RIDA®GENE Color Compensation Kit IV

REF PG0004

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

1. Application

Pour usage diagnostique *in vitro*. Le RIDA®GENE Color Compensation Kit IV est utilisé pour l'étalonnage des couleurs des tests de PCR en temps réel RIDA®GENE 2-plex et supérieur sur le LightCycler® 480 II. Le RIDA®GENE Color Compensation Kit IV peut être utilisé pour générer un fichier de compensation de couleur pour permettre l'analyse des tests qualitatifs et quantitatifs de PCR en temps réel RIDA®GENE 2-plex et supérieur sur le LightCycler® 480 II.

Ce produit est destiné à un usage professionnel.

2. Résumé et explication du test

Dans une PCR en temps réel, le signal fluorescent émis par un colorant fluorescent indicateur peut recouvrir un canal de couleur adjacent, générant ainsi un signal (diaphonie) dans ce canal. La diaphonie des signaux fluorescents peut entraîner des résultats incorrects, à moins qu'une correction ne soit effectuée par un fichier de compensation des couleurs. Un fichier de compensation des couleurs peut compenser la diaphonie entre les canaux de couleur.

3. Principe du test

Le RIDA®GENE Color Compensation Kit IV est utilisé pour l'étalonnage des couleurs des tests de PCR en temps réel RIDA®GENE 2-plex et supérieur sur le LightCycler® 480 II.

4. Contenu du paquet

Tableau 1 : Contenu du paquet (les réactifs fournis dans le kit permettent de réaliser 3 compensations de couleur.)

Code du kit	Réactif	Quantité		Couleur du couvercle
1	Blank	1 ×	400 µl	Blanc
2	Dye 1	1 ×	400 µl	Bleu
3	Dye 2	1 ×	400 µl	Vert
4	Dye 3	1 ×	400 µl	Jaune
5	Dye 4	1 ×	400 µl	Orange
6	Dye 5	1 ×	400 µl	Rouge

5. Instructions de conservation

- Protégez le RIDA®GENE Color Compensation Kit IV de la lumière et conservez-le à -20 °C. S'il n'est pas ouvert, il peut être utilisé jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette. Après la date de péremption, la qualité n'est plus garantie.
- Avant utilisation, décongelez soigneusement le RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (par exemple, dans un réfrigérateur à 2 - 8 °C).
- Pendant la préparation de la compensation de couleur, tous les réactifs doivent être refroidis de manière appropriée (2 - 8 °C).

6. Réactifs requis, mais non fournis

Le RIDA®GENE Color Compensation Kit IV est compatible avec les dispositifs de PCR en temps réel suivants :

Tableau 2 : Matériel nécessaire

Dispositif de PCR en temps réel	
Roche	LightCycler® 480 II

Si vous devez utiliser d'autres instruments de PCR en temps réel, contactez R-Biopharm à l'adresse mdx@r-biopharm.de pour en vérifier la compatibilité.

- Consommables de PCR en temps réel (plaque de microtitration, feuille optique)
- Centrifugeuse avec rotor pour les flacons ou les plaques de réaction
- Pipettes (0,5 à 20 µl, 20 à 200 µl, 100 à 1 000 µl)
- Pointes pour pipette dotées de filtres
- Gants jetables non poudrés

7. Mesures de précaution

Exclusivement réservé au diagnostic *in vitro*.

- Ce test doit uniquement être réalisé par un personnel de laboratoire formé. Il convient de respecter les directives de travail dans les laboratoires médicaux.
- Les instructions d'exécution du test doivent être respectées à la lettre.
- Ne pas pipeter les échantillons ou les réactifs à la bouche. Éviter tout contact avec les plaies et les membranes muqueuses.
- Lors de la manipulation des réactifs et des échantillons, porter un équipement de protection individuelle (gants adaptés, blouse, lunettes de protection) et se laver les mains à l'issue du test.
- Ne pas fumer, manger, ni boire dans les zones où des échantillons sont manipulés.
- L'extraction, la préparation de la PCR et l'exécution de la PCR doivent être effectuées dans des salles différentes afin d'éviter toute contamination croisée.
- Les échantillons cliniques doivent être considérés comme du matériel potentiellement infectieux, de même que tous les réactifs et le matériel exposés à des échantillons potentiellement infectieux, et doivent être éliminés comme il se doit.
- Ne pas utiliser le kit après sa date de péremption. Après utilisation, les utilisateurs sont responsables de la mise au rebut appropriée de tous les réactifs et matériaux. Pour la mise au rebut, respecter les règlements nationaux.

Pour en savoir plus, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) sur www.r-biopharm.com.

8. Protocole pour générer un fichier de compensation de couleur sur le LightCycler® 480 II

8.1 Préparation de la compensation de couleur

Pour un cycle de compensation de couleur, pipetez cinq réactions avec 20 µl de chaque colorant, y compris le fond (blanc) dans une plaque de microtitration (voir Fig.1).

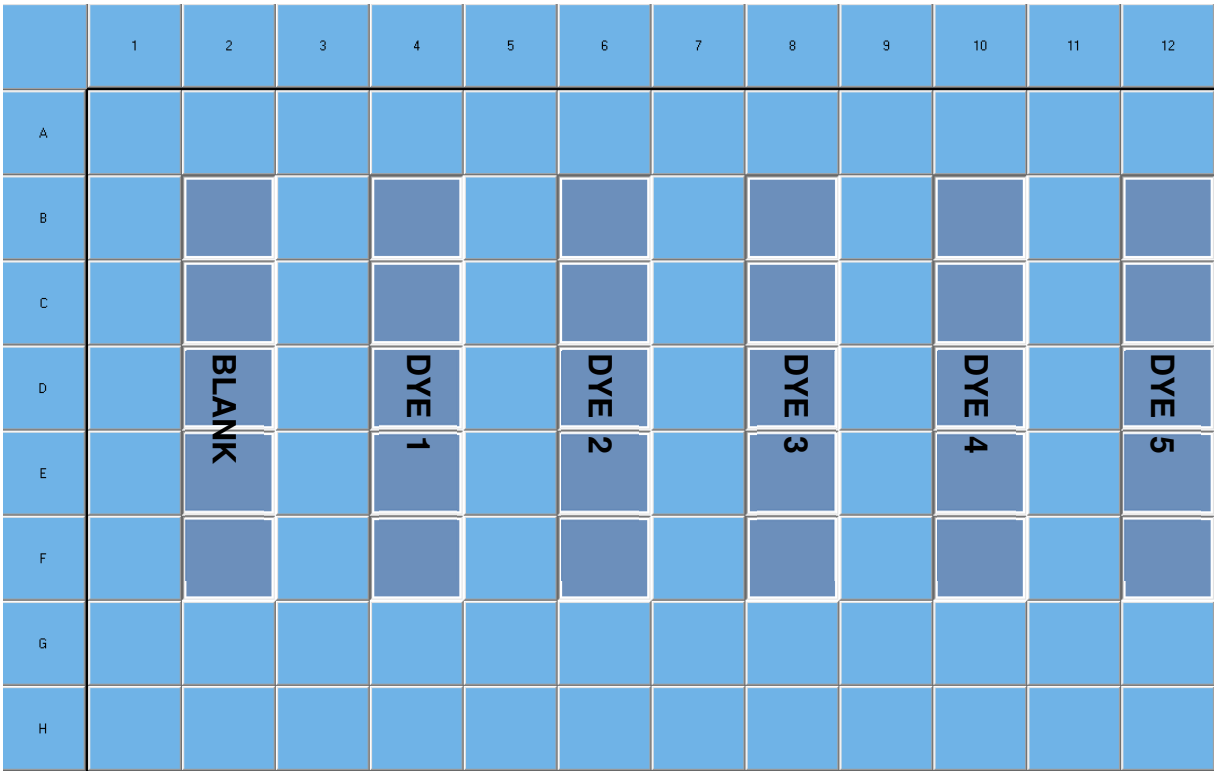


Figure 1 : Schéma de pipetage pour la compensation de couleur sur le LightCycler® 480 II.

Décongeler, mélanger et centrifuger brièvement les réactifs avant de les utiliser. Toujours refroidir les réactifs correctement pendant les étapes de travail (2 à 8 °C).

Tableau 3 : Préparation de la compensation de couleur LightCycler® 480 II

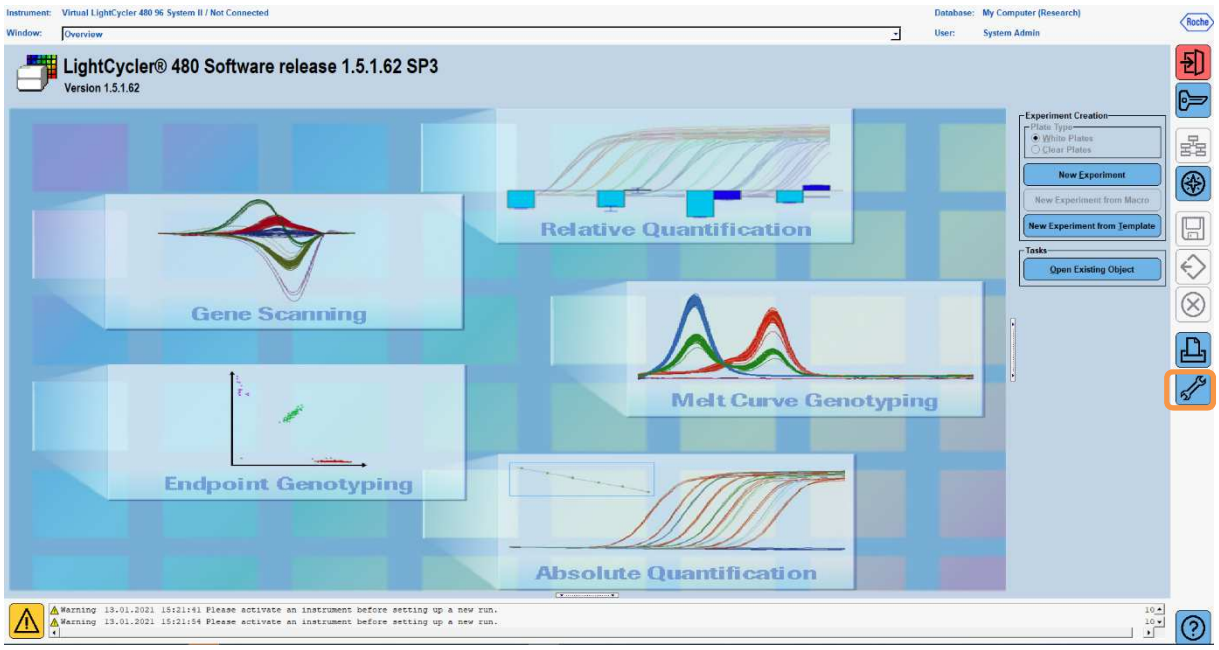
Code du kit	Réactif	Quantité par réaction	Pipeter 20 µl de chaque dans les puits suivants
1	Blank	20 µl	B2, C2, D2, E2, F2
2	Dye 1	20 µl	B4, C4, D4, E4, F4
3	Dye 2	20 µl	B6, C6, D6, E6, F6
4	Dye 3	20 µl	B8, C8, D8, E8, F8
5	Dye 4	20 µl	B10, C10, D10, E10, F10
6	Dye 5	20 µl	B12, C12, D12, E12, F12

Après avoir pipeté les réactifs, sceller la plaque de microtitration avec une feuille optique et centrifuger si possible. Démarrer la PCR en temps réel selon les paramètres de l'appareil.

8.2 Configuration de l'instrument de PCR

Remarque : Connectez-vous au logiciel en tant qu'administrateur pour configurer le format de détection.

1. Après avoir ouvert le logiciel, cliquez sur l'icône « **Tools** » pour programmer le format de détection.



2. La fenêtre suivante s'ouvre. Dans la fenêtre Outils, sélectionnez « **Detection Formats** ». Cliquez sur le bouton « **New** » pour créer un nouveau format de détection (voir tableau 5) et enregistrez-le sous le nom de « **RIDA®GENE** ». Cliquez sur le bouton « **Close** » pour quitter la fenêtre Outils.

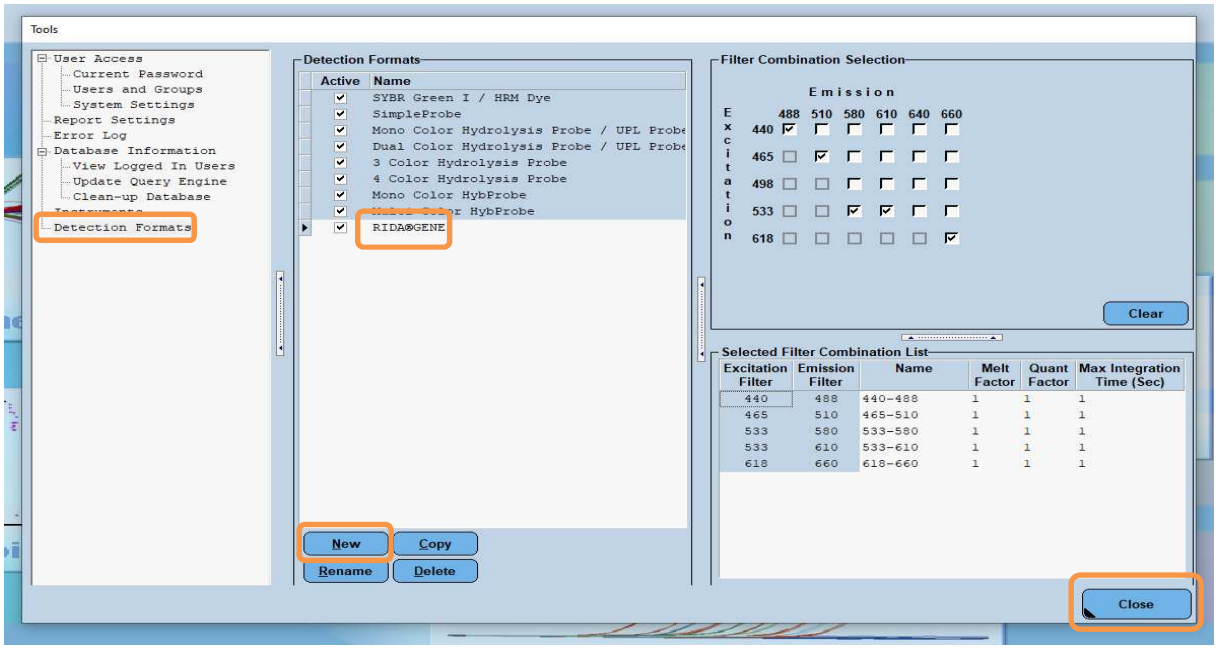
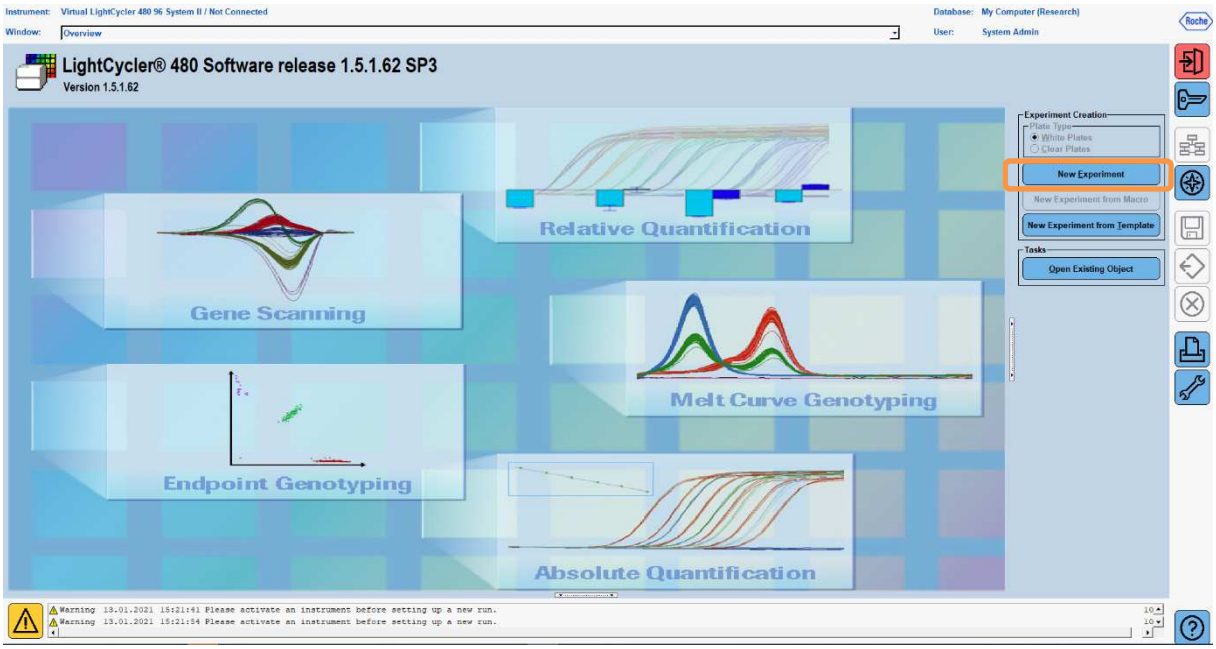


Tableau 4 : Configuration du canal de détection pour le LightCycler® 480 II

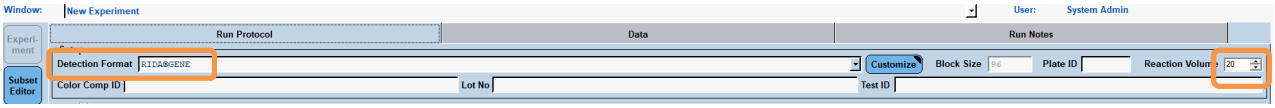
Combinaison de filtres
440 / 488
465 / 510
533 / 580
533 / 610
618 / 660

Remarque : Réglez la valeur des paramètres « Quant Factor », « Melt Factor » et « Integration Time » sur 1 (par défaut).

3. Après avoir programmé le format de détection, cliquez sur le bouton « **New Experiment** ».



4. Sélectionnez le format de détection « **RIDA®GENE** » et saisissez un volume de réaction de 20 µl (par défaut).



5. Programmez le profil thermique (voir tableau 5).

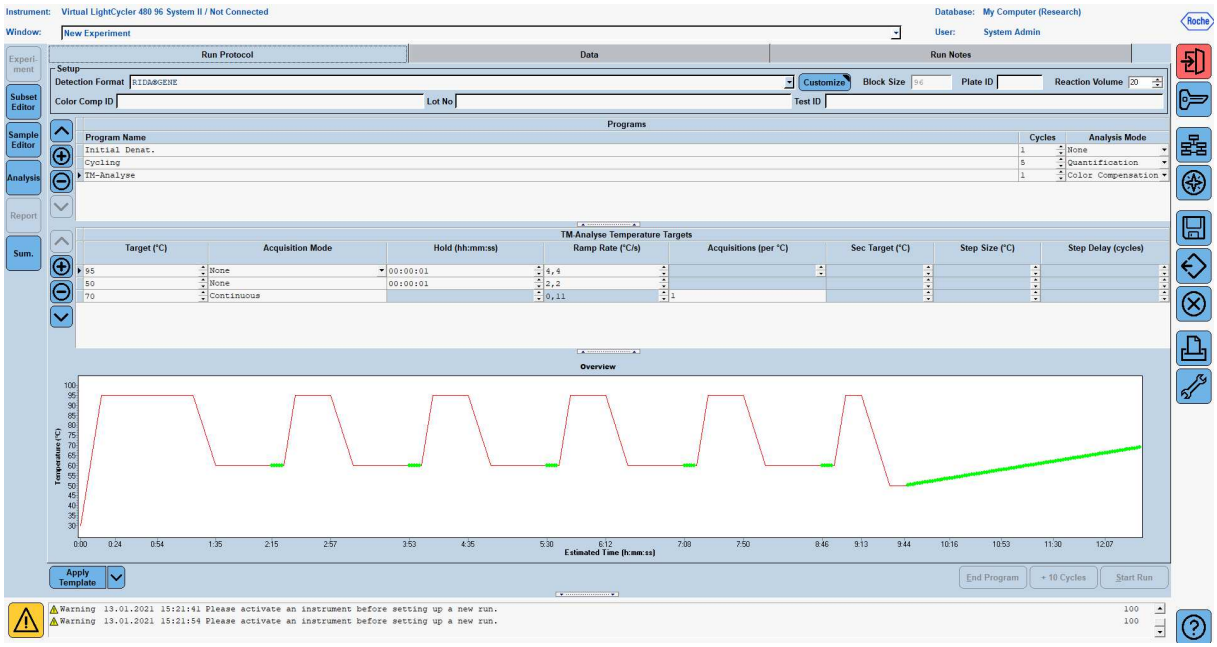
Tableau 5 : Profil thermique

		Objectifs de température			
Programme	Cycles / Mode d'analyse	Cible [°C]	Mode d'acquisition	Maintien [hh:mm:ss]	Montée en température [°c/s]
Dénat initial.	1 / aucun	95	aucun	00:00:30	4,4
Cyclage	5 / Quantification	95	aucun	00:00:15	4,4
		60	simple	00:00:30	2,2
Analyse TM	1 / Compensation de couleur	95	aucun	00:00:01	4,4
		50	aucun	00:00:30	2,2
		70	continu		Acquisitions (par °C) = 1 0.14*

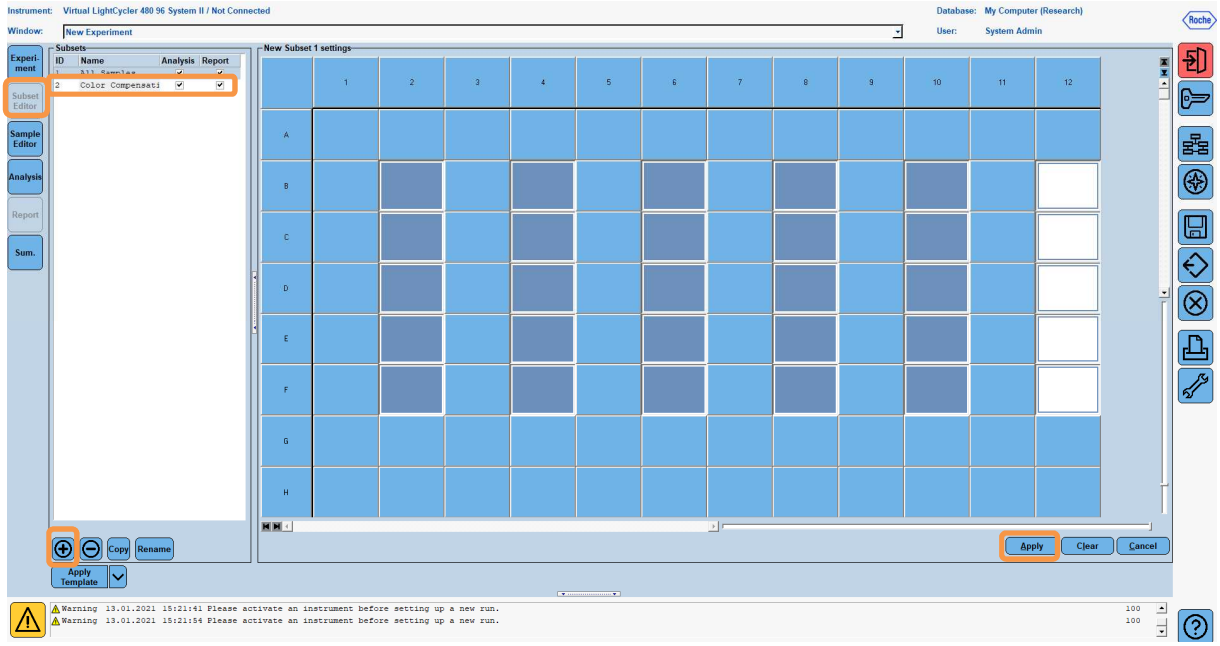
Remarque : Assurez-vous que le nombre de « **Cycles** » et de « **Analysis Mode** » est correct.

** La montée en température peut varier légèrement en fonction du format de détecteur sélectionné.*

6. Une fois la programmation terminée, l'expérience devrait se présenter comme suit**.**



7. Pour programmer la disposition de la plaque de microtitration, passez dans le **« Subset Editor »** Cliquez sur l'icône « **Plus** » pour créer un nouveau sous-ensemble et saisissez un nom pour la disposition (par exemple, Compensation de couleur). Maintenez la touche Ctrl et le bouton gauche de la souris enfoncés et sélectionnez tous les puits contenant des réactifs dans la plaque de microtitration (voir les figures 1 et 2). Cliquez sur le bouton **« Apply »** pour terminer le sous-ensemble. L'écran devrait apparaître comme suit.



8. Passez dans le **« Sample Editor »**. À partir de l'étape 1 : « **Select Workflow** », choisissez **« Color Comp »**. À l'étape 2 : **« Select Samples »**, choisissez le sous-ensemble précédemment défini (Compensation de couleur). Pour terminer la mise en page, sélectionnez le canal dominant correspondant à chaque réactif (Blank, Dye 1, Dye 2, Dye 3, Dye 4, Dye 5) dans le champ « **Dominant Channel** » (voir tableau 6). Veuillez sélectionner « **Water** » pour les réactions avec le fond de couleur (blanc).

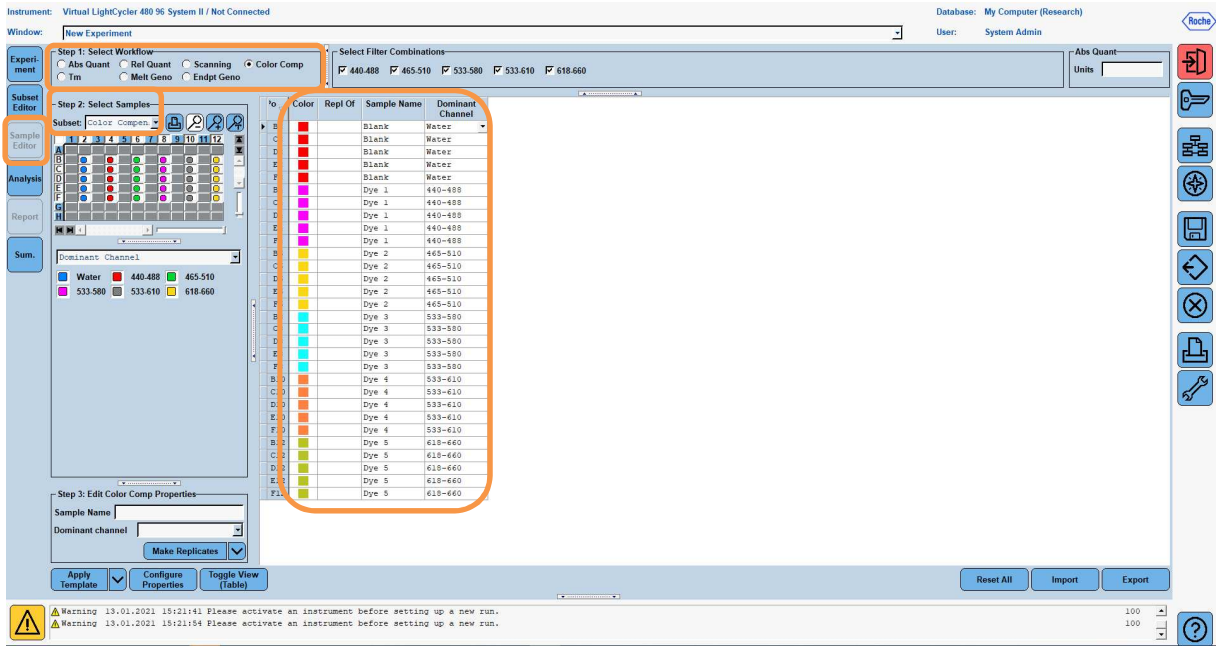
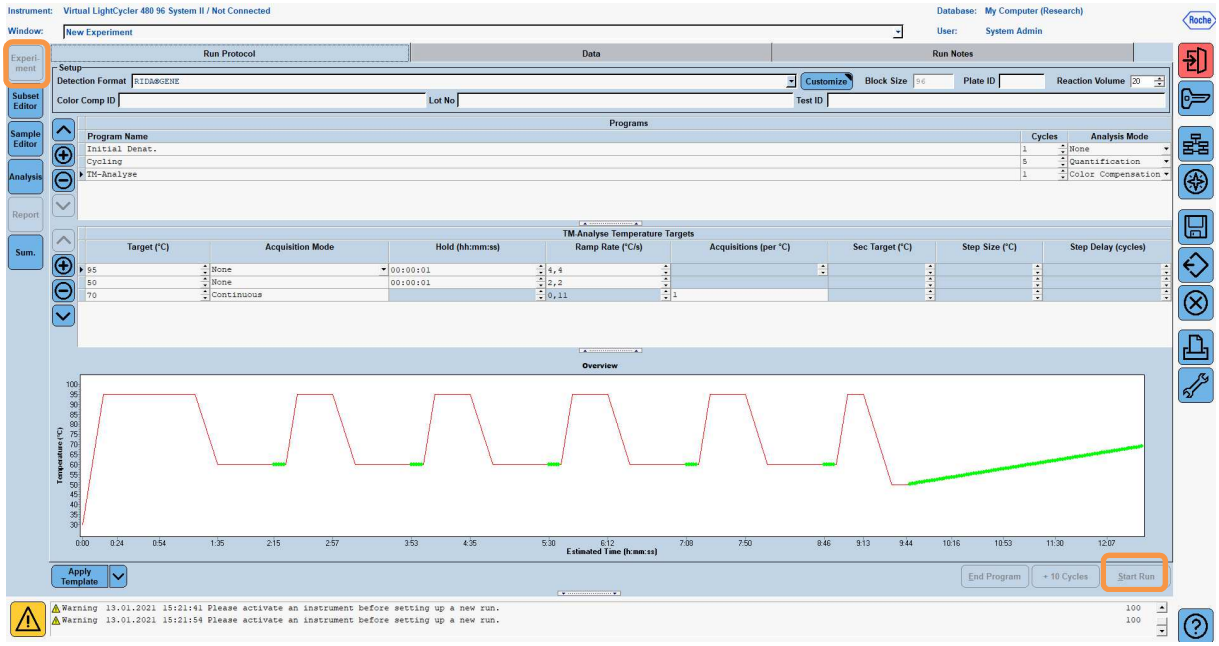


Tableau 6 : Paramètres du canal dominant pour les réactifs (LightCycler® 480 II)

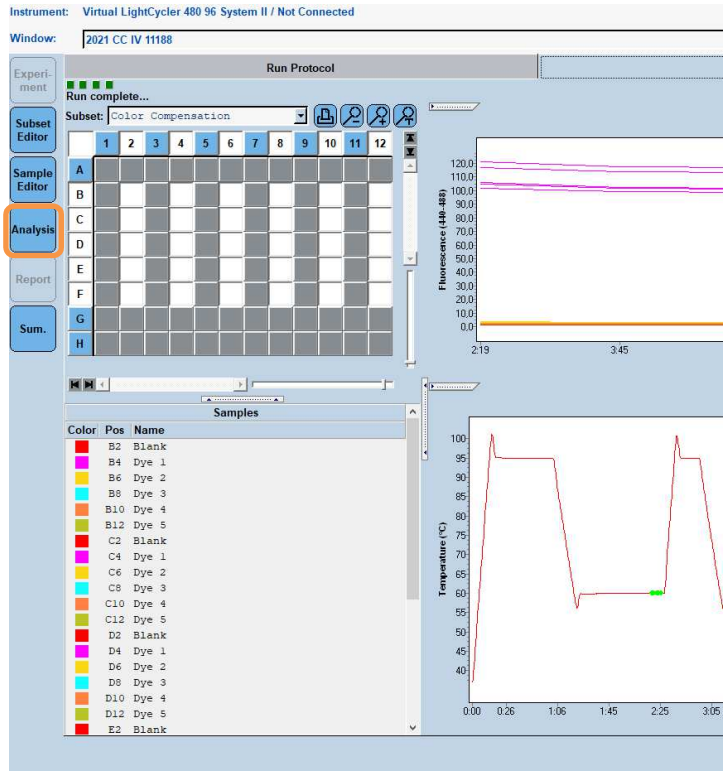
Réactif	Canal dominant
Blank	Eau
Dye 1	440 / 488
Dye 2	465 / 510
Dye 3	533 / 580
Dye 4	533 / 610
Dye 5	618 / 660

9. Placez la plaque avec les réactions préparées dans l'appareil. Cliquez sur « **Experiment** » puis sur « **Start Run** » pour démarrer l'expérience.

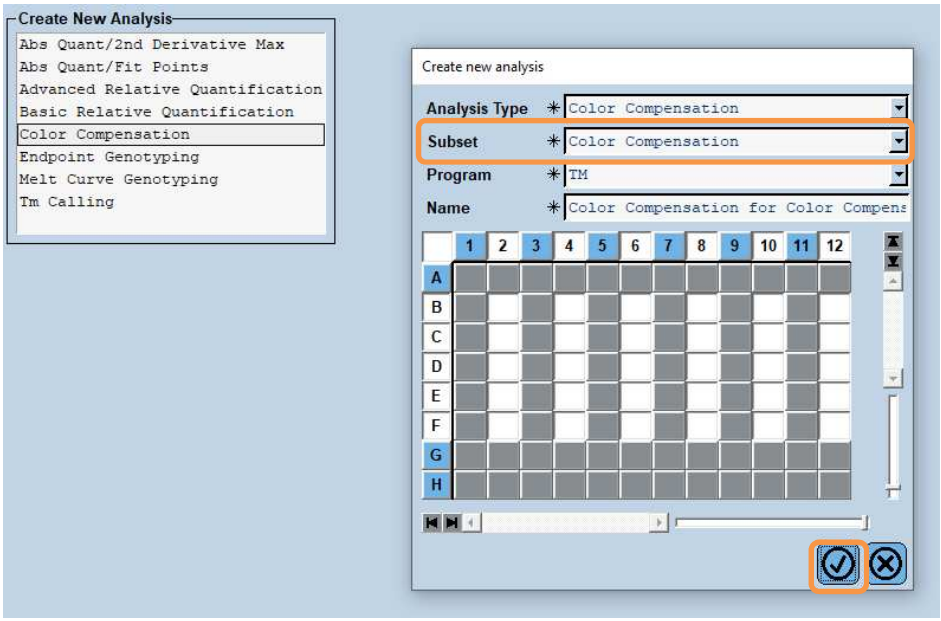


8.3 Évaluation et création d'un fichier de compensation de couleur

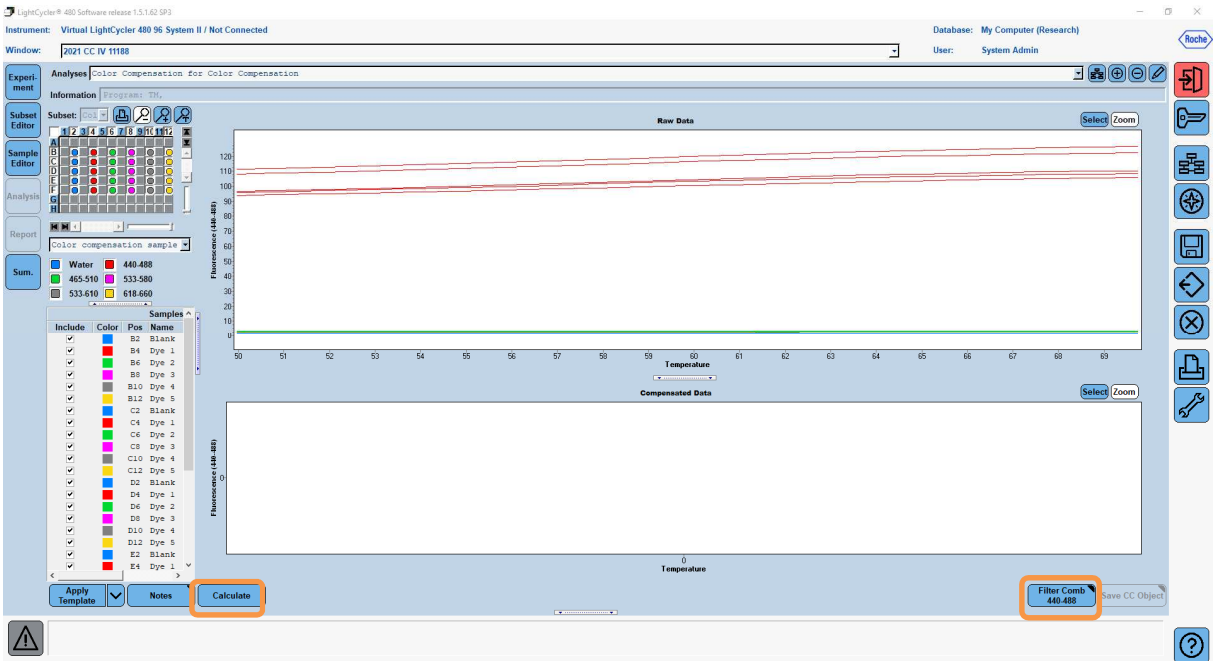
1. Après avoir terminé l'expérience LightCycler®, cliquez sur le bouton « **Analysis** ».



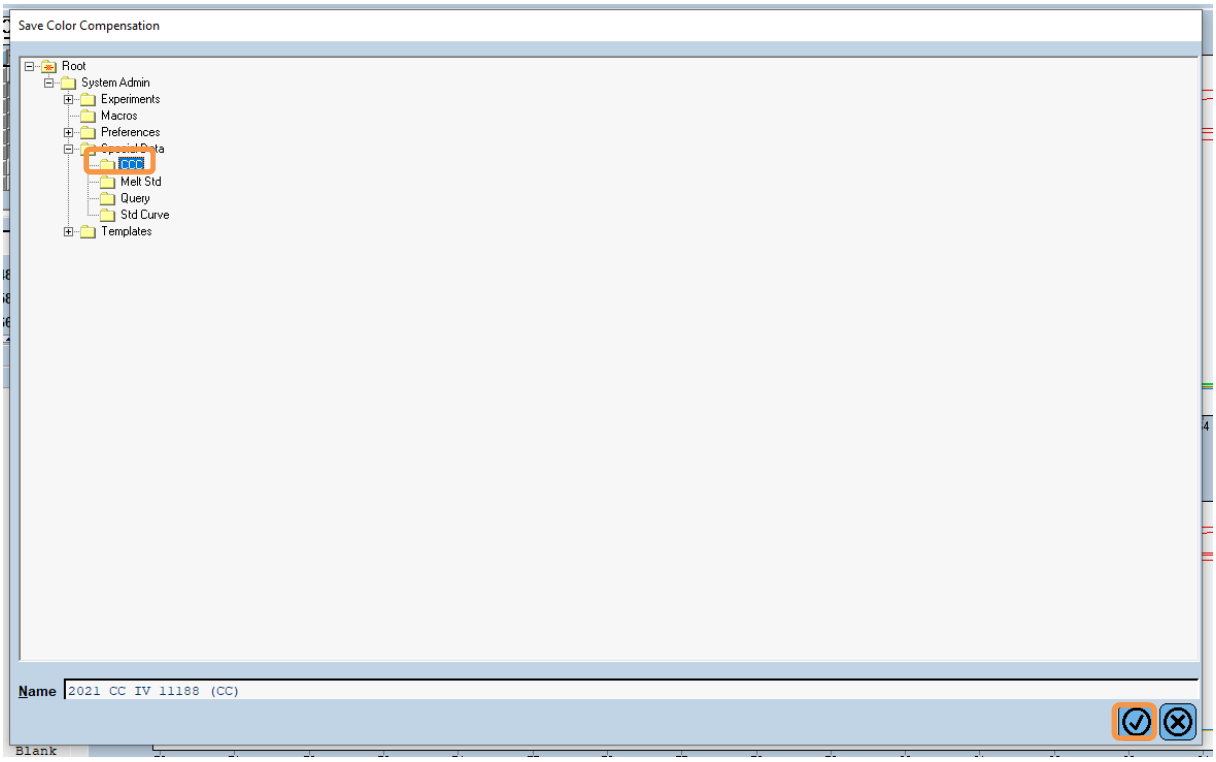
2. Dans la boîte de dialogue « **Create New Analysis** » , ouvrez « **Color Compensation** ». Sélectionnez et confirmez le sous-ensemble approprié (par exemple, Compensation de couleur) dans la boîte de dialogue qui s'ouvre.



3. L'analyse s'ouvre ; cliquez sur « **Calculate** », puis sur « **Save CC Object** »



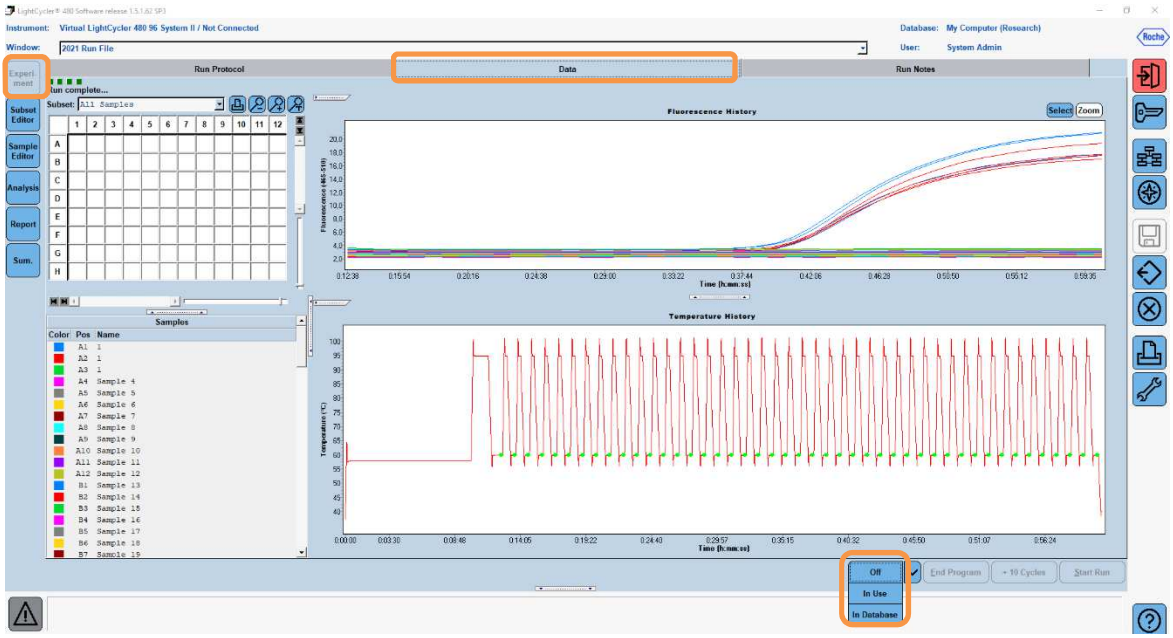
4. Enregistrez le fichier de compensation de couleur sous le nom de « **RIDA®GENE CCIV** » dans le dossier « **CCC** » .



Ce fichier est ensuite disponible pour d'autres expériences du LightCycler® 480 II. La génération du fichier de compensation de couleur est maintenant terminée.

8.4 Utilisation du fichier de compensation de couleur

Pour utiliser le fichier de compensation de couleur, ouvrez l'expérience de PCR en temps réel RIDA®GENE et chargez la compensation de couleur désirée sous « **Experiment** » « **Data** ». Dans le menu déroulant « Color Comp (Off) », sélectionnez « **in Database** » , puis le fichier de compensation de couleur enregistré.



Lorsque la compensation de couleur est sélectionnée, le bouton « **Color Comp (Off)** » devient « **Color Comp (On)** ». La compensation de couleur sélectionnée est automatiquement appliquée à tous les filtres de l'analyse. L'analyse de PCR en temps réel RIDA®GENE peut maintenant être analysée comme d'habitude.

Remarque : Le fichier de compensation de couleur est spécifique à chaque LightCycler® 480 II. Un nouveau fichier de compensation de couleur est nécessaire si l'appareil est échangé ou si l'unité optique est réparée.

9. Historique des versions

Numéro de version	Section et désignation
16/03/2021	Version précédente
09/09/2021	Adaptation / Correction Titre de page

10. Signification des symboles

Symboles généraux

IVD	Pour le diagnostic *in vitro*
	Respecter le mode d'emploi
LOT	Numéro de lot
	Date de péremption
	Température de stockage
REF	Numéro d'article
	Nombre de tests
	Date de fabrication
	Fabricant

Symboles spécifiques au test

Blank

Dye 1

Dye 2

Dye 3

Dye 4

Dye 5