https://clinical.r-biopharm.com/search/.

Pre používateľov v Európskej únii: Všetky závažné nežiaduce udalosti spojené s produktom nahláste spoločnosti R-Biopharm AG a príslušným národným úradom.

8. Protokol na vygenerovanie súboru farebnej kompenzácie na prístroji LightCycler[®] 480 II

8.1 Príprava farebnej kompenzácie

Pred použitím činidlá rozmrazte, premiešajte a krátko odstreďte. Počas pracovných krokov vždy ochlaďte všetky činidlá (2 °C až -8 °C). Na vykonanie cyklu farebnej kompenzácie napipetujte päť reakcií s 20 µL z každého farbiva vrátane pozadia (Blank) do mikrotitračnej doštičky (pozrite si obr. 1).



Obrázok 1: Schéma pipetovania pre farebnú kompenzáciu na prístroji LightCycler[®] 480 II.

Kód súpravy	Činidlo	Množstvo na reakciu	Napipetujte po 20 μL do nasledujúcich jamiek
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

Tabuľka 3: Príprava farebnej kompenzácie na prístroji LightCycler[®] 480 II

Po napipetovaní činidiel uzatvorte mikrotitračnú doštičku optickou fóliou a podľa možnosti odstreďte. Spustite PCR v reálnom čase podľa nastavení zariadenia.

8.2 Nastavenie prístroja PCR

Poznámka: Ak chcete nastaviť formát detekcie, prihláste sa do softvéru ako správca.

1. Po otvorení softvéru kliknite na ikonu "**Tools**" na naprogramovanie formátu detekcie (pozrite si nasledujúci obrázok).



 Otvoria sa nasledujúce okná. V okne Tools zvoľte položku "Detection Formats". Kliknutím na tlačidlo "New" vytvorte nový formát detekcie (pozrite si tabuľku 4) a uložte ho ako "RIDA[®]GENE" (pozrite si nasledujúci obrázok).



Tabuľka 4: Nastavenie detekčného kanála na prístroji LightCycler® 480 II

Kombinácia filtrov			
440/488			
465/510			
533/580			
533/610			
618/660			

Poznámka: Nastavte hodnotu pre Quant Factor, Melt Factor a Integration Time na 1 (predvolené).

Kliknutím na tlačidlo "**Close**" zatvoríte okno Tools.

3. Po naprogramovaní formátu detekcie kliknite na tlačidlo "**New Experiment**" (pozrite si nasledujúci obrázok).



4. Zvoľte formát detekcie "**RIDA[®]GENE**" a zadajte reakčný objem 20 μL (predvolené) (pozrite si nasledujúci obrázok).

Window:	New Experiment				✓ User:	System Admin	
Experi-	[Run Protocol	Data		Run Notes		
ment	Detection Format RIDASGENE			Customize Block	k Size 96 Pla	ite ID Reaction Volum	20 🛨
Subset Editor	Color Comp ID		Lot No	Test ID			

5. Naprogramujte teplotný profil (pozrite si tabuľku 5).

Tabuľka 5: Teplotný profil

			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	none	00:00:30	4,4
Cycling	5 / Quantification	95	none	0:00:15	4,4
	5 / Quantinication	60	single	00:00:30	2,2
TM Analysis		95	none	0:00:01	4,4
	1 / Color Compensation	50	none	00:00:30	2,2
		70	continuous		Acquisitions (per °C) = 1 0.14*

Poznámka: Uistite sa, že počet "Cycles" a "Analysis Mode" je správny.

* Rýchlosť nábehu sa môže mierne líšiť v závislosti od zvoleného formátu detektora.

8

6. Po dokončení programovania by mal pokus vyzerať takto (pozrite si nasledujúci obrázok).



7. Ak chcete naprogramovať rozloženie mikrotitračnej doštičky, prepnite sa na kartu "Subset Editor". Kliknutím na ikonu "Plus" vytvorte novú podmnožinu a zadajte názov rozloženia (napr. Color Compensation). Stlačte a podržte kláves Ctrl a ľavé tlačidlo myši a označte všetky jamky obsahujúce činidlá na mikrotitračnej doštičke (pozrite si obr. 1 a 2). Kliknutím na tlačidlo "Apply" dokončíte podmnožinu. Obrazovka by sa mala zobraziť takto (pozrite si nasledujúci obrázok).

Instrume	ument: Virtual Light's;clev 400 96 System II / Not Connected Database: My Computer (Research) (Roch)																
Window:	New Experiment											_	User:	System Adm	lin		
Experi- ment Subset Editor	Subsets- ID Name Analysis Report 2 Color Compensati Image: Color Compensation of Color Compensation of Color Compensation of Color Compensation of Color Color Compensation of Color		-New Subset	1 settings	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	Ð
Sample Editor			A														F
Analysis			в														()
Report			с														
			D													Ŀ	
			E														
			F														<i>"</i>
			G														
			н													ī	
														Apr	ply Clear	<u>Cancel</u>	
	Apply Template																
\triangle	▲ Warning 13.01.2021 15:21:41 Please a ▲ Warning 13.01.2021 15:21:54 Please a	acti	lvate an in lvate an in	strument befo	re setting up	p a new run. p a new run.										100 -	0

8. Prepnite sa na kartu "Sample Editor". V časti Step 1: "Select Workflow" vyberte možnosť "Color Comp". V časti Step 2: "Select Samples" vyberte predtým nastavenú podmnožinu (Color Compensation). Na dokončenie rozloženia vyberte zodpovedajúci dominantný kanál pre každé činidlo (Blank, Dye 1, Dye 2, Dye 3, Dye 4, Dye 5) v poli "Dominant Channel" (pozrite si tabuľku 6). Pre reakcie s farebným pozadím (Blank) vyberte položku "Water" (pozrite si nasledujúci obrázok).



Tabuľka 6:	Nastavenia	dominantného	kanála pre	činidlá	(LightCycler [®]	480 II)
------------	------------	--------------	------------	---------	---------------------------	---------

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

 Vložte doštičku s pripravenými reakciami do zariadenia. Kliknutím na položku "Experiment" a potom na položku "Start Run" spustíte pokus (pozrite si nasledujúci obrázok).



8.3 Vyhodnotenie a vytvorenie súboru kompenzácie farieb

1. Po dokončení pokusu na prístroji LightCycler[®] kliknite na tlačidlo "**Analysis**" (pozrite si nasledujúci obrázok).



 V dialógovom okne "Create New Analysis" prejdite na položku "Color Compensation". V dialógovom okne, ktoré sa otvorí, vyberte a potvrďte príslušnú podmnožinu (napr. Color Compensation) (pozrite si nasledujúci obrázok).



3. Otvorí sa analýza; kliknite na položku "**Calculate**" a potom na položku "**Save CC Object**" (pozrite si nasledujúci obrázok).



4. Uložte súbor kompenzácie farieb ako "**RIDA[®]GENE CCIV**" do priečinka "**CCC**" (pozrite si nasledujúci obrázok).

Save Color Compensation	
E Sect	
- Sustem Admin	
B-C Experiments	
	-
de Calsonia Data	
Met Std	
Query	
Sid Curve	
la⊣ Lemplates	
	1
	1
	1
ame 2021 CC IV 11188 (CC)	
	\otimes \otimes

Tento súbor je následne k dispozícii pre ďalšie pokusy na prístroji LightCycler[®] 480 II. Generovanie súboru kompenzácie farieb je teraz dokončené.

8.4 Použitie súboru kompenzácie farieb

Ak chcete použiť súbor kompenzácie farieb, otvorte daný pokus RIDA®GENE real-time PCR a na karte "**Experiment**" v časti "**Data**" načítajte požadovanú kompenzáciu farieb. V rozbaľovacej ponuke "**Color Comp (Off)**" vyberte možnosť "**in Database**" a potom uložený súbor kompenzácie farieb (pozrite si obr. 2).



Obrázok 2: Použitie farebnej kompenzácie

Po zvolení možnosti farebnej kompenzácie sa tlačidlo "**Color Comp (Off)**" zmení na "**Color Comp (On)**". Vybraná farebná kompenzácia sa automaticky použije na všetky filtre analýzy. Cyklus RIDA[®]GENE real-time PCR možno teraz analyzovať ako zvyčajne.

Poznámka: Súbor farebnej kompenzácie je špecifický pre každý prístroj LightCycler[®] 480 II. Pri výmene zariadenia alebo oprave optickej jednotky sa vyžaduje nový súbor farebnej kompenzácie.

9. História verzie

Číslo verzie	Časť a označenie
2021-09-09	Predchádzajúca verzia
2022-02-03	Všeobecná revízia: 4. Dodané činidlá 5. Pokyny na skladovanie 6. Činidlá, ktoré sa vyžadujú, ale nie sú súčasťou dodávky 7. Varovania a bezpečnostné opatrenia pre používateľov

10. Vysvetlenie symbolov

Všeobecné symboly

Image: Description of the section	IVD	Na diagnostické použitie in vitro
LorČíslo šarže□Použite pred↓Teplota skladovaniaREFČíslo položky□Počet testov□Dátum výroby↓Výrobca	Ĩ	Dodržiavajte návod na obsluhu
☑Použite pred✔Teplota skladovaniaℝEFČíslo položky☑Počet testov☑Dátum výroby✔Výrobca	LOT	Číslo šarže
✔Teplota skladovania REF Číslo položky▼Počet testov✓Dátum výroby✓Výrobca	Σ	Použite pred
REF Číslo položky▷Počet testov□Dátum výroby□Výrobca	X	Teplota skladovania
▼ Počet testov ▶ Dátum výroby ▶ Výrobca	REF	Číslo položky
✓ Dátum výroby ✓ Výrobca	\₹	Počet testov
Výrobca	<u>سا</u>	Dátum výroby
		Výrobca

Symboly špecifické pre daný test

Blank	Porovnávací roztok
Dye 1	Farbivo 1
Dye 2	Farbivo 2
Dye 3	Farbivo 3
Dye 4	Farbivo 4
Dye 5	Farbivo 5