

CE

# **RIDA<sup>®</sup>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*. RIDA<sup>®</sup>GENE Color Compensation Kit IV est utilisé pour l'étalonnage des couleurs des tests RIDA<sup>®</sup>GENE real-time PCR 2-plex et supérieur sur le LightCycler<sup>®</sup> 480 II. RIDA<sup>®</sup>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 RIDA<sup>®</sup>GENE real-time PCR 2-plex et supérieur sur le LightCycler<sup>®</sup> 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). 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

RIDA<sup>®</sup>GENE Color Compensation Kit IV est utilisé pour l'étalonnage des couleurs des tests RIDA<sup>®</sup>GENE real-time PCR 2-plex et supérieur sur le LightCycler<sup>®</sup> 480 II.

#### 4. Contenu du paquet

**Tableau 1 :** Contenu du paquet (les réactifs fournis dans le kit permettent de réaliser3 compensations de couleur.)

Code du kit	Réactif	Qu	antité	Couleur du bouchon
1	Blank	1 ×	400 µL	blanc, prêt à l'emploi
2	Dye 1	1 ×	400 µL	bleu, prêt à l'emploi
3	Dye 2	1 ×	400 µL	vert, prêt à l'emploi
4	Dye 3	1 ×	400 µL	jaune, prêt à l'emploi
5	Dye 4	1 ×	400 µL	orange, prêt à l'emploi
6	Dye 5	1 ×	400 µL	rouge, prêt à l'emploi

2

## 5. Instructions de conservation des réactifs

- Respecter les consignes de manipulation figurant dans le tableau 2 et stocker le kit directement après utilisation conformément aux instructions.
- Tous les réactifs doivent être conservés à l'abri de la lumière, à une température comprise entre -16 °C et -28 °C et, s'ils ne sont pas ouverts, ils peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette. Après la date de péremption, la qualité n'est plus garantie.
- Tous les réactifs doivent être soigneusement décongelés avant leur utilisation (p. ex., dans un réfrigérateur entre 2 et 8 °C).
- La congélation et la décongélation répétées jusqu'à 3 fois n'affectent pas les propriétés du test.
- Refroidir correctement tous les réactifs pendant la préparation de la PCR (2 8 °C).

	Température de conservation	Durée maximale de conservation
non ouvert	-16 °C à -28 °C	Utilisable jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette
ouvert	-16 °C à -28 °C	3 cycles de congélation-décongélation

#### **Tableau 2**: Informations et conditions de conservation

## 6. Réactifs requis, mais non fournis

#### 6.1 Réactifs

Aucun.

# 6.2 Matériel de laboratoire

Le matériel suivant est nécessaire pour réaliser le test RIDA®GENE Color Compensation Kit IV :

#### Matériel

Instrument de PCR en temps réel : LightCycler<sup>®</sup> 480 II (Roche)

Consommables de PCR en temps réel (plaques [profil bas, puits blancs, support transparent], flacons de réaction, films)

Centrifugeuse avec rotor pour les plaques/flacons de réaction

Agitateur-mélangeur vortex

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

Pointes de pipettes dotées de filtres

Gants jetables non poudrés

Pour toute question, veuillez contacter R-Biopharm AG à l'adresse pcr@r-biopharm.de.

#### 7. Mesures de précaution

Exclusivement réservé au diagnostic in vitro.

Ce test doit être réalisé uniquement par un personnel de laboratoire formé. Il convient de respecter les directives de travail dans les laboratoires médicaux.

Toujours respecter strictement le manuel d'utilisation lors de la réalisation du test. Ne pas pipeter les échantillons ou les réactifs à la bouche. Éviter tout contact avec des plaies et des 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 ou boire dans les zones de manipulation des échantillons. Des pièces séparées, des vêtements spéciaux et des instruments pour l'extraction, la préparation de la PCR et la PCR doivent être utilisés pour éviter la contamination croisée et les résultats faux positifs.

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 l'élimination correcte de tous les réactifs et matériaux. Pour l'élimination, respecter les règlements nationaux.

De plus amples informations sur la fiche de données de sécurité (Safety Data Sheet, SDS) sont disponibles sous le numéro d'article à l'adresse suivante https://clinical.r-biopharm.com/search/.

Pour les utilisateurs de l'Union européenne : signaler tout événement indésirable grave associé au produit à R-Biopharm AG et aux autorités nationales compétentes.

# 8. Protocole pour générer un fichier de compensation de couleur sur le LightCycler<sup>®</sup> 480 II

# 8.1 Préparation de la compensation de couleur

Décongeler, mélanger et centrifuger brièvement les réactifs avant de les utiliser. Toujours refroidir tous les réactifs pendant les étapes de travail (2 à -8 °C). Pour un cycle de compensation de couleur, pipeter cinq réactions avec 20 µL de chaque colorant, y compris le fond (Blank) dans une plaque de microtitration (voir Fig.1).



**Figure 1 :** Schéma de pipetage pour la compensation de couleur sur le LightCycler<sup>®</sup> 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

**Tableau 3 :** Préparation de la compensation de couleur pour le LightCycler<sup>®</sup> 480 II

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 (voir la figure suivante).



 La fenêtre suivante s'ouvre. Dans la fenêtre « Tools », sélectionnez « Detection Formats ». Cliquez sur le bouton « New » pour créer un nouveau format de détection (voir tableau 4) et enregistrez-le sous le nom de « RIDA<sup>®</sup>GENE » (voir la figure suivante).



Tableau 4: Configuration du canal de détection pour le LightCycler<sup>®</sup> 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).

Cliquez sur le bouton « **Close** » pour quitter la fenêtre Tools.

**3.** Après avoir programmé le format de détection, cliquez sur le bouton « **New Experiment** » (voir la figure suivante).



**4.** Sélectionnez le format de détection « **RIDA**<sup>®</sup>**GENE** » et saisissez un volume de réaction de 20 μL (par défaut) (voir la figure suivante).

Window:	New Experiment				✓ User:	System Admin	
Experi-	[	Run Protocol	Data		Run Note	25	
ment	Detection Format RIDASGENE			Customize Block	k Size 96 F	Plate ID Reaction Volum	20 🚖
Subset Editor	Color Comp ID		Lot No	Test ID			

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

#### Tableau 5: Profil thermique

			Tem	perature targ	ets
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
Overline et	E / Quantification	95	none	00:00:15	4,4
Cycling	5 / Quantification	60	single	00:00:30	2,2
		95	none	00:00:01	4,4
TM Analysis	1 / Color	50	none	00:00:30	2,2
	Compensation	70	continuous		Acquisitions (per °C) = 1 0.14*

*Remarque :* Assurez-vous que le nombre de « **Cycles** » et « **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 doit se présenter comme suit (voir la figure suivante).



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, Color Compensation). 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 (voir la figure suivante).

Instrume	ment: Virtual LightCycler 480 95 System II / Not Computer (Research)																
Window:	New Experiment											<u>-</u>	User:	System Adm	in		
Experi- ment Subset Editor	Subsets- ID Name Analysis Report 2 Color Compensati V V		New Subset	1 settings	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		<b>1</b>
Sample Editor			A														
Analysis			B														
Sum.			C														
			D													- [	$\overline{\otimes}$
			E														Ŀ
			F														- Star
			G														
			н													ſ	
		F								<u> </u>				Арг	ly Clear	j	
	Apply Template							•									
$\wedge$	▲ Warning 13.01.2021 15:21:41 Please a ▲ Warning 13.01.2021 15:21:54 Please a	activ	vate an in vate an in	strument befo strument befo	re setting up re setting up	a new run. a new run.										100 +	$\bigcirc$

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 (Color Compensation). 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 (Blank) (voir la figure suivante).

Instrument	Virtual LightCycler 480 96 System II / Not Conne	ected				Datab	ase: My Computer	(Research)	Deaths
Window:	New Experiment					- User:	System Admin	л	nocile
Experiment	Step 1: Select Workflow Abs Quant C Rel Quant C Scanning C Tm C Melt Geno C Endpt Geno	Color Comp	Select Filter Combin	ations 10 F 533-580	₽ 533.610 ₽ 618.660			Abs Quant Units	] 된
Subset Editor	Step 2: Select Samples	'o Color	Repl Of Sample Name	Dominant Channel					62
Sample Editor	Subset: Color Compen.	B B B B B B B B B B B B B B B B B B B	Blank Blank Blank	Water Water Water					뮲
Analysis		E F B	Blank Blank Dye 1	Water Water 440-488					*
Report		C D E	Dye 1 Dye 1 Dye 1	440-488 440-488 440-488					
Sum.	Dominant Channel	B	Dye 1 Dye 2 Dye 2	465-510 465-510					Ð
	<b>533-580 533-610 618-660</b>	E	Dye 2 Dye 2 Dye 2	465-510 465-510 465-510					$\overline{\otimes}$
		C	Dye 3 Dye 3 Dye 3	533-580 533-580					n
		8 80	Dye 3 Dye 4 Dye 4	533-580 533-610					
		D10 E10	Dye 4 Dye 4 Dye 4	533-610 533-610					<u>N</u>
		BL2 CL2	Dye 5 Dye 5 Dye 5	618-660 618-660					
	Step 3: Edit Color Comp Properties	El	Dye 5 Dye 5	618-660 618-660	/				
	Sample Name Dominant channel Make Replicates								
	Apply Template Configure Properties (Table)	BW					Reset All	Import Export	J
	▲ Warning 13.01.2021 15:21:41 Please at ▲ Warning 13.01.2021 15:21:54 Please at	ctivate an ins ctivate an ins	trument before settir trument before settir	g up a new i ig up a new i	run.			100 - 100 -	(?)

Tableau 6 :	Paramètres o	du canal	dominant po	ur les	réactifs	(LightCycle	ər® 480	II)
-------------	--------------	----------	-------------	--------	----------	-------------	---------	-----

Réactif	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. Placez la plaque avec les réactions préparées dans l'appareil. Cliquez sur « Experiment » puis sur « Start Run » pour démarrer l'expérience (voir la figure suivante).



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

**1.** Après avoir terminé l'expérience LightCycler<sup>®</sup>, cliquez sur le bouton « **Analysis** » (voir la figure suivante).



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



**3.** L'analyse s'ouvre ; cliquez sur « **Calculate** », puis sur « **Save CC Object** » (voir la figure suivante).



4. Enregistrez le fichier de compensation de couleur sous le nom de « RIDA<sup>®</sup>GENE CCIV » dans le dossier « CCC » (voir la figure suivante)

Save Color Compensation					
- 🕞 😼 Root					
😑 🧰 System Admin					
Experiments					
Macros					
H Preferences					-
Melt Std					
Query					
Std Curve					
E-     Templates					
8					
8					
e l					
1					
4					
-					•
					-
					1
in the second se					
Name 2021 CC IV 11188 (CC)					
Blank	r	p. p. p.	T T	 	and the second second

Ce fichier est ensuite disponible pour d'autres expériences du LightCycler<sup>®</sup> 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 RIDA<sup>®</sup>GENE realtime PCR 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 (voir Figure 2).



Figure 2 : Utilisation de la compensation de couleur

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 RIDA<sup>®</sup>GENE real-time PCR peut maintenant être analysée comme d'habitude.

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

# 9. Historique des versions

Numéro de version	Section et désignation
2021-09-09	Version précédente
2022-02-03	Révision générale : 4. Contenu du paquet 5. Instructions de conservation des réactifs 6. Réactifs requis, mais non fournis 7. Mesures de précaution

# **10. Signification des symboles**

Symboles généraux

IVD	Pour usage diagnostique in vitro
<b>I</b>	Respecter le manuel d'utilisation
LOT	Numéro de lot
	Date de péremption
1	Température de conservation
REF	Numéro d'article
₹ Z	Nombre de tests
$\sim$	Date de fabrication
	Fabricant

Symboles spécifiques aux tests

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