

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest
BIOTEC

Colour Compensation

Handbook for the following references/
Manual para las siguientes referencias:

VIASURE Colour Compensation Kit

VS-CCK2



ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE Colour Compensation Kit está diseñado para generar un archivo de compensación de color en los cicladores de PCR en tiempo real Light Cycler® 480 I / II y el analizador Cobas z480 (Roche). Esta prueba está diseñada para usarse como un método de calibración para compensar la fluorescencia de sangrado (fenómeno de diafonía) para garantizar una interpretación adecuada de los resultados de los ensayos multiplex.

2. Principio del procedimiento

Los ensayos de PCR en tiempo real multiplex permiten la amplificación y detección simultánea de dos o más objetivos diferentes en cada reacción de PCR, ahorrando tiempo y volumen de muestra en comparación con los ensayos monoplex. Como consecuencia, los espectros de emisión de los diferentes colorantes pueden superponerse y causar el efecto de "cruce". En este fenómeno, las señales de fluorescencia de un tinte se recogen en canales adyacentes, lo que conduce a resultados falsos positivos.

VIASURE Color Compensation Kit contiene en cada pocillo todos los componentes en un formato estabilizado (cebadores / sondas específicos, dNTPs, tampón, enzimas) necesarios para ejecutar ocho reacciones de PCR en tiempo real de una sola réplica diferentes.

3. Reactivos proporcionados

El kit de compensación de color VIASURE incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla 1.

Reactivo / Material	Descripción	Cantidad
<i>Tiras de compensación de color, que incluyen cinco tiras y una cuadrícula de marco de carcasa blanca</i>		
FAM 8-well strip	Una mezcla de enzimas, sondas de cebadores, tampón, dNTPs y estabilizadores para la detección de FAM	1 x 8-well strip
HEX 8-well strip	Una mezcla de enzimas, sondas de cebadores, tampón, dNTPs y estabilizadores para la detección de HEX	1 x 8-well strip
ROX 8-well strip	Una mezcla de enzimas, sondas de cebadores, tampón, dNTPs y estabilizadores para la detección de ROX	1 x 8-well strip
Cy5 8-well strip	Una mezcla de enzimas, sondas de cebadores, tampón, dNTPs y estabilizadores para la detección de Cy5	1 x 8-well strip
Blank 8-well strip	Una mezcla de enzimas, tampón, dNTPs y estabilizadores para la detección de blanco	1 x 8-well strip
Buffer de rehidratación	Solución para reconstituir el producto estabilizado.	1 vial x 1.8 mL
Compensación de color Control positivo	ADN liofilizado sintético no infeccioso	2 viales
Agua libre de RNase/DNAse	Agua libre de RNase/DNAse	1 vial x 1 mL
Control negativo	Control sin plantilla	1 vial x 1 mL
Tira de 8 tapas desprendibles	Tapas ópticas para sellar pozos durante el ciclo térmico	6 X 8-cap strip

Table 1. Reagents and materials provided in VIASURE Colour Compensation Kit with Ref. VS-CCK2.



4. Reactivos y equipos a suministrar por el usuario.

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para su uso pero que no se incluyen en el Kit de compensación de color VIASURE.

- Instrumento de PCR en tiempo real (termociclador).
- Centrifugar para tubos de 1,5 ml y tiras de pocillos de PCR o placas de 96 pocillos (si están disponibles).
- Vortex.
- Micropipetas (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.

5. Condiciones de transporte y almacenamiento.

- Los kits se pueden enviar y almacenar a 2-40°C hasta la fecha de caducidad que figura en la etiqueta.
- Una vez que el control positivo ha sido resuspendido, guárdelo a -20°C. Recomendamos separarlo en aliquotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. El control positivo ha sido validado como aún estable después de 6 ciclos de congelación-descongelación.
- Mantenga los componentes alejados de la luz solar.

6. Precauciones para los usuarios

- El producto está diseñado para uso exclusivo de usuarios profesionales, como profesionales y técnicos de laboratorio o de salud, capacitados en técnicas de biología molecular.
- No utilice pasada la fecha de vencimiento.
- No use reactivos si las bolsas protectoras están abiertas o rotas al llegar.
- No use reactivos si el desecante no está presente o está roto dentro de las bolsas de reactivos.
- No retire el desecante de las bolsas de reactivo una vez que esté abierto.
- Cierre rápidamente las bolsas protectoras de reactivos con el sello de cremallera después de cada uso (Ref. VS-CCK2). Elimine el exceso de aire en las bolsas antes del sellado.
- No utilice reactivos si la lámina se ha roto o dañado.
- No mezcle reactivos de diferentes sobres y / o kits y / o lotes y / u otro proveedor.
- Proteger los reactivos contra la humedad. La exposición prolongada a la humedad puede afectar el desempeño del producto.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Debe comenzar en el Área de extracción y luego pasar al Área de amplificación y detección. No devuelva muestras, equipos y reactivos al área en la que se realizó el paso anterior.
- Siga las buenas prácticas de laboratorio. Use ropa protectora, use guantes desechables, gafas y máscara. No coma, beba ni fume en el área de trabajo. Una vez que termine la prueba lávese las manos.
- Se recomienda la descontaminación regular de equipos de uso común, especialmente micropipetas y superficies de trabajo.
- Consulte las hojas de datos de seguridad, previa solicitud.
- Consulte el manual de referencia de cada instrumento de PCR en tiempo real para obtener advertencias,



precauciones y procedimientos adicionales.

7. Procedimiento de prueba

7.1. Preparación de la placa de compensación de color.

7.1.1. Control positivo liofilizado

Los controles positivos de compensación de color (viales rojos) se proporcionan en un formato liofilizado, por lo que es necesario reconstituirlos agregando 100 µL de agua libre de ARNasa / ADNs_a (vial blanco) en cada vial y agitar completamente. La recomendación es abrirlos y manipularlos en un área de laboratorio separada, lejos de los otros componentes.

7.1.2. Pipetear una placa de compensación de color

Para este experimento de Compensación de color es necesario pipetear 8 reacciones para cada tinte de fluorescencia, también para el blanco.

- 1) Despegue el sello protector de aluminio de las tiras y reconstituya todos los pocillos provistos con el kit agregando 15 µl de tampón de rehidratación (vial azul).
- 2) Agregue 5 µl de Control Negativo (vial violeta) a cada pocillo de la tira en blanco (Figura 1 Puntos azules). Tenga cuidado de cambiar las puntas después de cada pipeteo.
- 3) Agregue 5 µl de control positivo de compensación de color (vial rojo) a cada pocillo de las tiras FAM (Figura 1 puntos rojos), HEX (puntos verdes), ROX (puntos rosas) y Cy5 (puntos grises).

Tenga cuidado de cambiar las puntas después de cada pipeteo.

- 1) Cierre los pocillos con las tapas provistas con el kit y cargue la tira en el termociclador.

Fig 1: Esquema de placa para experimento de compensación de color

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	●	○	●	○	●	○	●	○	●	○	○
B	○	●	○	●	○	●	○	●	○	●	○	○
C	○	●	○	●	○	●	○	●	○	●	○	○
D	○	●	○	●	○	●	○	●	○	●	○	○
E	○	●	○	●	○	●	○	●	○	●	○	○
F	○	●	○	●	○	●	○	●	○	●	○	○
G	○	●	○	●	○	●	○	●	○	●	○	○
H	○	●	○	●	○	●	○	●	○	●	○	○



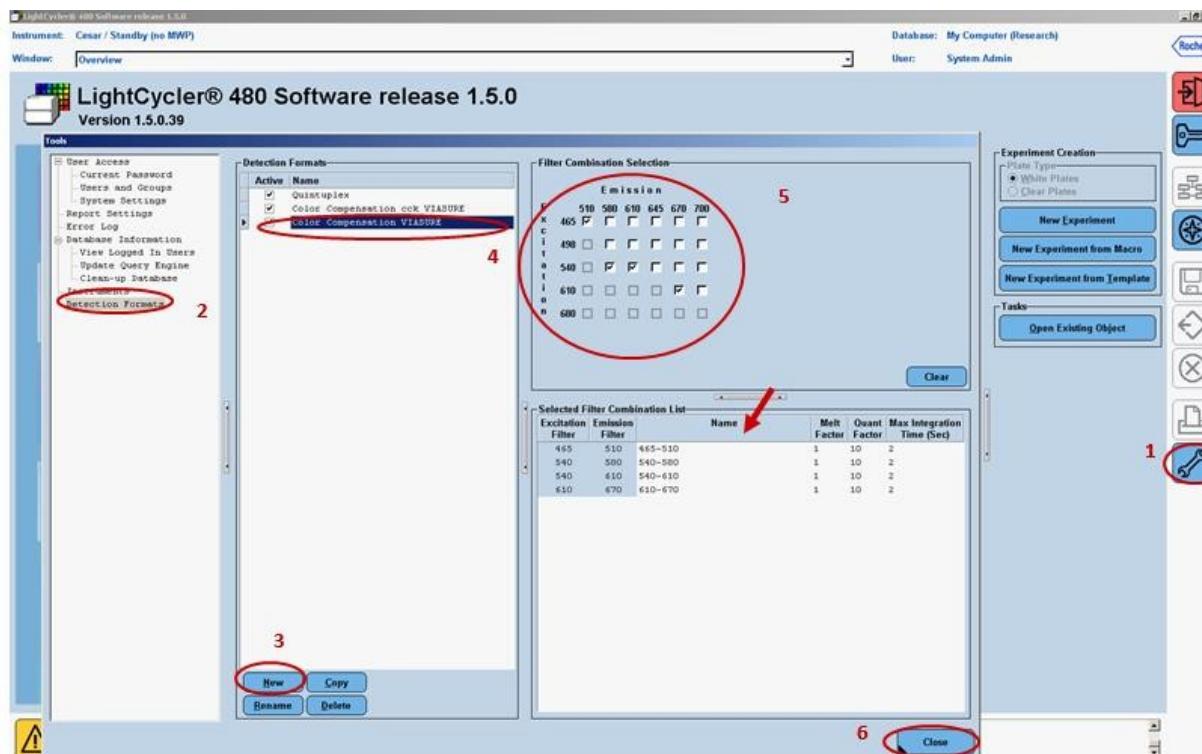
7.2. Generación de formato de detección específico

Antes de crear un experimento de compensación de color, es necesario generar un formato de detección específico, con la combinación de filtro correcta. En la ventana "Descripción general" del software, haga clic en el icono "Herramientas" (1) y seleccione "Formatos de detección" (2), haga clic en "Nuevo" (3) y elija su nombre experimento (4) y combinación de filtros (5). Asegúrese de establecer "Melt Factor" en 1, "Quant Factor" en 10 y "Max Integration Time" en 2. Haga clic en el botón "Cerrar" para guardar y salir.

La longitud de onda requerida según el termociclador se muestra en la tabla a continuación.

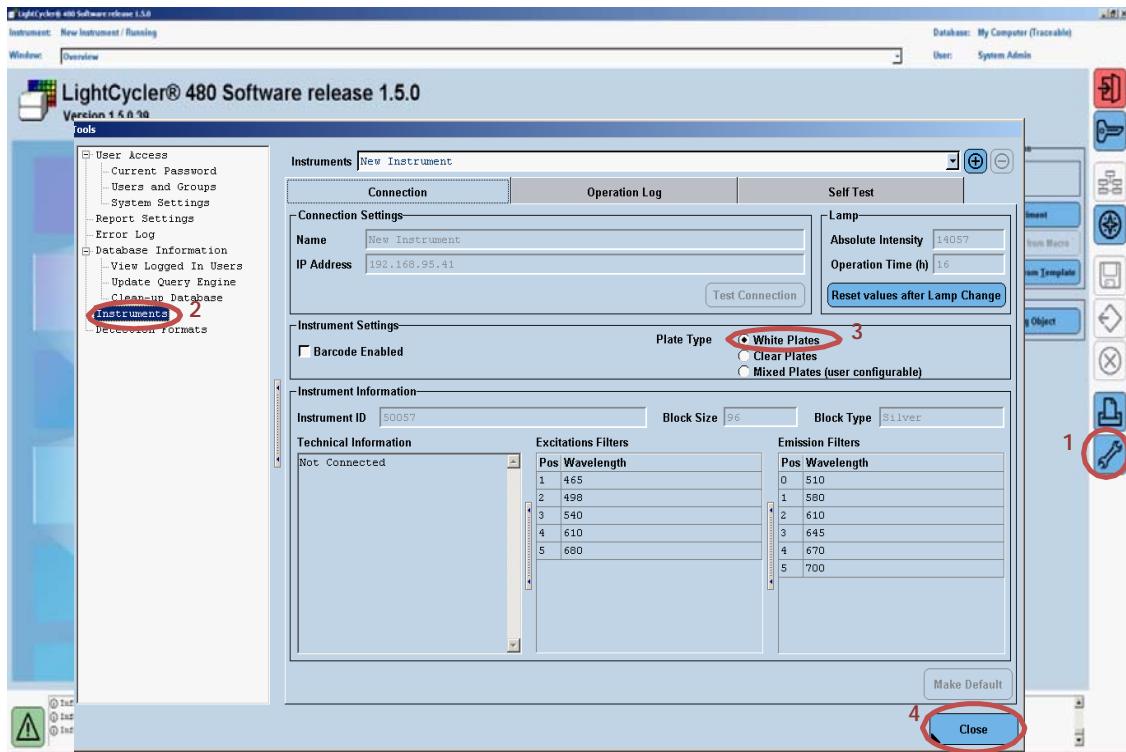
Combinación de filtros			Nombre del canal
LightCycler® 480I	LightCycler® 480II	Cobas z 480	
483/533	465/510	465/510	FAM
523/568	533/580	540/580	HEX
558/610	533/610	540/610	ROX
615/670	618/660	610/670	Cy5

Table 2. Combinación de filtros



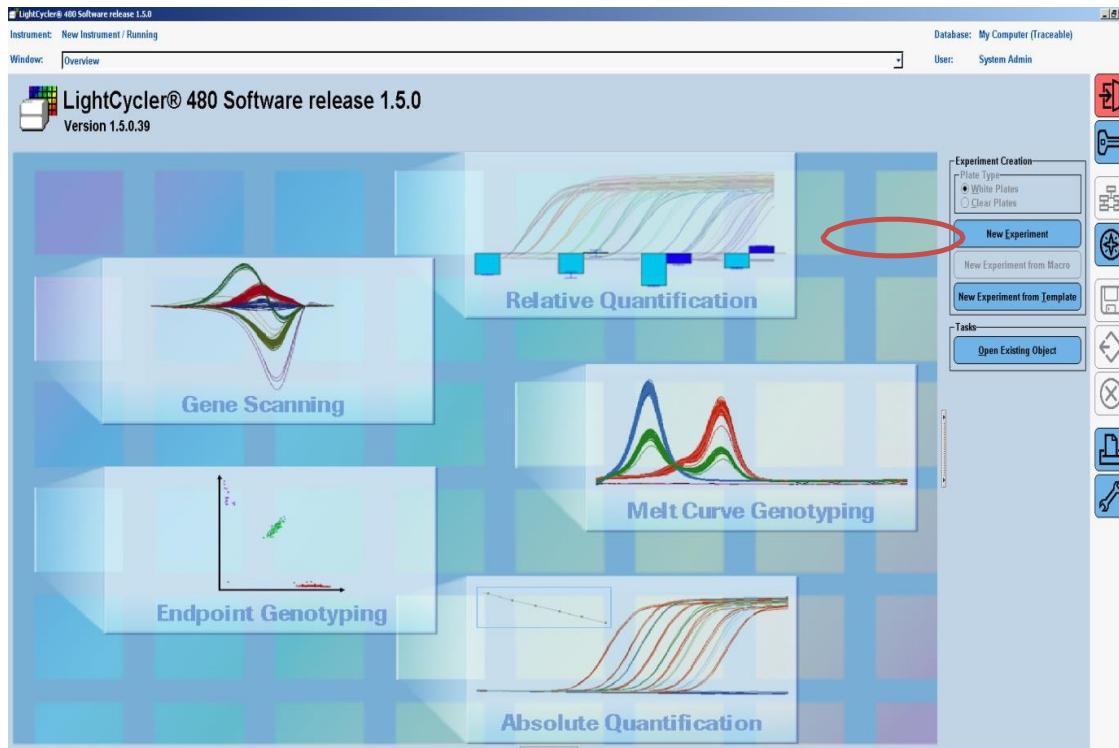
7.3. Ajuste del instrumento

En la ventana "Descripción general" del software, haga clic en el icono "Herramientas" (1) y seleccione "Instrumentos" (2). Debe elegir "Placas blancas" (3) (no transparente) porque este tipo de pocillos se utilizan en este kit de compensación de color. Se recomienda utilizar el mismo tipo de placa en sus siguientes experimentos.

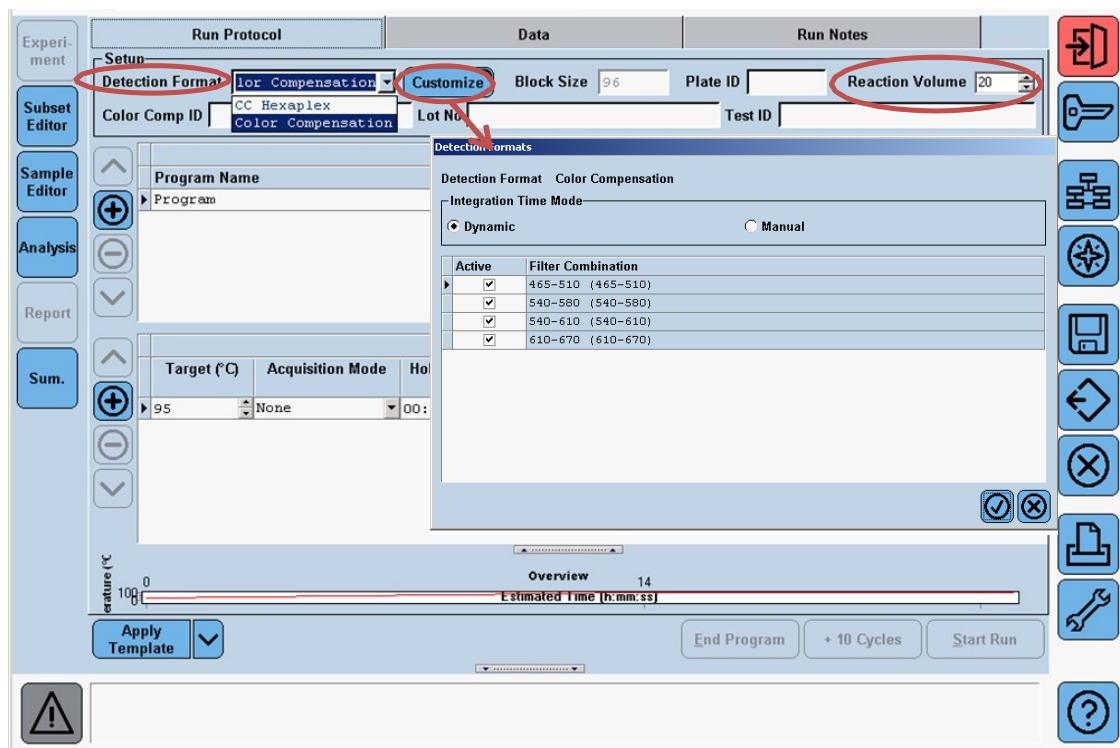


7.4. Crear un protocolo de ejecución

En la ventana "Descripción general" del software, haga clic en "Nuevo experimento".



En "Configuración", seleccione el formato de detección de "Compensación de color" creado en la sección 8.1. Haga clic en "Personalizar" Se ha elegido el botón para comprobar la combinación de filtro correcta. Además, ingrese un volumen de reacción de 20 µl.



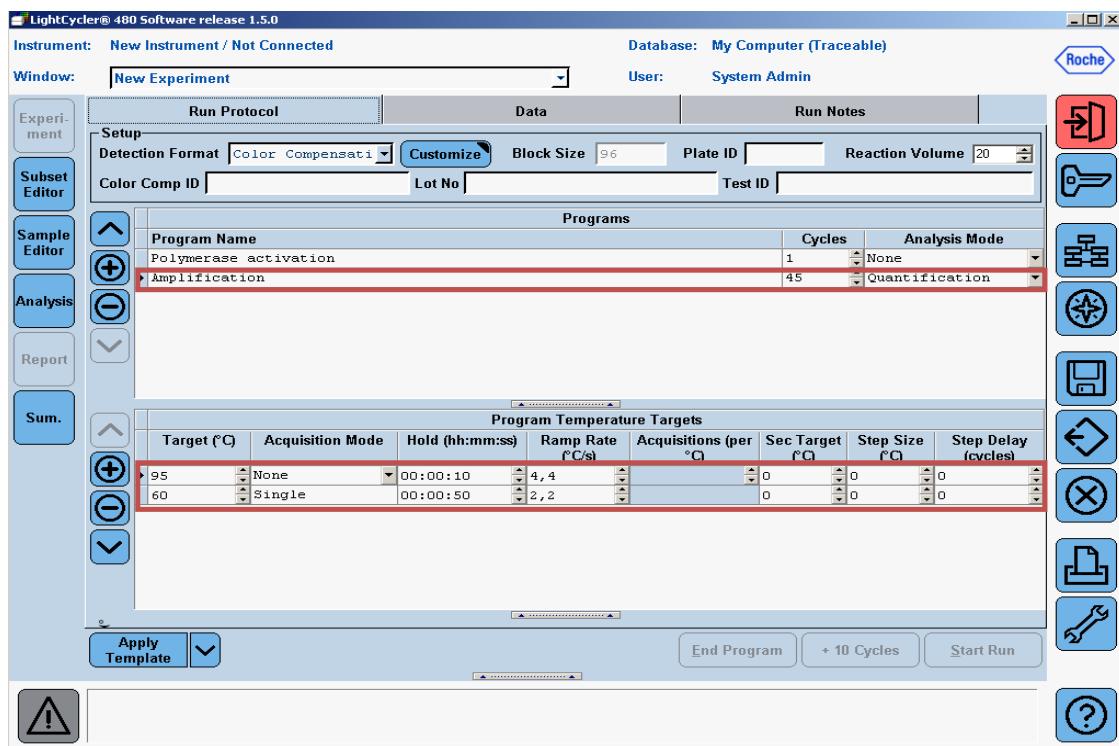
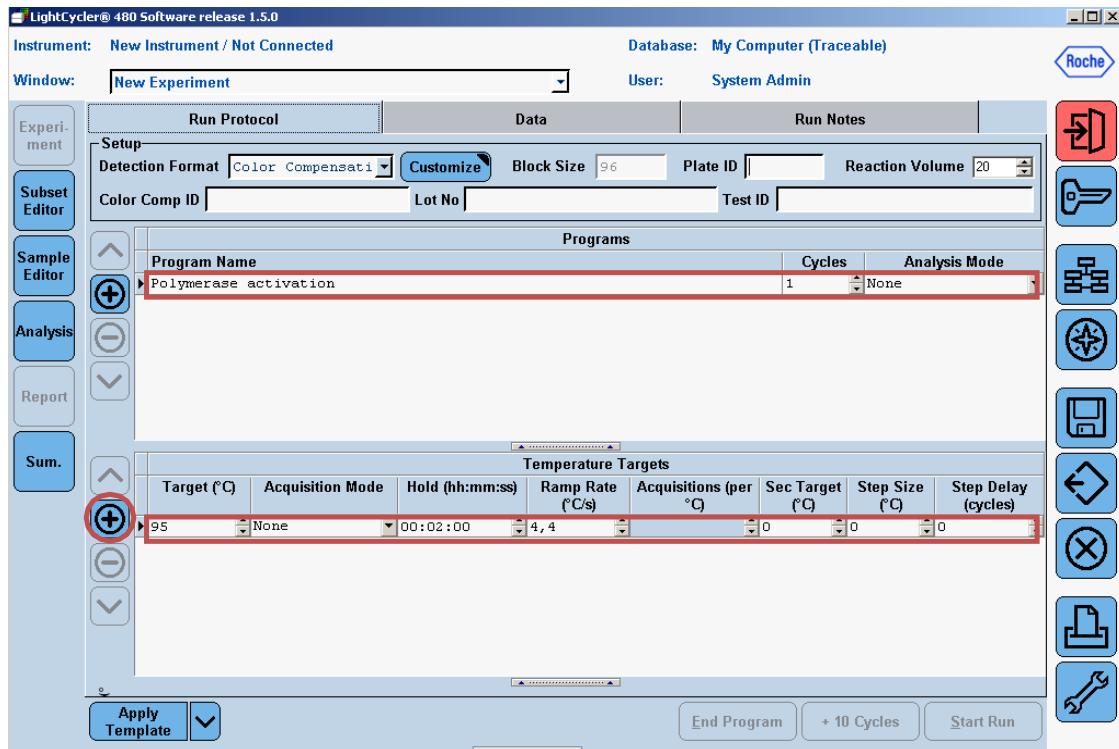
Una vez que se selecciona el formato de detección, programe el termociclador de la siguiente manera:

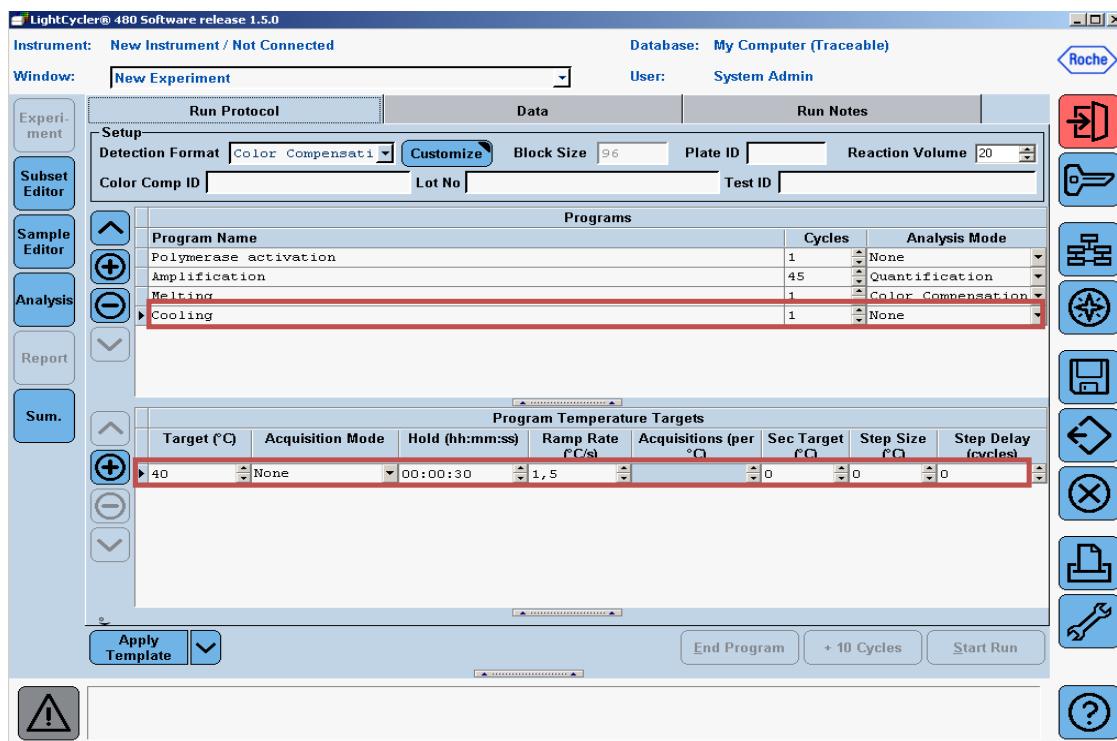
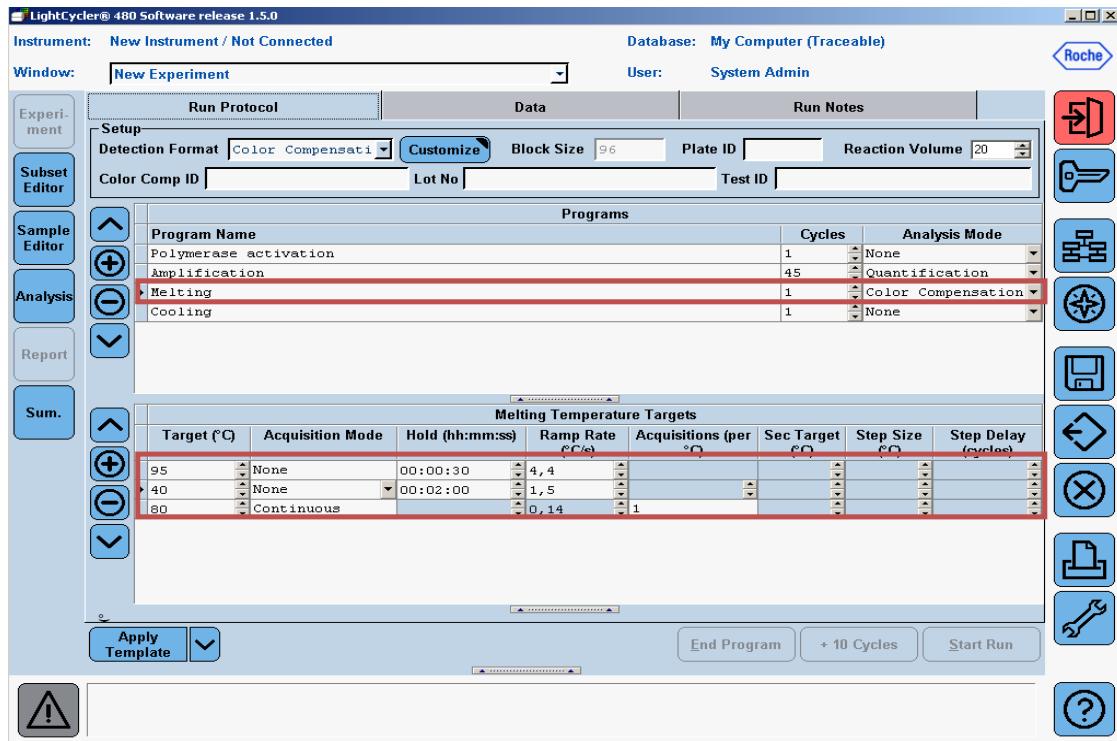
Program Name	Cycles	Analysis Mode	Target [°C]	Acquisition Mode	Hold [hh:mm:ss]	Ramp Rate (°C/s)
Polymerase activation	1	None	95°C	None	00:02:00	4.4
Amplification	45	Quantification	95°C	None	00:00:10	4.4
			60°C	Single	00:00:50	2.2
Melting	1	Colour compensation	95°C	None	00:00:30	4.4
			40°C	None	00:02:00	1.5
			80°C	Continuous		0.14 (Acquisitions per °C = 1)
Cooling	1	None	40°C	None	00:00:30	1.5

Table 3. Protocolo PCR

Configure cada programa: cambie el nombre del programa, el número de ciclos, el modo de análisis, la temperatura, el modo de adquisición, el tiempo y la velocidad de rampa. Para agregar más programas, haga clic en el botón superior "Más", así como para agregar más pasos dentro de cada programa, haga clic en el otro botón "Más".

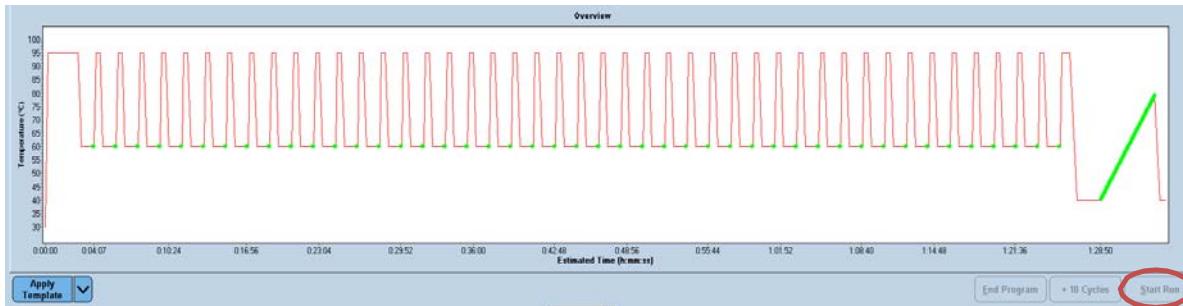






Asegúrese de que el perfil térmico de su experimento tenga el aspecto que se muestra a continuación.

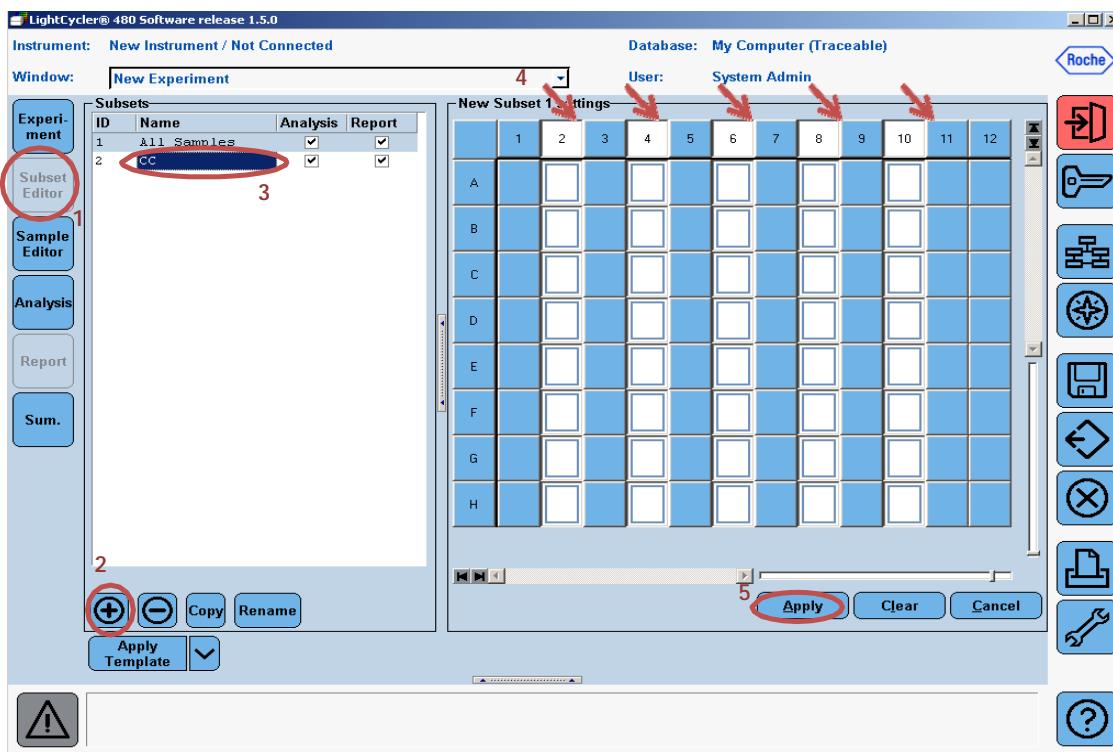




Una vez que haya introducido la placa de compensación de color en el termociclador y haya creado el protocolo de ejecución como se indicó anteriormente, puede hacer clic en el botón "Iniciar ejecución" para iniciar la PCR o continuar con la configuración de la muestra. Después de hacer clic en "Iniciar ejecución", debe escribir el nombre de la placa, hacer clic en la carpeta "Experimento" y hacer clic en Aceptar para guardar el experimento en esa carpeta.

7.5. Ajuste de muestra

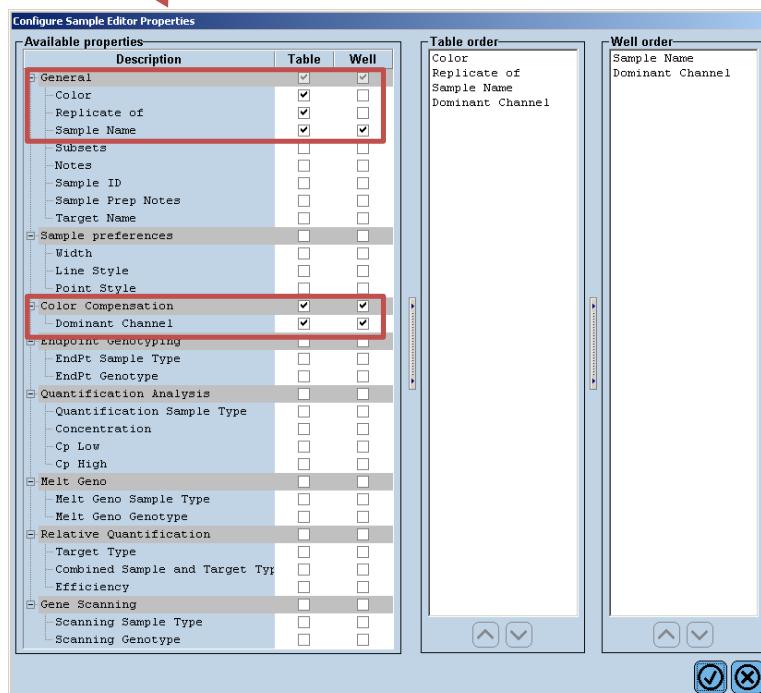
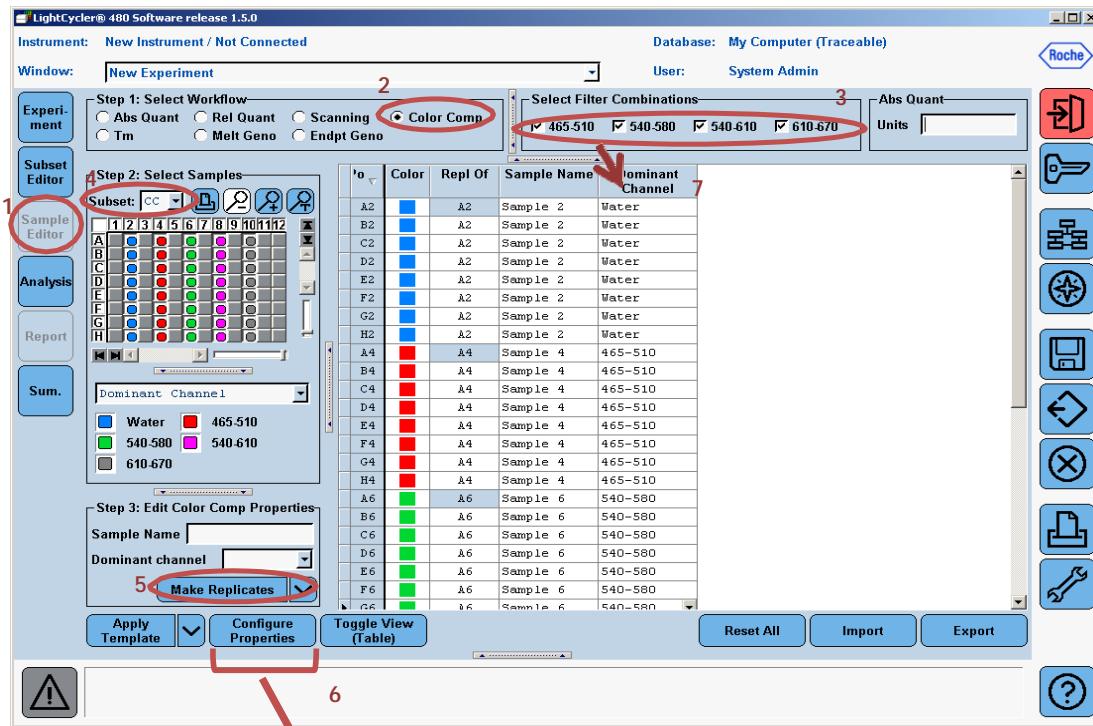
Puede crear un nuevo subconjunto de su placa en el botón "Subset Editor" (1). Haga clic en el icono "Más" (2), escriba un nombre de subconjunto (3) y seleccione los pocillos incluidos en la compensación de color (4) (columnas 2, 4, 6, 8, 10. Use el botón de control en su teclado para seleccionar varias columnas). Haga clic en "Aplicar" (5) para guardar el nuevo subconjunto.



7.6. Editor de muestra

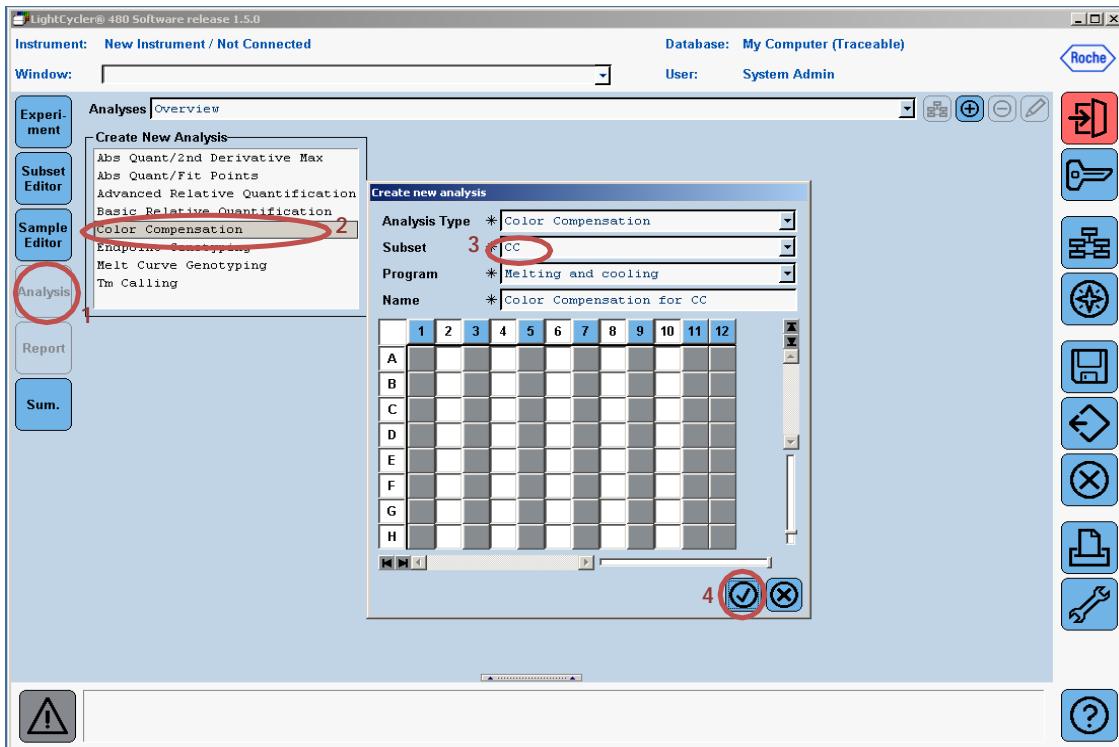
En el botón "Editor de muestras" (1) puede indicar más información sobre las muestras y su ubicación en la placa. En el "Paso 1: Seleccionar flujo de trabajo", haga clic en "Color Comp" (2) y marque la combinación de filtro correcta (3). En "Paso 2: Seleccione Muestras" elija el subconjunto CC creado (4) en la sección 8.3. En "Paso 3:

"Editar propiedades de compilación de color" existe la posibilidad de hacer réplicas, haga clic en una columna y presione el botón "Hacer réplicas" (5). Asegúrese de hacer clic en el botón "Configurar propiedades" (6) que "Canal dominante" está seleccionado y aparece en la tabla. Agregue el canal dominante correspondiente (7) (vea la imagen a continuación) a cada pocillo.



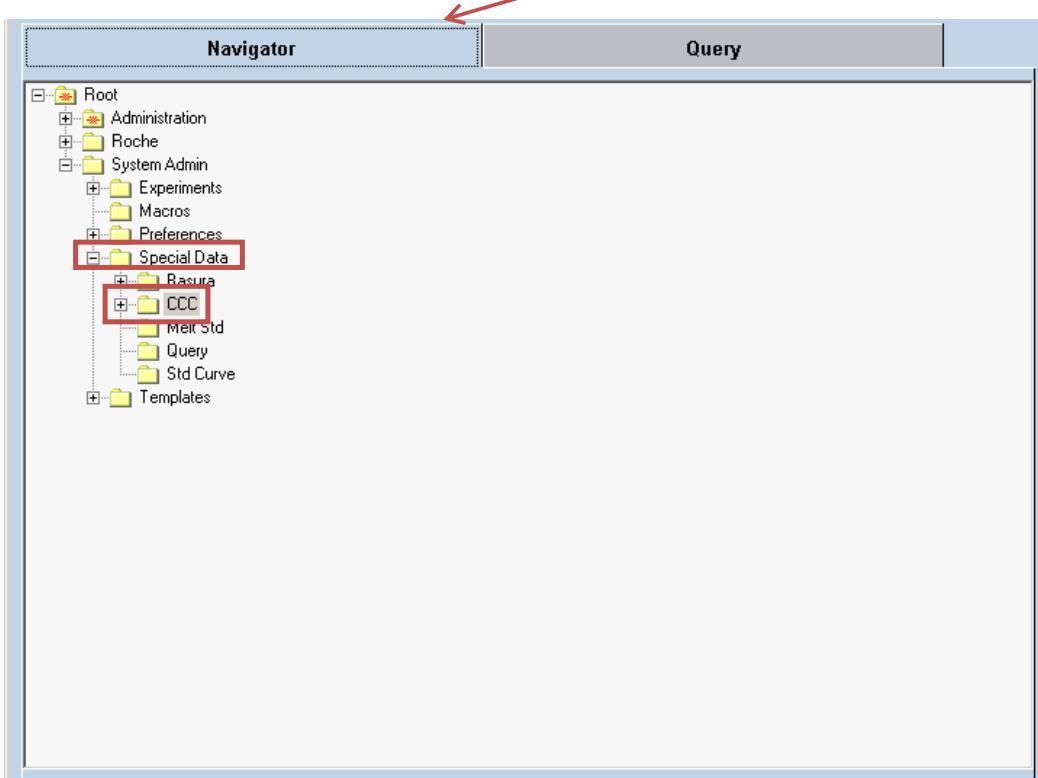
7.7. Analysis

Una vez finalizada la ejecución, haga clic en el botón "Análisis" (1) y en "Crear nuevo análisis" seleccione "Compensación de color" (2). En la ventana que aparece, seleccione el subconjunto CC creado (3) y haga clic en Aceptar (4).



En la ventana "Análisis", haga clic en el botón "Calcular" (1) para realizar el análisis de Compensación de color y guárdelo como objeto CC (2) para poder aplicar este ensayo de Compensación de color en sus experimentos multiplex si se han realizado en el mismo termociclador. Guarde el objeto CC en la carpeta "CCC", que se encuentra dentro de la carpeta "Datos especiales".

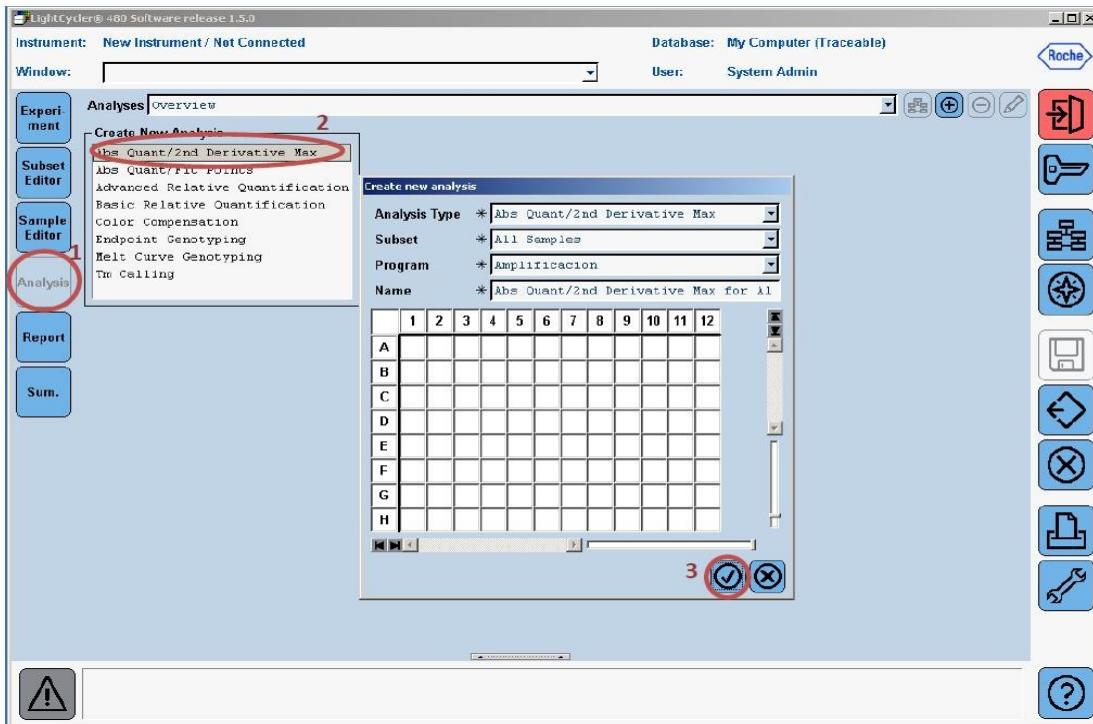




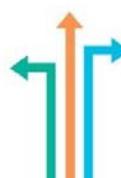
7.8. Aplicando Compensación de Color

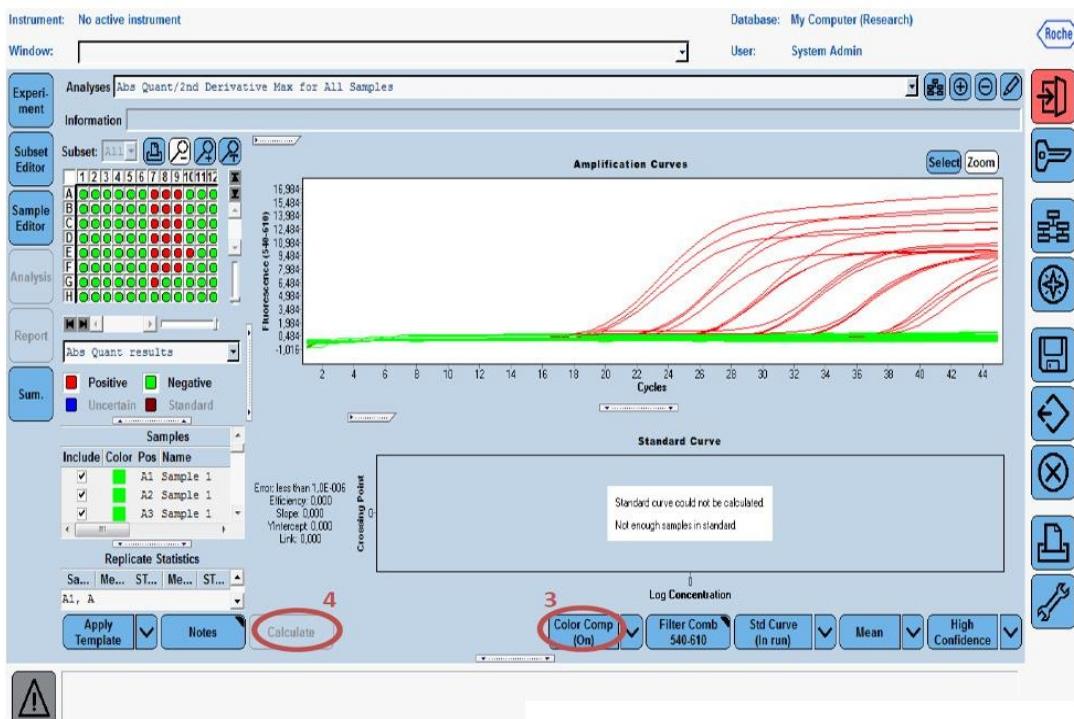
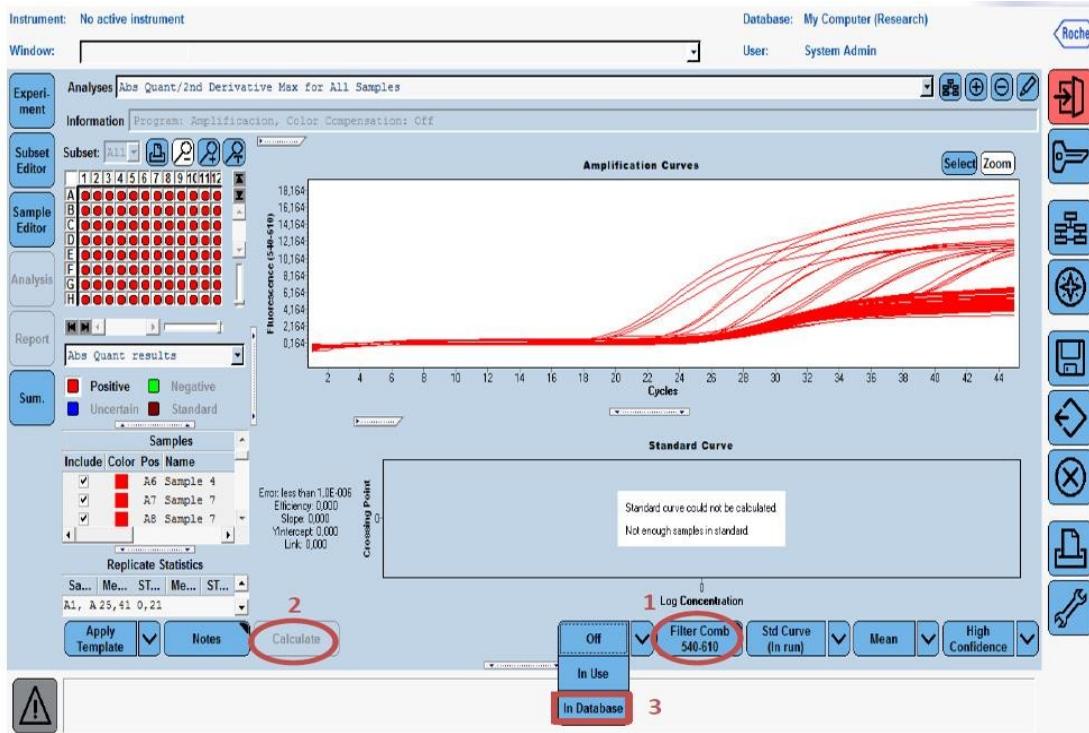
Para verificar si la Compensación de color creada es efectiva, puede abrir un ensayo múltiple, que se realizó en el mismo termociclador y hacer clic en el botón "Análisis" (1):

- Puede elegir el primer análisis "Abs Quant / 2nd Derivate Max" (2) y hacer clic en Aceptar (3).



Si seleccionamos la combinación de filtro que queremos analizar (1) (en este caso, el canal ROX: 540-610) y hacemos clic en el botón "Calcular" (2), podemos observar que todas las muestras fueron positivas. Para aplicar la compensación de color, es necesario hacer clic en "En la base de datos" (3) en el botón "Compensación de color" y seleccionar el archivo de compensación de color apropiado. Después de hacer clic en "Calcular" (4), podemos observar que la cantidad de muestras positivas ha cambiado. La "diafonía" de fluorescencia se ha compensado después de aplicar el archivo de compensación de color.

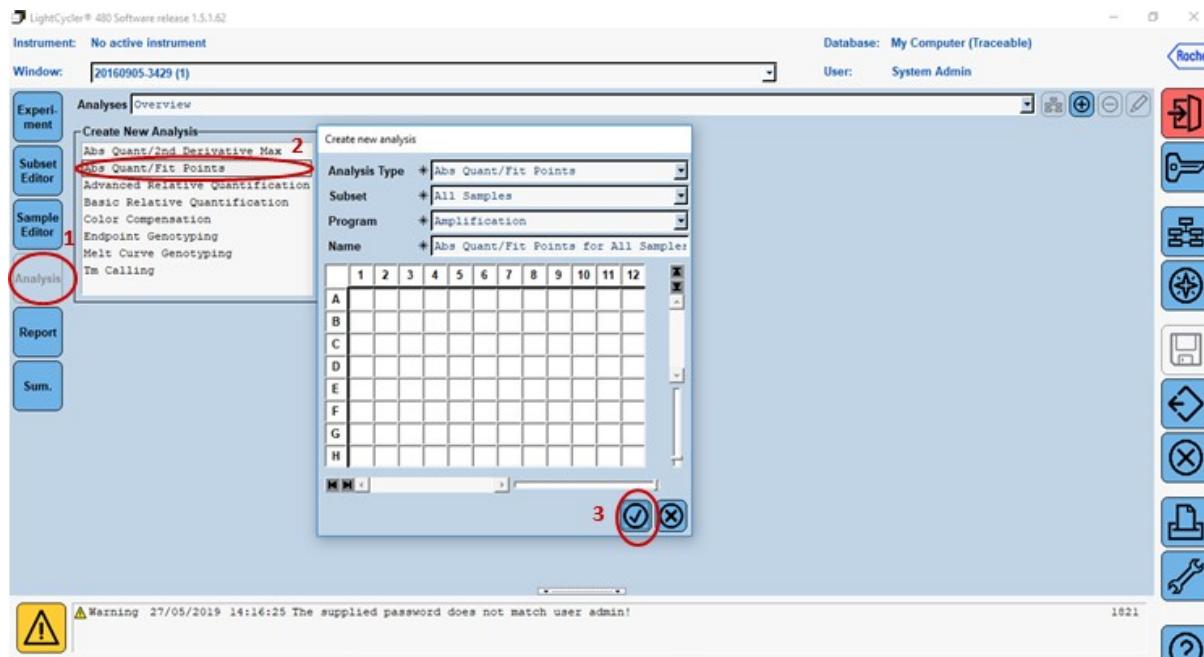




- Puede elegir el segundo análisis "Abs Abs / Puntos de ajuste" (2) y hacer clic en Aceptar (3).

Recomendamos utilizar el método "Abs Quant / Fit Points" para el análisis para evitar la falta de muestras positivas bajas o tener falsos positivos.

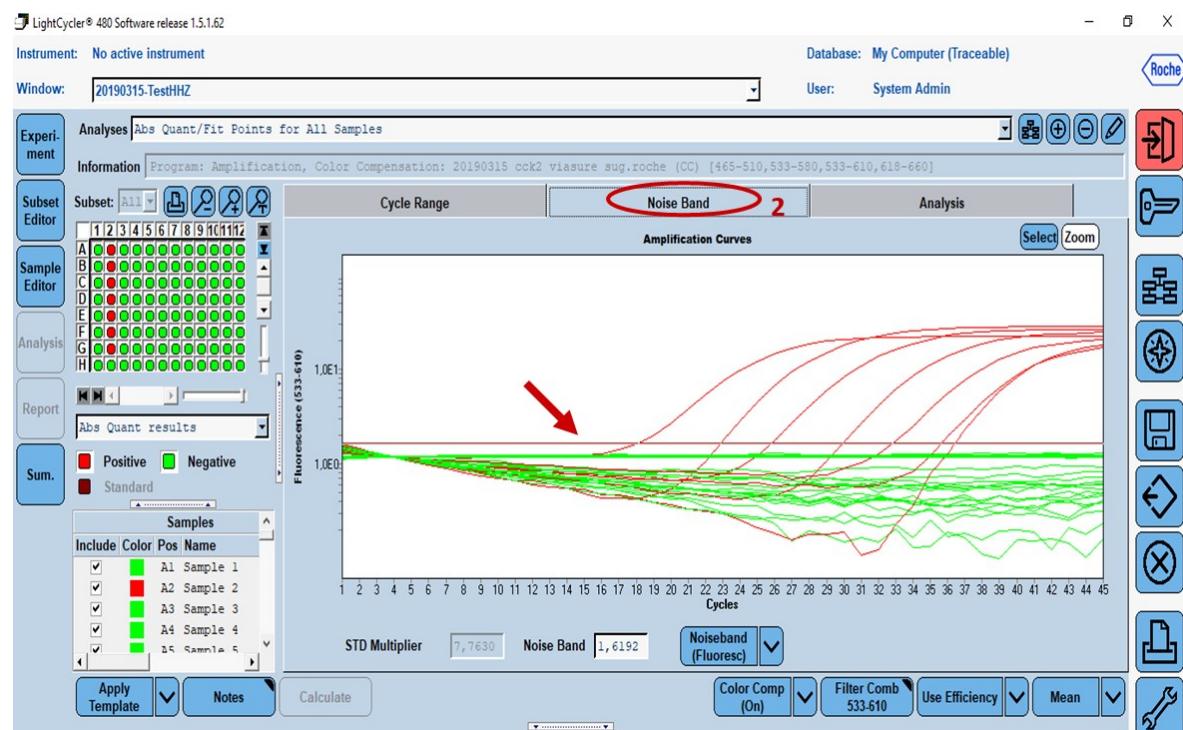
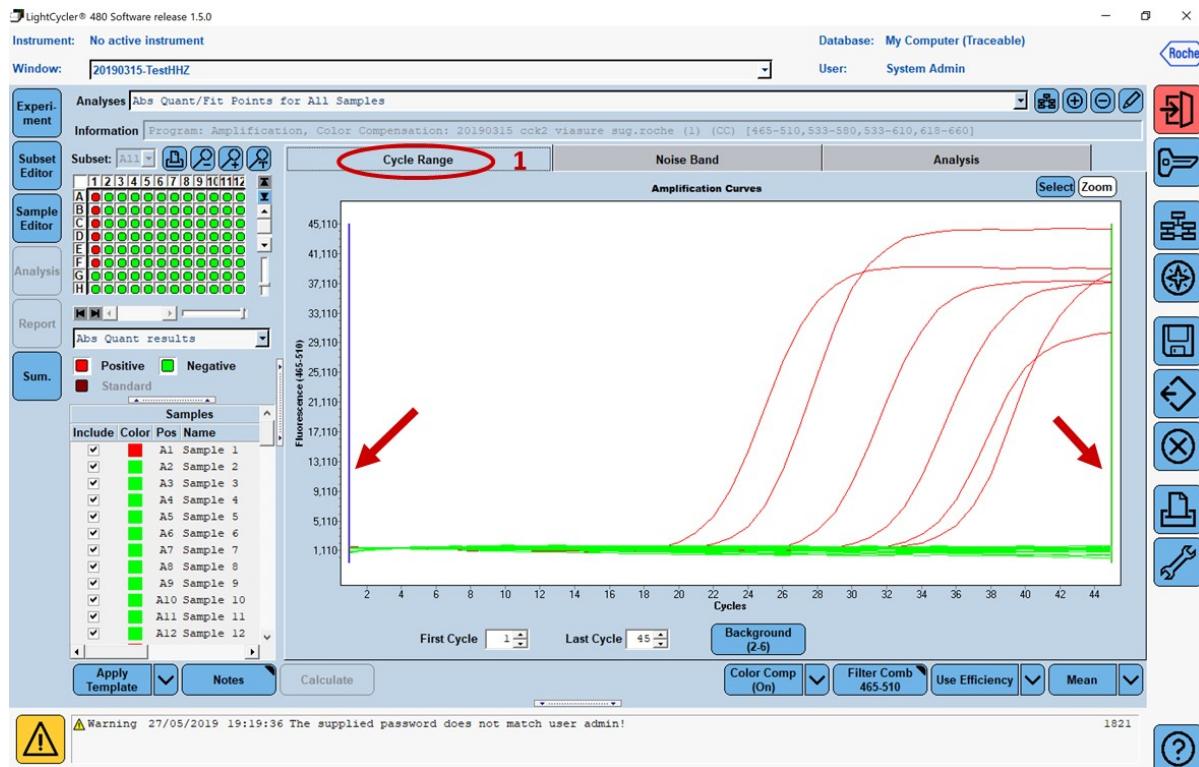
En caso de que utilice el método "Abs Quant / 2nd Derivative Max", asegúrese de verificar muestras inciertas con el método "Abs Quant / Fit Points".

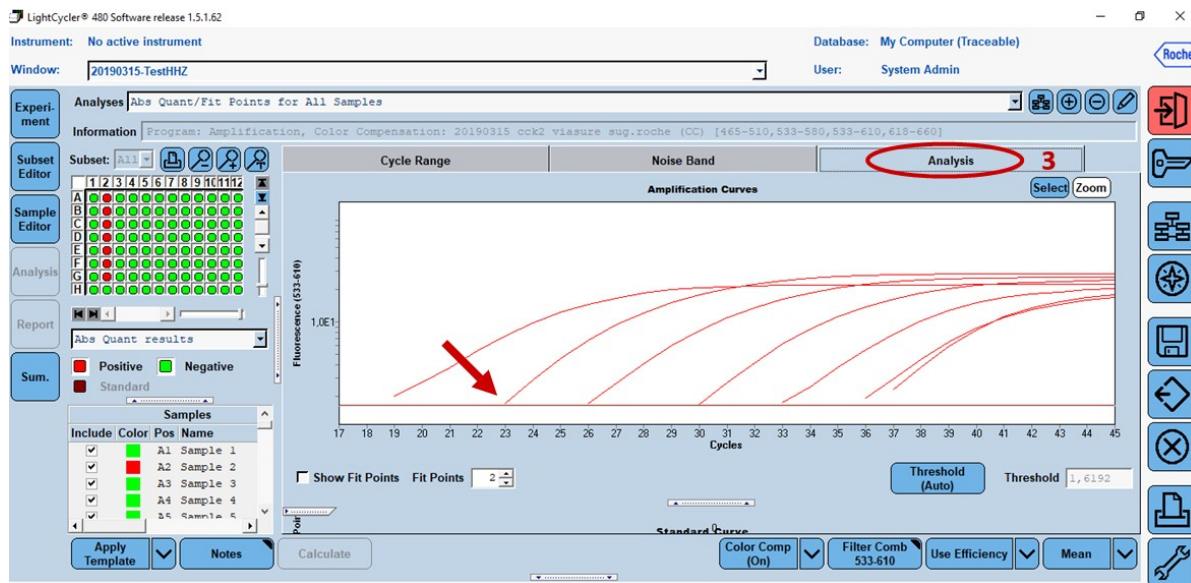


De la misma manera que en el primer análisis, debe seleccionar la combinación de filtros que desea analizar y hacer clic en el botón "Calcular". Para aplicar la compensación de color, es necesario hacer clic en "En la base de datos", en el botón "Compensación de color" y seleccionar el archivo de compensación de color apropiado. Después de hacer clic en "Calcular". Puede observar cómo ha cambiado el número de muestras positivas. La "diafonía" de fluorescencia se ha compensado después de aplicar el archivo de compensación de color.

Con los "Abs Quant / Fit Points" puede verificar el "Rango del ciclador" (1), la "Banda de ruido" (2) y el "Análisis" (3) para ajustar los parámetros de la línea de base y el umbral Una vez que haya ajustado estos parámetros haga clic nuevamente en el botón "Calcular".







8. Limitaciones de la prueba

- Aunque este ensayo es adecuado para usar con Light Cycler® 480 I / II y el analizador Cobas z480 (Roche), solo se ha validado completamente con el analizador Cobas z480 (Roche).
- La compensación de color es específica del instrumento. No puede compensar el color de un experimento de PCR multiplex si se ha realizado en un termociclador diferente al experimento de compensación de color.
- Este archivo de compensación de color es específico para una combinación particular de **reportes de tintes**.

9. Control de calidad

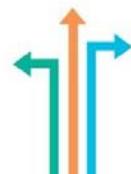
Los resultados mostrados en la sección 7.8 prueban la eficacia de la prueba ya que la fluorescencia de sangrado fue eliminada después de aplicar el archivo de compensación de color.

10. Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico *in vitro*

IVD	<i>In vitro diagnostic device</i> Producto para diagnóstico <i>in vitro</i>		Keep dry Almacenar en lugar seco		Use by Fecha de caducidad		Manufacturer Fabricante	LOT	Batch code Número de lote
	Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso		Temperature limitation Limitación de temperatura		Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test	DIL	Sample diluent Diluyente de muestra	REF	Catalogue number Número de referencia

- LightCycler® and Cobas are a registered trademark of Roche.

Revision: May 2019





CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)
www.certest.es



VIASURE online

F-362 rev01

VIASURE



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC