

RIDA® CYCLER

Bedienungsanleitung





Alle Rechte vorbehalten.

Diese Bedienungsanleitung darf nur bestimmungsgemäß verwendet werden. Eine vollständige oder teilweise Vervielfältigung oder Übersetzung in andere Sprachen ohne unsere ausdrückliche schriftliche Genehmigung vorab ist nicht gestattet.

Technische Änderungen vorbehalten.

Technische Änderungen, abweichende Abbildungen und Irrtümer vorbehalten.

© 2019 R-Biopharm AG, Darmstadt



Bedienungsanleitung

RIDA®CYCLER

ZRCYCLER

Version 1.2.0 (28.11.2019)

© Copyright 2019 by R-Biopharm AG

Vertrieb:

R-Biopharm AG

An der neuen Bergstraße 17

64297 Darmstadt, Deutschland

Telefon: +49 (0) 61 51 - 8102-0

Fax: +49 (0) 61 51 - 8102-40

E-Mail: info@r-biopharm.de

www.r-biopharm.com

Bedienungsanleitung

Inhaltsverzeichnis

Allgemeine Informationen	8
Wichtige Informationen	8
Erklärung der verwendeten Symbole	8
Verwendungszweck	10
1 Auspacken und Installation	11
1.1 Installation	11
1.2 Installation der Software	11
1.3 Software aktualisieren	12
1.4 Firmware-Upgrade.....	12
2 RIDA®CYCLER: Übersicht	13
3 Verbrauchsmaterialien und Zubehör	14
4 Farben der LED-Anzeige	15
5 Erste Schritte	15
5.1 Röhrrchen laden	15
5.2 Röhrrchen entnehmen.....	17
6 Software Übersicht	17
6.1 Tool Bar (Symbolleiste)	18
6.1.1 Hilfe-Symbol	19
6.1.2 Laufdateien öffnen.....	19
6.1.3 Geräte-Symbol	20
6.1.4 Symbol Gerätekommunikation	22
6.2 Dateireiter	22
6.3 Navigationsleiste	22
6.4 Aktive Fenster Datei	23
6.4.1 Export in CSV oder Kopieren in die Zwischenablage	24
6.4.2 Rohdaten exportieren	24
6.4.3 Diagramm als Bitmap exportieren	24
6.4.4 Organisation der Ergebnistabelle	25
6.4.5 Größeneinstellungsleisten	26
6.4.6 Funktionen zur Anzeige von Diagrammen	26
7 Samples Selector (Probenauswahl)	27
7.1 Probenauswahl-Gruppierung	28
8 Neuen Lauf erstellen	29
8.1 Tests hinzufügen	29
8.2 Kompatibilität des Testprofils	30
9 Lauf starten	31
9.1 Probeneditor	33
9.1.1 Layout der Kavitäten	33
9.1.2 Ausfüllen der Zellen.....	33
9.1.3 Farbkennzeichnung.....	34
9.1.4 Probenbenennung.....	34

9.1.5 Auswahl Probentyp	36
9.1.6 Probenkonzentrationen	36
9.1.7 Multiplex-Standards	38
9.1.8 Verknüpfen eines Tests mit einer Probe	38
9.1.9 Optionale Spalten	39
9.1.10 Proben importieren	39
9.1.11 Warnungen im Probeneditor	40
9.1.12 Probeneditor sperren	41
9.1.13 Informationen	41
10 Erstellung von Vorlagen zur Wiederverwendung	41
10.1 Eine Vorlage erstellen	41
10.2 Eine Vorlage öffnen	42
11 Während des Laufs	42
11.1 Profil während eines Laufs ändern (optional)	42
11.2 Daten	43
11.3 Meldungen	43
12 Analyse	44
12.1 Cycling-Analyse	44
12.1.1 Diagrammtypen	45
12.1.2 Parameter der Cycling-Analyse	47
12.1.3 Tabelle „Ergebnisse Cycling-Analyse“	50
12.1.4 Proben-tabellenselektor für Cycling-Analyse	50
12.1.5 Unverankerte Fenster (Floating windows)	51
12.2 Schmelzkurvenanalyse (Melt)	52
12.2.1 Parameter für Schmelzkurvenanalyse	53
12.3 Absolute Quantifizierung	54
12.3.1 Quantifizierungsanalyse mit Standardkurven	54
12.3.2 Standardkurvencharakteristik	54
12.3.3 Importieren einer Standardkurve	55
12.3.4 Ergebnistabelle für die Standardkurve	56
12.2.5 Cycling-Analyse für Standardkurven	56
12.3.6 Absolute Quantifizierung	57
12.3.7 Probenergebnistabelle	58
12.4 Allelische Diskriminierung (Allelic Discrimination)	58
12.4.1 Parameter für Allelische Diskriminierung	59
12.5.2 Ergebnistabelle für Allelische Diskriminierung	59
12.5 Identifizierung	60
13 Projekte	61
13.1 Projektanalyse	63
13.2 Einstellung von Konzentrationen für Projekte (über Analyseoption „Absolute Quantification“)	67
13.3 Amplitudenkorrektur für Cycling Analysen	67
14 Berichte	68
14.1 Konfiguration des Berichts	68
14.2 Vorschau des Berichts	68

14.2.1 Laufeigenschaften	69
14.2.2 Proben	70
14.2.3 Analyse	70
14.3 Berichtsoptionen	71
15 Excel-Arbeitsmappe	72
Hinweise und Anhang	74
Technische Daten, Umgebungsbedingungen	74
Informationen zur biologischen Sicherheit	74
Dekontamination des RIDA®CYCLER	75
EG-Konformitätserklärung / CE-Zeichen	75
Symbole auf dem Typenschild	76
Informationen zur Entsorgung	76
Anhang 1: Temperature Verification System (TVS)	77
Anhang 2: Fehlermeldungen und Warnungen	78
Anhang 3: Umgehungslösung für Toshiba Bluetooth®	79
Anhang 4: CFR 21, Part 11	80
Anhang 5: Fluoreszenzfarbstoff-Tabelle	83
Anerkennung von eingetragenen Marken	84
Literatur	85
Abkürzungen	86
Glossar	87

Allgemeine Informationen

Bitte vergleichen Sie den Inhalt dieser Lieferung sorgfältig mit dem beigelegten Lieferschein, der Packungsbeilage oder der Rechnung. Wir empfehlen Ihnen, eine Kopie dieses Dokuments zusammen mit der Bedienungsanleitung aufzubewahren, damit Sie bei zukünftigen Anfragen, Nachbestellungen oder Servicearbeiten Informationen zu Datum und Umfang der Lieferung schnell zur Hand haben.

Bitte entfernen Sie alle Kleinteile aus dem Verpackungsmaterial.

Wir möchten Sie darauf hinweisen, dass unsere Geräte werkseitig justiert sind und unmittelbar nach der Installation funktionsbereit sind.

Bitte lesen Sie vor der ersten Verwendung des RIDA®CYCLER die Bedienungsanleitung sorgfältig durch. Wir empfehlen, diese stets neben dem RIDA®CYCLER, griffbereit, aufzubewahren.

Wichtige Informationen

Lesen Sie diese Bedienungsanleitung unbedingt vor der Verwendung des RIDA®CYCLER durch, um sich mit dem Gerät vertraut zu machen. Befolgen Sie alle Anweisungen, um den ordnungsgemäßen Betrieb des RIDA®CYCLER sicherzustellen. Verwenden Sie keine anderen Verbrauchsmaterialien, Zubehörteile oder externen Geräte als die angegebenen. Sicherheitshinweise müssen jederzeit eingehalten werden, um Verletzungen und/oder Schäden am Gerät zu vermeiden. Wenn der RIDA®CYCLER entgegen den Vorgaben des Herstellers verwendet wird, kann die Schutzfunktion des Geräts beeinträchtigt werden. Die in dieser Bedienungsanleitung enthaltenen Ratschläge sollen die im Land des Benutzers geltenden üblichen Sicherheitsanforderungen ergänzen und nicht ersetzen.

Erklärung der verwendeten Symbole

In dieser Bedienungsanleitung werden spezielle Informationen durch Symbole hervorgehoben:

	<p>Warnhinweis! Befolgen Sie die Anweisungen, um die Gefahr von Verletzungen zu vermeiden.</p>
	<p>Warnhinweis! Befolgen Sie die Anweisungen, um Schäden am Gerät zu vermeiden.</p>
	<p>Warnung, Möglichkeit eines elektrischen Schlags!</p>
	<p>Warnung, heiße Oberfläche! Die Temperatur des Rotors kann über 40 °C liegen. Um Verletzungen zu vermeiden, den Rotor während eines Laufs oder 5 Minuten nach einem abgebrochenen Lauf nicht berühren.</p>
	<p>Biologisches Risiko! Bei der Arbeit mit molekularbiologischen Geräten besteht die Gefahr einer Exposition gegenüber Infektionserregern. Stellen Sie sicher, dass eine angemessene persönliche Schutzausrüstung getragen wird und bewährte Laborpraktiken eingehalten werden, um eine Exposition gegenüber diesen Gefahren zu vermeiden.</p>
	<p>Allgemeiner Sicherheitshinweis! Befolgen Sie die Anweisungen, um eine optimale Geräteleistung zu gewährleisten.</p>

Warnungen für die richtige Verwendung

	<p>Warnhinweis!</p> <p>Beschädigter Deckel</p> <p>Verwenden Sie den RIDA®CYCLER nicht, wenn der Deckel Bruchstellen aufweist oder der Deckelverschluss beschädigt ist. Es besteht ein hohes Verletzungsrisiko für den Benutzer durch sich bewegende, unter Strom stehende oder heiße Teile.</p>
	<p>Warnung, Möglichkeit eines elektrischen Schlags!</p> <p>Lebensgefährliche Spannung im Inneren des Geräts</p> <p>Wenn der RIDA®CYCLER an den Netzstrom angeschlossen ist, können die Anschlüsse unter Spannung stehen. Durch das Öffnen von Abdeckungen oder das Entfernen von Teilen können möglicherweise spannungsführende Teile freigelegt werden.</p>
	<p>Warnung, Möglichkeit eines elektrischen Schlags!</p> <p>Geerdete Steckdose</p> <p>Das Netzteil muss an eine Steckdose mit geeigneter Erdung angeschlossen werden.</p>
	<p>Warnung, Möglichkeit eines elektrischen Schlags!</p> <p>Netzkabel</p> <p>Ersetzen Sie das abtrennbare Netzkabel nicht durch ein Kabel mit unzureichender Nennleistung.</p>
	<p>Warnung, Möglichkeit eines elektrischen Schlags!</p> <p>Reinigen Sie den Cyclor-Innenraum nicht mit entzündlichen Flüssigkeiten.</p> <p>Die Kammer kann Temperaturen über 100 °C erreichen. Entzündliche Flüssigkeiten in der Kammer können ein Brandrisiko darstellen.</p>
	<p>Warnung, heiße Oberfläche!</p> <p>Bei einem benutzerseitig abgebrochenen Lauf, den Deckel nicht öffnen, bis das Gerät abgekühlt ist. Der Rotor kann über 40 °C heiß sein. Rotor mindestens 5 Minuten lang nicht berühren, um Verletzungen zu vermeiden.</p>
	<p>Warnhinweis!</p> <p>Magnetische Röhrenklammer</p> <p>Achten Sie darauf, dass die magnetische Röhrenklammer vor dem Start eines Laufs angebracht ist, um zu gewährleisten, dass sich die Deckel und Röhren während des Laufs nicht aus den Kavitäten lösen.</p>
	<p>Warnhinweis!</p> <p>Positionierung des Geräts</p> <p>Positionieren Sie den RIDA®CYCLER so, dass er im Notfall jederzeit von der Stromversorgung getrennt werden kann.</p>
	<p>Warnhinweis!</p> <p>Vermeiden Sie das Verschütten von Flüssigkeit in den Cyclor-Innenraum.</p> <p>Auf elektronischen Platinen verschüttete Lösungen können einen Kurzschluss verursachen, der das Gerät beschädigt.</p>



Warnhinweis!

Seitliche Öffnungen nicht blockieren.

Achten Sie darauf, dass die seitlichen Öffnungen nicht blockiert sind, um die Kühlung des Geräts nicht zu beeinträchtigen.



Warnhinweis!

Gerät während des Betriebs nicht bewegen.

Bewegungen können die ordnungsgemäße Funktion des RIDA®CYCLER beeinträchtigen und zu falschen Daten führen.



Warnhinweis!

Netzanschluss

Ziehen Sie den Netzstecker des RIDA®CYCLER nicht, bevor die Stromanzeige am Netzteil erloschen ist. Andernfalls kann es zu Funkenbildung kommen.



Warnhinweis!

Wartung nur durch autorisierte Techniker

Der RIDA®CYCLER enthält keine benutzerseitig wartbaren Teile. Wartung und Instandhaltung dürfen nur von autorisierten Personen durchgeführt werden.



Warnhinweis!

Netztrennung

Das Netzkabel ist als Trennschalter zu verwenden. Ziehen Sie im Notfall das Netzkabel des Geräts.

Verwendungszweck

Der RIDA®CYCLER dient zur Durchführung der qPCR oder Schmelzkurvenanalyse für molekularbiologische Anwendungen mit RIDA®GENE, SureFood® und SureFast® Assays. Der RIDA®CYCLER ist für Laborpersonal und in der Molekularbiologie ausgebildete Ärzte vorgesehen. Der RIDA®CYCLER ist **ausschließlich für Forschungszwecke** vorgesehen.

Der RIDA®CYCLER ist ein kompaktes, rotorbasiertes qPCR-Gerät mit 48 Kavitäten, das magnetische Induktion für die Erwärmung und Zwangsluftströmung für die Kühlung nutzt. Das Gerät verfügt über vier Detektionskanäle mit Anregungs- und Emissionsspektren, welche die gängigsten, in der qPCR verwendeten Farbstoffe, umfassen (siehe auch Anhang 5: Fluoreszenzfarbstoff-Tabelle).

Mittels Bluetooth®- und USB-Verbindung zu einem PC können bis zu zehn RIDA®CYCLER über einen Computer betrieben werden, welches einen höheren Probendurchsatz ermöglicht. Wurden mehrere Läufe generiert, können diese zu einer einzigen Analyse von bis zu zehn Läufen für insgesamt 480 Proben kombiniert werden.

1 Auspacken und Installation

Die folgenden Teile sind in der RIDA®CYCLER Transportverpackung enthalten:

- RIDA®CYCLER Gerät (mit Röhrenklammer im Inneren)
- Netzteil
- Stromkabel
- USB-Kabel, 2 m
- Bluetooth®-Antenne
- Verschlusswerkzeug
- MIC-Reaktionsröhrchen und Deckel (960 Reaktionen)
- USB-Stick mit einer Kopie der Software und der Bedienungsanleitung
- RIDA®CYCLER Kurzanleitung

1.1 Installation

Stellen Sie den RIDA®CYCLER auf eine ebene Oberfläche.

Schrauben Sie die Bluetooth®-Antenne an die Rückseite des RIDA®CYCLER oder schließen Sie das Gerät über das mitgelieferte 2 m lange USB-Kabel an einen PC an.



Warnhinweis!

Der RIDA®CYCLER darf nicht mit einem USB-Kabel verwendet werden, das länger als 3 m ist.

Stecken Sie das Netzkabel in das Netzteil und schließen Sie das Netzteil an der Rückseite des Geräts an.



Warnhinweis!

Um Funkenbildung zu vermeiden, vergewissern Sie sich, dass das Netzteil nicht an eine Steckdose angeschlossen ist, bevor Sie es an das Gerät anschließen.

Schließen Sie das Netzkabel an eine Steckdose an und schalten Sie den Strom an der Steckdose ein. Schalten Sie den RIDA®CYCLER über den Netzschalter auf der Rückseite ein.

Eine blau leuchtende LED Anzeige an der Vorderseite des Geräts zeigt an, dass der RIDA®CYCLER eingeschaltet und betriebsbereit ist.

Um das Gerät auszuschalten, betätigen Sie den Netzschalter auf der Rückseite.

1.2 Installation der Software

Installieren Sie die RIDA®CYCLER Software, die sich auf dem mitgelieferten USB-Stick befindet, auf einem PC.

Achten Sie darauf, dass der PC folgende Mindestanforderungen erfüllt:

- Windows® 7, 32-bit (Englische Version) Betriebssystem
- .NET Framework 4.5 oder höher
- Intel i5-Prozessor, 2,4 GHz
- 4 GB RAM
- 1 GB freie Festplattenkapazität
- USB-Laufwerk
- Adobe® Reader® muss installiert sein, um Berichte im PDF-Format ansehen zu können.

- Stellen Sie sicher, dass auf dem verwendeten PC die Bluetooth®-Einstellung verfügbar und aktiviert ist, wenn dies der bevorzugte Verbindungstyp ist.

Doppelklicken Sie im Menü des USB-Sticks auf das Installationsprogramm RIDA®CYCLER.msi. Folgen Sie den Anweisungen des Einrichtungsassistenten.

Wenn der Computer mit einem Netzwerk verbunden ist, verhindern möglicherweise die Sicherheitseinstellungen des Netzwerks das Ausführen dieses Vorgangs. Wenden Sie sich an Ihren Systemadministrator, um weitere Informationen hierzu zu erhalten.

Nach erfolgreicher Installation der Software, erscheint das Symbol der RIDA®CYCLER Software auf dem PC Desktop.

Öffnen Sie die RIDA®CYCLER Software über das Symbol auf dem Desktop.



Die Software erkennt die verfügbaren Geräte (Bluetooth® oder USB) und zeigt das entsprechende Gerätesymbol in der Symbolleiste (oben rechts) an.

Die Software kann mehrere Instrumente erkennen und zeigt diese an.



Abb. 1: Alle angeschlossenen Geräte sind nun betriebsbereit.

1.3 Software aktualisieren

Informationen über neue Software-Updates erhalten Sie über den R-Biopharm Newsletter. Überprüfen Sie trotzdem regelmäßig die Website (www.r-biopharm.com) auf neu verfügbare Software- und Firmware-Updates oder wenden Sie sich an Ihren Ansprechpartner bei R-Biopharm.

Laden Sie die Setup-Datei für das RIDA®CYCLER Software-Update herunter.

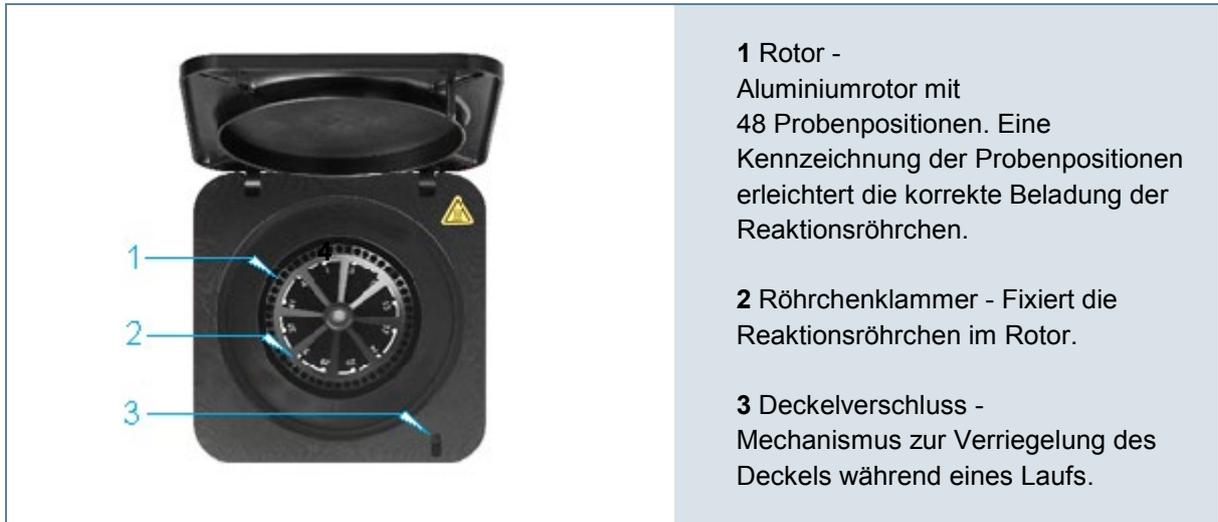
Doppelklicken Sie zum Starten der Installation auf die Setup-Datei und folgen Sie den Anweisungen. Die vorherige Version wird automatisch deinstalliert.

1.4 Firmware-Upgrade

Es kann vorkommen, dass eine neue Software-Version ein Firmware-Upgrade erfordert. In diesem Fall weist R-Biopharm den Benutzer gesondert auf das erforderliche Firmware-Upgrade hin.

Für das Firmware-Upgrade muss der RIDA®CYCLER über ein USB-Kabel mit dem PC verbunden sein. Firmware-Upgrades sind nicht über Bluetooth®-Verbindung möglich.

2 RIDA®CYCLER: Übersicht

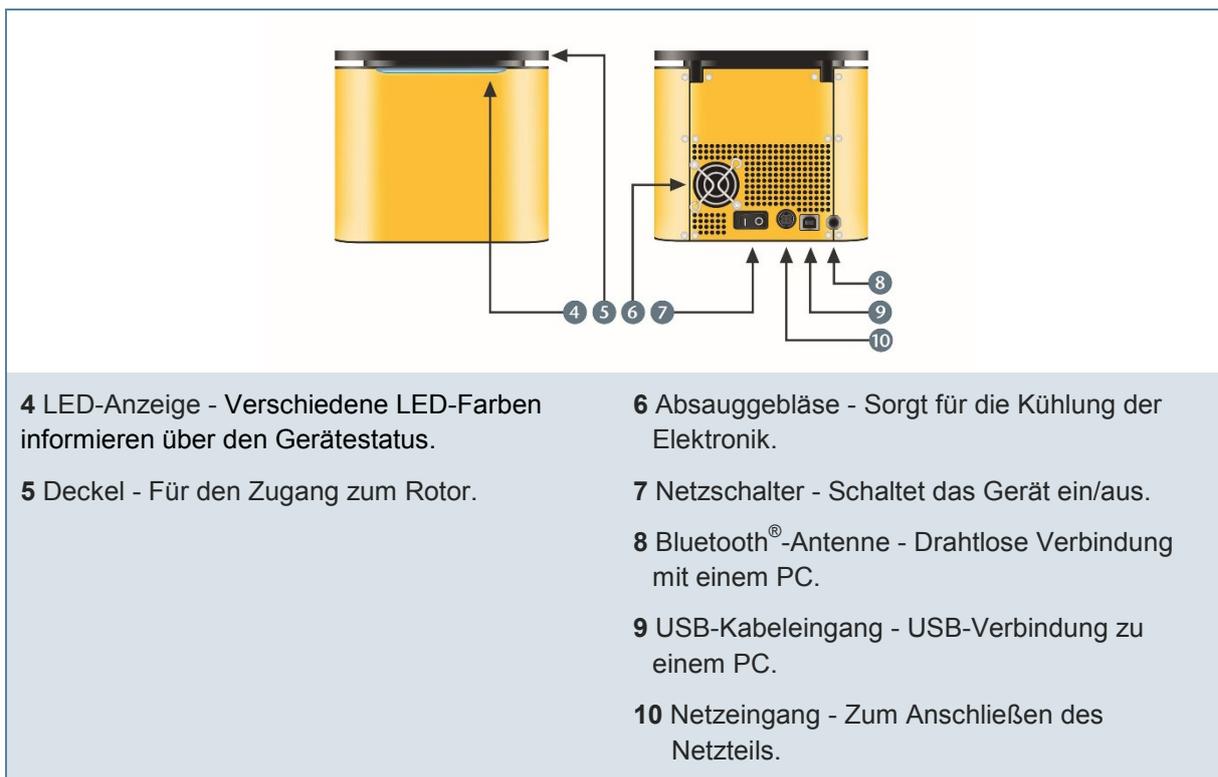


1 Rotor - Aluminiumrotor mit 48 Probenpositionen. Eine Kennzeichnung der Probenpositionen erleichtert die korrekte Beladung der Reaktionsröhrchen.

2 Röhrchenklammer - Fixiert die Reaktionsröhrchen im Rotor.

3 Deckelverschluss - Mechanismus zur Verriegelung des Deckels während eines Laufs.

Abb. 2: RIDA®CYCLER – Draufsicht



4 LED-Anzeige - Verschiedene LED-Farben informieren über den Gerätestatus.

5 Deckel - Für den Zugang zum Rotor.

6 Absauggebläse - Sorgt für die Kühlung der Elektronik.

7 Netzschalter - Schaltet das Gerät ein/aus.

8 Bluetooth®-Antenne - Drahtlose Verbindung mit einem PC.

9 USB-Kabeleingang - USB-Verbindung zu einem PC.

10 Netzeingang - Zum Anschließen des Netzteils.

Abb. 3: RIDA®CYCLER – Vorder- und Rückansicht

3 Verbrauchsmaterialien und Zubehör

	<p>Netzteil (Art. Nr. ZRC-MIC-PA)</p>	<p>Externe Stromversorgung für den RIDA®CYCLER. Im Lieferumfang des Geräts enthalten.</p>
	<p>Röhrchen und Kappen (Art. Nr. ZRC-MIC-TUBES)</p>	<p>Streifen aus vier Reaktionsgefäßen mit einem Volumenbereich von 5 – 30 µL. Mit Silikonöl vorgefüllt. Vorverpackt in einem Rack mit 48 Röhrchen, gestapelt in einer 5er-Reihe und verpackt als 4 x 5-Stapel. 1 Box ist im Lieferumfang des Geräts enthalten.</p>
	<p>Verschlusswerkzeug (Art. Nr. ZRC-MIC-CT)</p>	<p>Zum einfachen Einsetzen der Deckel in die Röhrchen. Im Lieferumfang des Geräts enthalten.</p>
	<p>Loadingblock (Art. Nr. ZRC-MIC-LB)</p>	<p>Aluminiumblock zum Beladen der Reaktionsröhrchen mit Reagenzien und Probe.</p>
	<p>MIC SBS Roboter-Ladeblock (Art. Nr. ZRC-MIC-SBSLB)</p>	<p>Ladeblock mit SBS-Abmessungen, passend für die meisten Liquid-Handling-Systeme. Lädt MIC-Racks mit 2 x 48 Kavitäten. (Nicht im Lieferumfang des Geräts enthalten.)</p>

Abb. 4: Verbrauchsmaterialien und Zubehör

4 Farben der LED-Anzeige

Die LED-Anzeige ändert ihre Farbe und blinkt bei bestimmten Gerätevorgängen.

Blau dauerhaft:	Der RIDA®CYCLER ist eingeschaltet und einsatzbereit (Idle).
Blau blinkend:	Der RIDA®CYCLER wurde zum Start eines Laufs ausgewählt. Dieses Gerät kann nicht mehr von einem anderen Benutzer ausgewählt werden, bis der betreffende Lauf abgeschlossen ist.
Grün:	Der RIDA®CYCLER läuft (Running).
Grün blinkend:	Der Lauf wurde erfolgreich beendet.
Rot blinkend:	Der Lauf wurde abgebrochen (Aborted). Während des Laufs trat ein Problem auf oder es findet ein Upgrade der Firmware statt.

5 Erste Schritte

5.1 Rörchen laden

Jedes Reaktionsröhrchen ist Teil eines Viererstreifens. Eine Nase (Tab) am ersten Röhrchen dient als Markierung und somit Hilfestellung bei der ordnungsgemäßen Beladung des Rotors mit den Streifen. Jedes Röhrchen ist mit Silikonöl vorgefüllt, das während der qPCR als Barriere gegen Verdunstung und Kondensation wirkt. Dadurch wird die Reaktionsleistung verbessert und es ist kein beheizter Deckel erforderlich. Das zulässige Gesamtvolumen eines Röhrchens beträgt 5 - 30 µL.

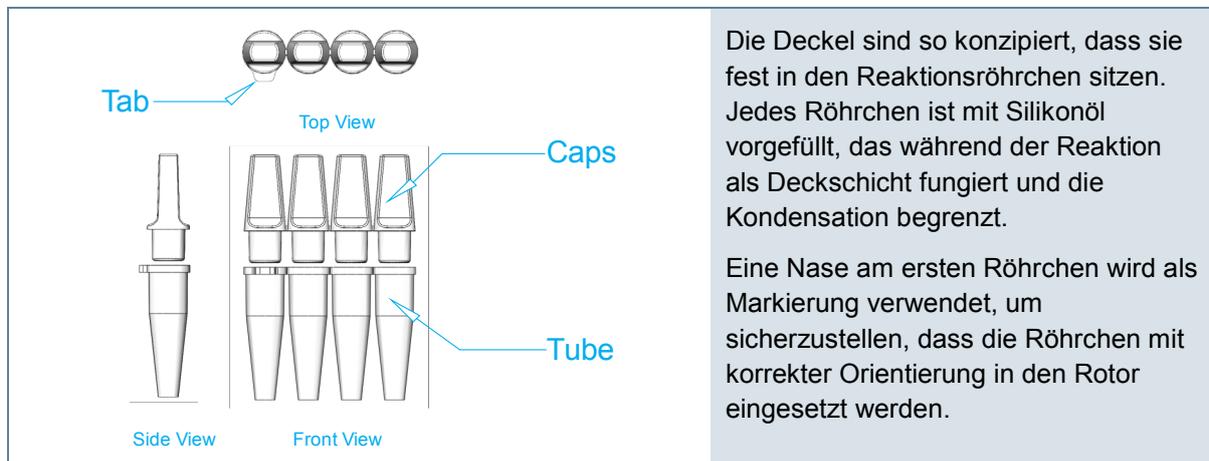


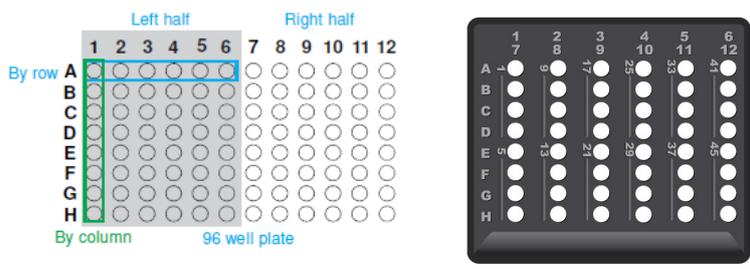
Abb. 5: Verschließen der Röhrchen

Verwenden Sie die mitgelieferten Laderacks als Röhrchenständer beim Pipettieren von Reagenzien und Proben.

Die Röhrchen sind im Laderack vorverpackt, wobei die Nase am Röhrchen mit den Markierungen am Laderack korrespondiert.

Das Laderack ist auch mit einer Mehrkanalpipette (8-Kanal) kompatibel. In diesem Fall erfolgt die Bestückung nicht in der standardmäßigen Abwärtsrichtung (A1, B1, C1...) sondern in Richtung der oberen Reihe des Ladeblocks (A1, A2, A3...). Die Software bietet die Möglichkeit, die Anzeige von Proben, je nach ausgewähltem Layouttyp, zu ändern.

 Stellen Sie sicher, dass bei Verwendung einer Mehrkanalpipette nur die ersten sechs Spitzenpositionen verwendet werden und nicht alle acht.



Grün hervorgehobene Kavitäten folgen der standardmäßigen Bestückungsausrichtung (A1, B1, C1 ...).

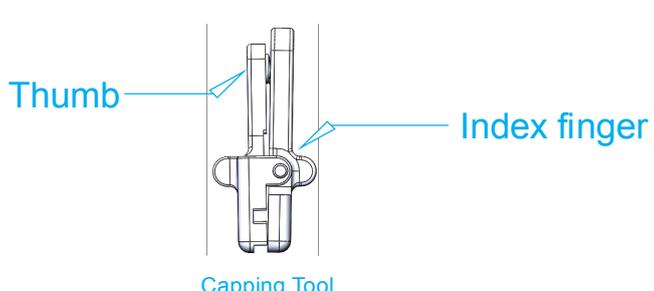
Blau hervorgehobene Kavitäten folgen der Mehrkanalpipetten-Bestückungsausrichtung (A1, A2, A3 ...).

Der Bestückungsvorgang ermöglicht das Laden einer halben 96-Well-Platte pro Ladeblock.

Abb. 6: Ausrichtung des Laderacks

Wenn die Rörchchen geladen sind, setzen Sie die Deckel richtig auf, um sicherzustellen, dass die Rörchchen fest verschlossen sind.

Verwenden Sie das mitgelieferte Verschlusswerkzeug (Capping Tool), um die Deckel korrekt aufzustecken und Kreuzkontaminationen zu vermeiden.



Das Verschlusswerkzeug ist so konstruiert, dass es einen Streifen mit vier Deckeln schließt.

Drücken Sie mit Daumen (Thumb) und Zeigefinger (Index finger), auf beiden Seiten des Tools, die Deckel in die Tubes um diese fest zu verschließen.

Entfernen Sie das Werkzeug durch Ausspannen der Deckel.

Abb. 7: Handhabung des Verschlusswerkzeuges.

Die Deckel können später entfernt werden, um auf die post-PCR-Reaktion für nachgeschaltete Anwendungen wie Gelelektrophorese oder DNA-Sequenzierung zuzugreifen.

 **Warnhinweis!**
Stellen Sie sicher, dass post-PCR-Amplikons außerhalb einer (prä-)PCR-Umgebung bearbeitet werden, um Kontaminationen durch PCR-Produkte (Amplifikate) zu vermeiden.

Setzen Sie die Reaktionsrörchchen so in den Rotor ein, dass die Rörchchenmarkierung (Nase) mit der Markierung auf dem Rotor übereinstimmt.

Verwenden Sie mit Wasser befüllte Rörhchen (Tara-Rörhchen) für die unbesetzten Kavitäten im Rotor.

Kavitäten ohne Rörhchen, mit leeren Rörhchen sowie Rörhchen mit unterschiedlichen Flüssigkeitsmengen weisen unterschiedliche Wärmelasten auf dem Metallrotor auf. Wärmelastschwankungen um den Rotor herum können sowohl bei statischen Temperaturen als auch während des Hochfahrens signifikante Wärmegradienten verursachen. Für gewisse Analyseverfahren können bereits geringe Temperaturschwankungen zu Abweichungen der Ergebnisse führen. Da die Ölschicht die Verdunstung verhindert, können diese mit Wasser befüllten Rörhchen über mehrere Läufe hinweg wiederverwendet werden.

**Allgemeiner Sicherheitshinweis!**

Um eine optimale Temperaturuniformität zu erreichen, wird das Auffüllen der unbesetzten Kavitäten im Rotor mit Wasser befüllten Reaktions-Rörhchen empfohlen. Das zu verwendende Volumen richtet sich nach dem Volumen der Probenrörhchen.

Positionieren Sie im Anschluss die magnetische Rörhchenklammer im Rotor.

Diese schützt davor, dass sich Rörhchen oder Deckel während eines Laufs aus dem Rotor lösen.

Nachdem der Deckel geschlossen wurde, kann der RIDA®CYCLER gestartet werden.

Mit geöffnetem Gerätedeckel ist das Starten eines Laufes nicht möglich. Dies dient dazu, Verletzungen des Anwenders und/oder Schäden am Gerät zu vermeiden.

Ein Öffnen des Gerätedeckels während eines Laufs wird durch eine Verriegelung verhindert.

5.2 Rörhchen entnehmen**Wenn der Lauf abgeschlossen und das Gerät abgekühlt ist, löst sich die Deckelverriegelung und Sie können den Deckel öffnen.**

Die LED an der Vorderseite des RIDA®CYCLER blinkt grün.

**Warnung, heiße Oberfläche!**

Wenn sich die Deckelverriegelung aufgrund eines Stromausfalls oder eines Fehlers vor dem Abbruch des Laufs gelöst hat, öffnen Sie den Deckel bitte mindestens 5 Minuten lang nicht, bis die Kammer abgekühlt ist um Verletzungen zu vermeiden.

Der Rotor in der Kammer kann über 40 °C heiß sein.

Entfernen Sie die Rörhchenklammer und nehmen Sie die Reaktionsrörhchen aus den Kavitäten des Rotors heraus. Setzen Sie die Rörhchenklammer im Anschluss wieder in das Gerät ein, um Verlust oder Beschädigung zu vermeiden.

6 Software Übersicht

Die Software ist in mehrere Abschnitte unterteilt:

1. Tool Bar (Symbolleiste)
2. File Tabs (Dateireiter)
3. Navigator Bar (Navigationsleiste)
4. File Active Windows (Aktive Fenster Datei)
5. Samples Selector (Probenauswahl)



Abb. 8: Übersicht Hauptmenü

6.1 Tool Bar (Symbolleiste)

Der obere Abschnitt der Benutzeroberfläche wird als **Tool bar (Symbolleiste)** bezeichnet und besteht aus folgenden Funktionen:



Abb. 9: Übersicht Tool Bar (Symbolleiste)

Help (Hilfe)	Zugriff auf RIDA®CYCLER Manual (Bedienungsanleitung), Create Support Package (Support-Paket erstellen), Install Template (Template in der Software installieren) und About RIDA®CYCLER (Allgemeine Informationen zum RIDA®CYCLER).
New (Neu)	Einen neuen Run (Lauf) oder ein neues Project (Projekt) erstellen.
Open (Öffnen)	Einen gespeicherten Run (Lauf) aus einem Dateiverzeichnis öffnen.
Save (Speichern)	Einen offenen Run (Lauf) speichern.
Save as (Speichern unter)	Einen offenen Run (Lauf) unter einem anderen Dateinamen oder als ein Run Template (Laufvorlage) oder Excel Workbook (Excel-Arbeitsmappe) speichern.
Instrument (Gerät)	Geräte, die mit der Software ansteuerbar sind, sind in der Symbolleiste angezeigt.
Instrument Communication (Gerätekommunikation)	Verfügbare Geräte über USB oder Bluetooth® suchen.

6.1.1 Hilfe-Symbol

Über das Symbol **Help (Hilfe)** können Sie auf folgende Optionen zugreifen:

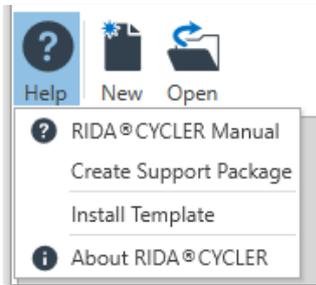


Abb. 10: Übersicht Symbol **Help (Hilfe)**

RIDA®CYCLER Manual (Bedienungsanleitung)	Eine elektronische Version der Bedienungsanleitung ist in der Software gespeichert.
Create Support Package (Support-Paket erstellen)	Erstellen Sie ein Support-Paket, nachdem ein Fehler mit der Software oder Hardware aufgetreten ist. Das Support-Paket enthält eine komprimierte Protokolldatei des Laufs. Wählen Sie einen Ordner zum Speichern des Support-Pakets aus. Senden Sie die gezippte Support-Paket-Datei per E-Mail an pcr@r-biopharm.de .
Install Template (Vorlage installieren)	Laden Sie von R-Biopharm zur Verfügung gestellte Templates über den Menüpunkt „Install Template“ in die RIDA®CYCLER Software. Die von R-Biopharm bereitgestellten Templates enthalten bereits alle benötigten Thermalprofil-Einstellungen.
About RIDA®CYCLER (Über den RIDA®CYCLER)	Informationen zur Version der RIDA®CYCLER-Software.



Allgemeiner Sicherheitshinweis!

Vor dem Start eines Laufs müssen die benötigten Templates und Assays installiert werden.

6.1.2 Laufdateien öffnen

Es gibt unterschiedliche Dateitypen:

.rcyclerrun (Laufdatei): enthält Informationen über verwendete Tests, Laufprofil, Anmerkungen zur Probe, Rohdaten und analysierte Daten (Zahnrad-Symbol).

.rcyclertemplate (Laufvorlage): enthält eine komplette Vorlage inklusive Probenannotation (optional). Eine Vorlage kann für wiederkehrende Läufe mit jeweils gleichem Muster verwendet werden. Verwenden Sie **New (Neu)**, um eine Laufvorlage zu öffnen.

.rcyclerproj (Projekte): Analyse einer Kombination von kompatiblen Läufen.

6.1.3 Geräte-Symbol

Geräte, die mit dem PC kommunizieren, werden in der Symbolleiste mit Hilfe eines **Instrument icons (Geräte-Symbol)** angezeigt.

Ein Bluetooth® oder USB-Symbol zeigt den Typ der hergestellten Verbindung an.

Die Seriennummer bzw. der Name des Geräts werden neben dem Kommunikationssymbol angezeigt.

Ebenfalls angezeigt wird der momentane Status des RIDA®CYCLER:

Idle (Leerlauf)	Der RIDA®CYCLER kann verwendet werden, um einen Lauf zu starten.
Setup (Einrichten)	Es wurden Laufinformationen von einem anderen verbundenen PC auf den RIDA®CYCLER übertragen, der Lauf allerdings wurde noch nicht gestartet. Dieses Gerät kann erst nach Abschluss (oder Abbruch) dieses Laufs wieder verwendet werden.
Running (Läuft)	Der RIDA®CYCLER läuft und kann nicht verwendet werden, bis der Lauf abgeschlossen ist.
Offline	Die Verbindung zwischen Gerät und PC/Software ist unterbrochen.
Reconnecting (Verbindung wird wieder hergestellt)	Der RIDA®CYCLER stellt die Verbindung mit dem PC (während eines Laufs) wieder her.

Klicken Sie auf das Geräte-Symbol, um die folgenden Optionen anzuzeigen:

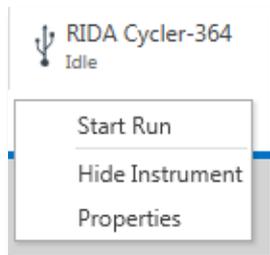


Abb. 11: Übersicht Instrument Icon (Geräte-Symbol)

Start Run (Lauf starten)	Ein Lauf beginnt durch Auswahl der Option Start Run (Lauf starten) . Diese Option erscheint nur, wenn ein New Run (Neuer Lauf) geöffnet wurde.
Hide Instruments (Geräte ausblenden)	Wählen Sie Hide Instrument (Gerät ausblenden) , wenn ein bestimmtes Gerät nicht in der Software angezeigt werden soll. Verwenden Sie diese Option, wenn Sie z.B. Ihren PC nur mit dem Gerät verbinden möchten, das auch für den PCR-Lauf genutzt werden soll.
Unhide (Einblenden)	Zum Einblenden eines Geräts wählen Sie das Abwärts-Dreieck , um eine Liste der ausgeblendeten Geräte anzuzeigen; wählen Sie dann das Gerät aus, das Sie einblenden möchten.

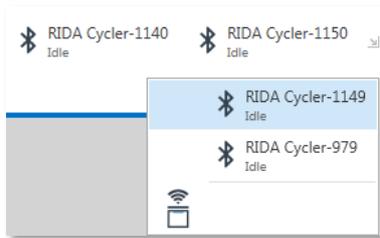


Abb. 12: Option **Hide instrument** (Gerät ausblenden)

Properties (Eigenschaften)	Hier können Sie den Namen des Geräts ändern. Zudem sind Informationen zu Seriennummer und Firmware-Version hinterlegt.
Update Firmware (Firmware updaten)	Das Updaten der Geräte-Firmware ist nur nach bestimmten Updates der RIDA®CYCLER Software notwendig/verfügbar.

Einige Optionen werden nur bei Bedarf angezeigt:

Reconnect Run (Lauf neu verbinden)	Wenn eine Bluetooth®-Verbindung verwendet wird, kann der PC nach einem Verbindungsverlust erneut mit dem RIDA®CYCLER verbunden werden.
Recover Run (Lauf wiederherstellen)	Der RIDA®CYCLER speichert die Daten eines durchgeführten Laufs, auch bei einem Verbindungsverlust zwischen dem PC und dem Gerät.
Reconstruct Run (Lauf rekonstruieren)	Ermöglicht dem Benutzer, den Lauf auf einem anderen PC zu öffnen, der mit dem Gerät verbunden ist.
Temperature Verification (Temperaturüberprüfung)	Mit dem Temperatur Verification System (TVS) können Sie feststellen, ob die Heizleistung des Gerätes die geforderten Spezifikationen erfüllt. Siehe Anhang A zur Bedienung des TVS. Diese Option wird nur angezeigt, wenn das TVS über USB angeschlossen ist.

In der Symbolleiste können vom System erkannte Instrumente nach Name oder Seriennummer sortiert werden. Gehen Sie dazu mit der Steuerung auf den Pfeil, rechts neben den aufgeführten Geräten und wählen Sie Ihre gewünschte Sortierung.

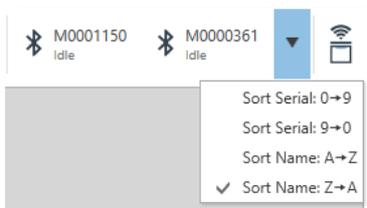


Abb. 13: Geräte-Sortierungsfunktion

6.1.4 Symbol Gerätekommunikation

Das Symbol für die Gerätekommunikation wird verwendet, um nach Geräten in der Nähe über Bluetooth® und/oder USB zu suchen.

Beim Start der Software blinkt das Symbol automatisch und zeigt an, dass die Software nach Geräten sucht.

Die maximale Reichweite der Bluetooth®-Antenne beträgt ca. 7 m, abhängig von der Beschaffenheit der Umgebung.



Abb. 14: Symbol Gerätekommunikation

6.2 Dateireiter

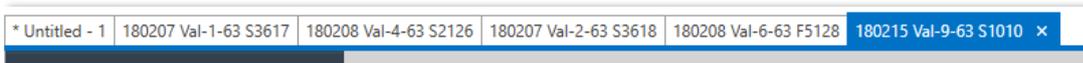


Abb. 15: File Tabs (Dateireiter)

Jede geöffnete Datei wird mit ihrem Namen auf einem Reiter angezeigt. Es können mehrere Dateien gleichzeitig geöffnet sein. Die Datei, die im Hauptfenster angezeigt wird, ist blau hervorgehoben. Dateien, die gespeichert werden müssen, sind mit einem Sternchen unmittelbar vor dem Dateinamen versehen. Wenn eine Datei mit einem noch nicht abgeschlossenen Lauf verknüpft ist, wird durch Auswahl des ausführenden Geräts die zugehörige Registerkarte geöffnet.

Verwenden Sie den Abwärtspfeil, um Dateien anzusehen, die nicht angezeigt werden, wenn zu viele Registerkarten gleichzeitig geöffnet sind.

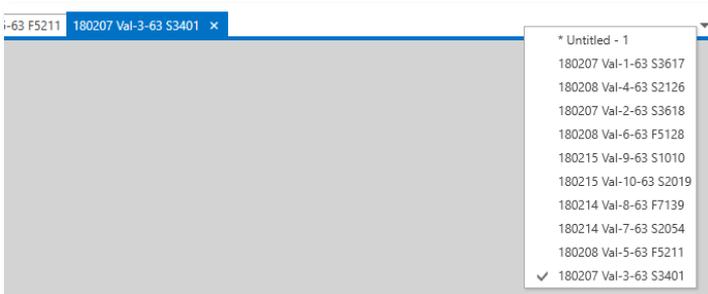


Abb. 16: Dateireiter – Übersicht

6.3 Navigationsleiste

Auf der linken Seite der Hauptbenutzeroberfläche befindet sich die **Navigator bar (Navigationsleiste)**. In diesem Bereich können Sie sich Informationen zu ausgewählten **Assays (Test)** oder einem **Run (Lauf)** anzeigen lassen.

Einige Abschnitte enthalten Unterabschnitte, die durch Erweitern des Navigationsbaums angezeigt werden können.

Abschnitte, die im Hauptfenster geöffnet sind, werden blau hervorgehoben. Dateispezifische, wichtige Abschnitte sind fett hervorgehoben.

Entfernen Sie Assays (Tests) und Analysen mithilfe des **delete icon (Löschen Symbol)**.

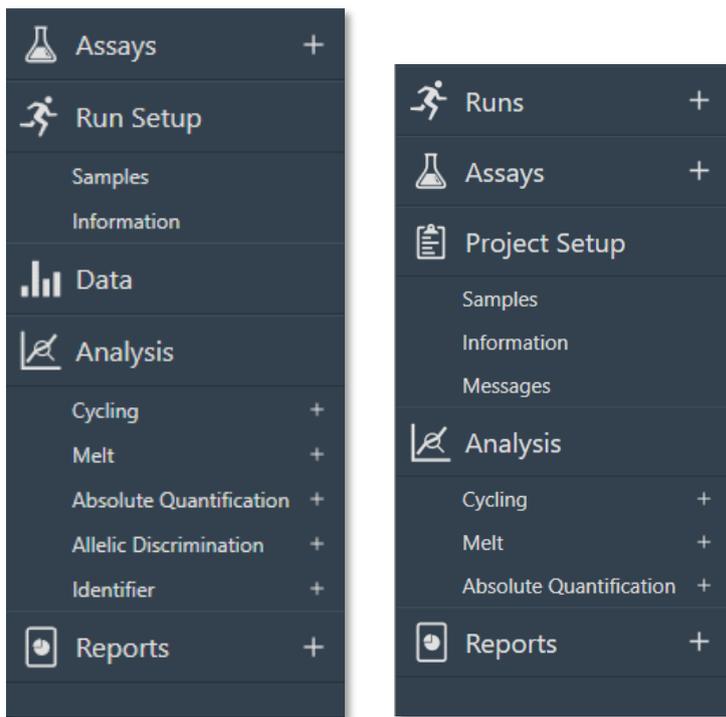


Abb. 17: Navigator Bar (Navigationsleiste) für Läufe (links) und Projekte (rechts)

6.4 Aktive Fenster Datei

Im zentralen Bereich der Benutzeroberfläche befinden sich segmentierte Fenster, die für einen bestimmten Bereich der Navigationsleiste aktiv sind.

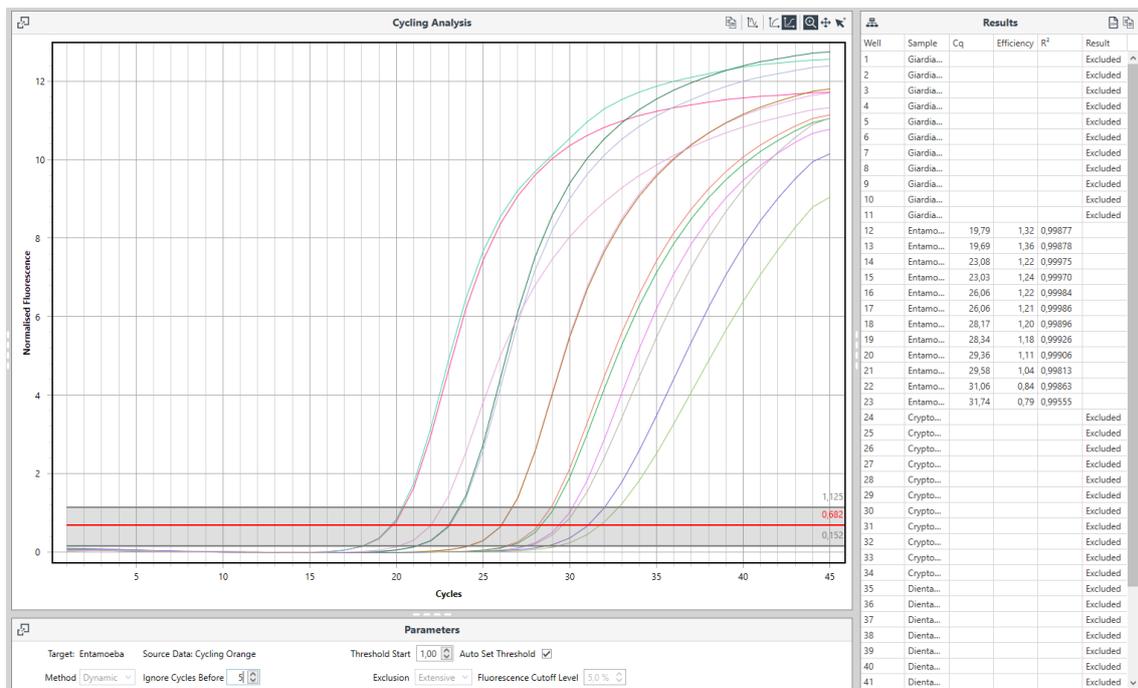


Abb. 18: Cycling-Analyse Fenster mit Ergebnissen eines Experiments

Raw Data (Rohdaten)	Die Daten werden während des Laufs in Echtzeit aktualisiert und stehen nach abgeschlossenem Lauf zur Verfügung. Die Diagramme werden während eines Laufs automatisch skaliert, können bei Bedarf aber auch manuell angepasst werden.
Analysis graph (Analysediagramm)	Analysierte Daten, die je nach gewählter Analyse in einem bestimmten Diagrammtyp angezeigt werden. Die Diagramme können durch Bewegen der Achsen manuell skaliert werden.
Analysis Parameters (Analyseparameter)	Bestimmte Einstellungen können zur Optimierung der Auswertung angepasst werden.
Results table (Ergebnistabelle)	Numerische Darstellung der analysierten Daten. Die Tabelle kann so eingerichtet werden, dass die Proben als Replikate mit Mittelwert und Standardabweichung oder als einzelne Kavitäten angezeigt werden.

6.4.1 Export in CSV oder Kopieren in die Zwischenablage

Jede **Result table (Ergebnistabelle)** und jeder **Samples editor (Probeneditor)** bietet zwei Optionen zum Kopieren der Daten für den einfachen Export in eine Software von Drittanbietern:

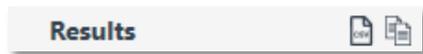


Abb. 19: Ergebnistabelle

CSV	Speichern der Ergebnisse als CSV-Datei.
Copy to Clip board (Kopieren in die Zwischenablage)	Kopieren der Ergebnisse in die Zwischenablage und anschließendes Kopieren in eine andere Software von Drittanbietern wie bspw. Microsoft® Word®.

6.4.2 Rohdaten exportieren

Die Rohdaten einzelner Läufe können über das Symbol **Save the data as a CSV file (Daten als CSV-Datei speichern)** exportiert werden.



Abb. 20: Symbol zum Speichern von Daten als CSV-Datei

6.4.3 Diagramm als Bitmap exportieren

Kopieren Sie die Diagramme in ein Bitmap-Format, um sie in eine beliebige Software zur Dokumentenverarbeitung von Drittanbietern (z.B. Microsoft® Word®) einzufügen.

Um sicherzustellen, dass Sie so viele Details im Bild wie möglich beibehalten, passen Sie das Bild an die größtmögliche Ansicht an.

Wählen Sie das Symbol **Copy chart to the clipboard (Diagramm in die Zwischenablage kopieren).**



Abb. 21: Symbol zum Kopieren von Diagrammen in die Zwischenablage

Fügen Sie das Bild als Bitmap in die Software zur Dokumentenverarbeitung von Drittanbietern ein.

Das Bild sollte für Veröffentlichungszwecke von ausreichender Qualität sein.

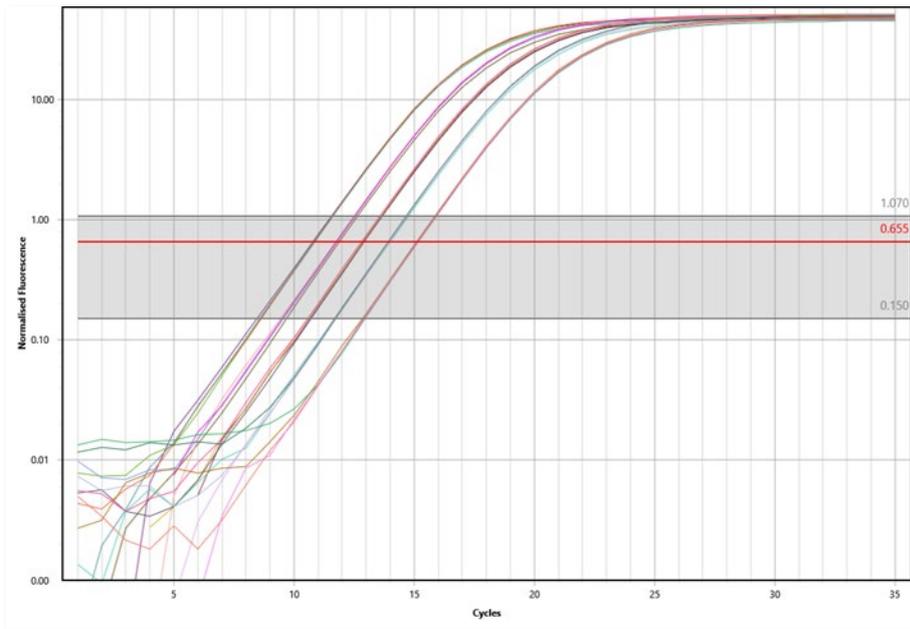


Abb. 22: Ergebnisbild als Bitmap

6.4.4 Organisation der Ergebnistabelle

Jede Spalte kann in aufsteigender und absteigender Reihenfolge sortiert werden, indem Sie mit der linken oder rechten Maustaste auf die Kopfzeile einer Spalte klicken können Sie die Sortierung direkt bzw. über ein kleines Menü anpassen.

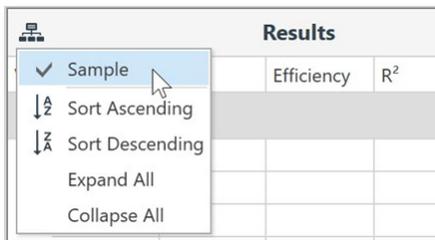


Abb. 23: Sortieroptionen für Proben

6.4.5 Größeneinstellungsleisten

Die Breite oder Höhe dieser Fenster, relativ zueinander, kann mit den Größeneinstellungsleisten eingestellt werden.

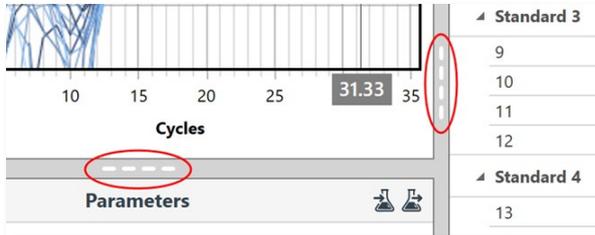


Abb. 24: Größeneinstellungsleisten, hervorgehoben in Rot.

6.4.6 Funktionen zur Anzeige von Diagrammen

Es stehen drei Funktionen zur Anzeige von Diagrammen zur Verfügung:



Abb. 25: Funktionen zur Anzeige von Diagrammen

Zoom (Vergrößern/Verkleinern)	Einen ausgewählten Bereich vergrößern, um mehr Details im Diagramm anzuzeigen. Um den Ausschnitt zu verkleinern, doppelklicken Sie an einer beliebigen Stelle in das Diagramm.
Pan (Verschieben)	Durch die Kombination der Zoom-Funktion mit Pan (Verschieben) können Sie die Anzeige um ein vergrößertes Sichtfeld verschieben, um bestimmte Bereiche des Diagramms zu lokalisieren und zu fokussieren.
Select samples (Proben auswählen)	Nur die ausgewählten Proben werden im Diagramm angezeigt.

Cross hairs (Fadenkreuz): Hier können Sie die Koordinaten für die X-Achse und die Y-Achse für jedes angezeigte Diagramm finden. Die Werte werden in einem grauen Textfeld entlang der Achsen angezeigt.

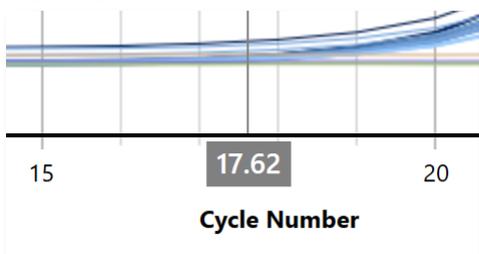


Abb. 26: Fadenkreuz

7 Samples Selector (Probenauswahl)

Wählen Sie mit dem **Samples selector (Probenauswahl)** auf der rechten Seite der Benutzeroberfläche bestimmte Proben an und ab, indem Sie auf die Probenleiste klicken. Alternativ können Sie nur die benannten Proben mit **Select Name (Name auswählen)** oder alle Proben mit **Select All (Alle auswählen)** auswählen, oder alle Proben mit **Select None (Keine auswählen)** abwählen.

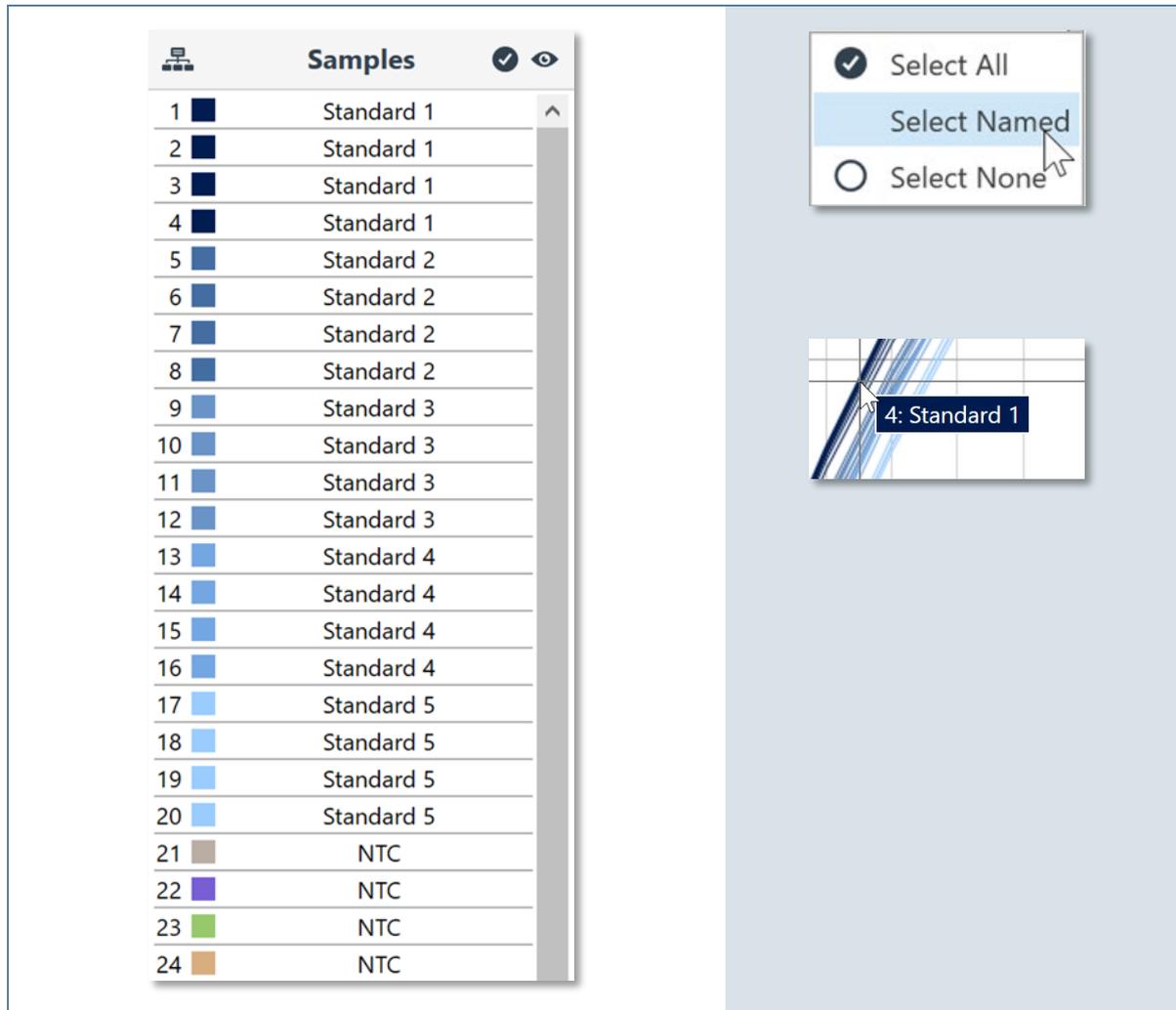


Abb. 27: Probenauswahlleiste

Wenn Sie mit dem Mauszeiger über eine Probe in einem Diagramm fahren, wird die Probe hervorgehoben, indem die Linie dicker gezeichnet und der Name der Probe in einem kleinen Textfeld zusammen mit der Positionsnummer im Rotor angezeigt wird. In der Probenleiste wird die entsprechende Probe ebenfalls schwarz hervorgehoben. Umgekehrt wird eine einzelne Probe ebenfalls im Diagramm hervorgehoben, wenn Sie den Mauszeiger über die Probenauswahlleiste bewegen.

Verwenden Sie die Probenauswahl, um Proben aus der Analyse zu entfernen oder wieder hinzuzufügen. Das Entfernen oder Hinzufügen von Proben aus der Analyse kann die Position des W-o-L (Window of Linearity) und daher den automatischen Threshold verändern. Schlecht amplifizierte Proben können die Leistung des LinRegPCR-Algorithmus beeinträchtigen und verhindern, dass ein W-o-L ermittelt wird. Eine Entfernung solcher Proben aus der Analyse erleichtert die Bestimmung des W-o-L.

Um eine Probe nur in einem Diagramm auszublenden und sie nicht aus der Analyse zu entfernen, verwenden Sie das **View icon (Anzeige-Symbol)** in der Probenauswahl. Es gibt auch die Optionen **Show All (Alle anzeigen)** oder **Hide All (Alle ausblenden)**.

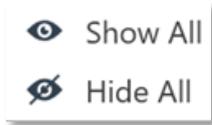


Abb. 28: Schaltfläche für das Ein-/Ausblenden von Proben

7.1 Probenauswahl-Gruppierung

Wählen Sie das Symbol **Samples Selector Grouping (Probenauswahl-Gruppierung)**, um die Probenauswahl anhand von **Assay (Test)**, **Sample Name (Probenname)** oder **None (Keine)**(Reihenfolge der Kavitäten) zu sortieren.

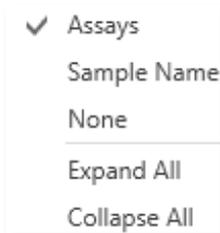


Abb. 29: Probengruppierung

Diese Option erleichtert das Ein- oder Ausblenden von vorgruppierten Proben. Sie haben auch die Möglichkeit, die Gruppierungen zu reduzieren (**Collapse**) oder zu erweitern (**Expand**), um die Unordnung der Probenauswahl zu minimieren.

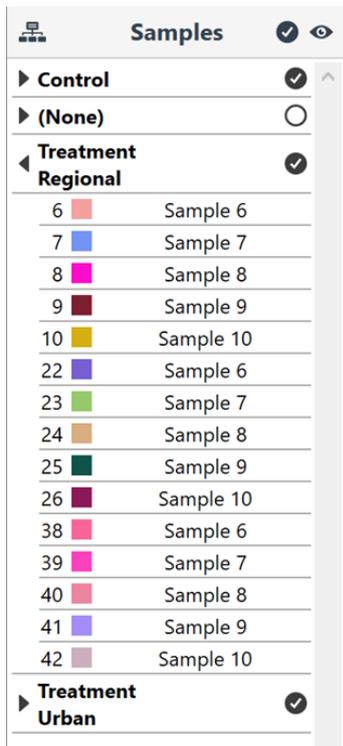


Abb. 30: Probenübersicht

8 Neuen Lauf erstellen

Wählen Sie **New (Neu)** im Symbolleisten-Menü und anschließend das **Template (Vorlage)** für Ihren Lauf aus.

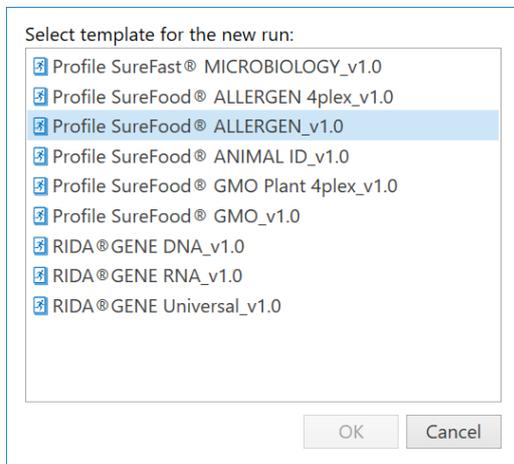


Abb. 31: Fenster zur Template (Vorlage)- Auswahl

8.1 Tests hinzufügen

Wählen Sie die **Assays (Tests)** aus, die für den Lauf benötigt werden, indem Sie die Schaltfläche **Add (Hinzufügen)** auswählen.

Sie können aus einer beliebigen Test-Bibliothek, neben der Navigationsleiste, auswählen. Standardmäßig wird die RIDA®CYCLER-Bibliothek angezeigt.

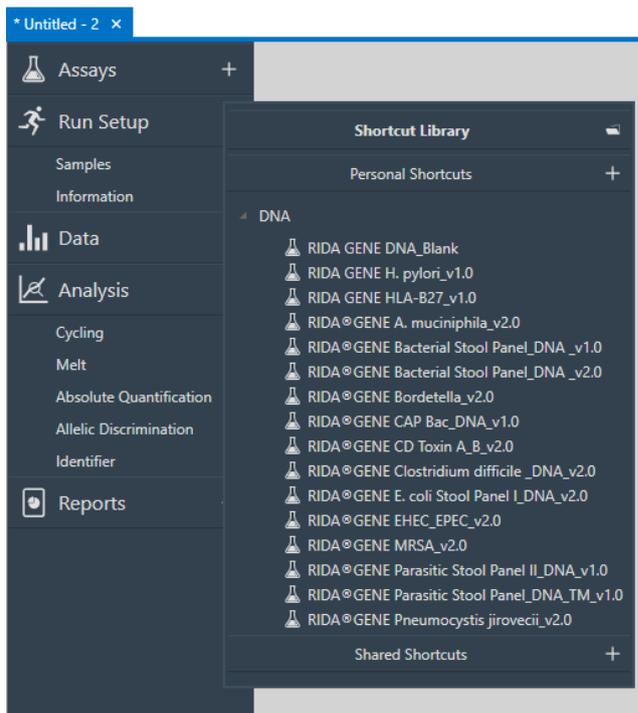


Abb. 32: Navigationsleiste mit Test-Bibliothek

Wählen Sie mithilfe des Dateisymbols einen Test aus einem beliebigen Verzeichnis aus.

Verwenden Sie den Datei-Explorer, um den von Ihnen benötigten Test zu finden, einschließlich Netzwerklaufwerken oder externen Festplatten wie einem USB-Stick.



Abb. 33: Shortcut-Bibliothek

Sie können einen neuen Personal Shortcut (Persönliche Verknüpfung) für eine Test-Bibliothek erstellen.

Wählen Sie die + Schaltfläche neben Personal Shortcuts (Persönliche Verknüpfungen) aus. Suchen und wählen Sie dann den Speicherort des neuen Verzeichnisses aus, das Sie als persönliche Test-Bibliothek verwenden möchten.



Abb. 34: Schaltfläche zum Erstellen einer Verknüpfung zu Ihrer gespeicherten Assay Test-Verknüpfung

Erstellen eines Shared Shortcut (Geteilte Verknüpfung).

Wenn mehrere Benutzer, die Software über einen PC oder ein Netzlaufwerk nutzen, kann mit dieser Funktion ein gemeinsamer Speicherort für alle Tests erstellt werden.



Abb. 35: Schaltfläche zum Erstellen von geteilten Verknüpfungen

Sie können durch Klicken neben den Menüpunkt (My Assays) den hinterlegten Speicherort verändern (Edit location) oder löschen (Delete).



Abb. 36: Über diesen Menüpunkt kann der Speicherort der Test-Bibliothek bearbeitet werden

Nach Auswahl eines Tests können Assay Profile (Test-Profil), Analysis Settings (Analyseeinstellungen) und Information (Informationen) angezeigt werden.

Entfernen Sie Tests mithilfe der Schaltfläche Delete (Löschen) neben dem Testnamen.

8.2 Kompatibilität des Testprofils

Wenn ein Test ausgewählt wird, dessen thermales Profile (Profil) nicht mit dem im Template (Vorlage) hinterlegten Profil kompatibel ist, wird von der Software folgende Warnmeldung angezeigt:

„Assay [Name des ausgewählten Tests] is not compatible with the run. (Der ausgewählte Test ist nicht mit dem Lauf kompatibel). **The assay’s profile and current run’s profile do not match and cannot be automatically adjusted.** (Das Profil des Tests und das aktuelle Laufprofil stimmen nicht überein und können nicht automatisch angepasst werden). **Please indicate how you wish to proceed:** (Bitte geben Sie an, wie Sie fortfahren möchten:).“

Wählen Sie eine der folgenden Optionen aus:

Modify Run (Lauf modifizieren)	Das Profil des Laufs wird so geändert, dass es mit dem ausgewählten Assay kompatibel ist. Dies kann dazu führen, dass bestehende Assays inkompatibel werden.
Modify Assay (Test modifizieren)	Das thermale Profil des zuletzt ausgewählten Assays (welches die Fehlermeldung hervorgerufen hat) wird an das thermale Profil des zuvor ausgewählten Templates angepasst.
Add Without Modification (Ohne Modifikation hinzufügen)	Der ausgewählte Assay wird ohne Modifikation hinzugefügt. Er bleibt solange inkompatibel, bis der Assay modifiziert wird. Beim Starten des Laufs wird das im Template hinterlegte thermale Profil gestartet.
Cancel (Abbrechen)	Der Assay wird nicht zum Lauf hinzugefügt.

Nicht kompatible Tests werden mit einem Warnsymbol angezeigt.

Wenn Sie den Mauszeiger auf das Warnsymbol bewegen, werden Ihnen die spezifischen Gründe für die Inkompatibilität angezeigt. Sie können sich auch unter **Assay Profile** das thermale Profil des inkompatiblen Assays anzeigen lassen und sich durch Anklicken von **more (mehr)** die Details aufrufen. In diesem Bereich stehen Ihnen folgende Optionen zur Auswahl:

Modify the run to match this profile (Template modifizieren, um ihn an es an das Thermale Profil des ausgewählten Assays anzupassen): Das Laufprofil des ausgewählten Templates wird modifiziert, um das thermale Profil, des gewünschten Assays abzubilden. Dies kann dazu führen, dass bereits ausgewählte Assays inkompatibel werden.

Modify this assay to match the run profile (Diesen Test modifizieren, um ihn an das Laufprofil anzupassen): Das Profil des Tests wird an den Lauf angepasst.

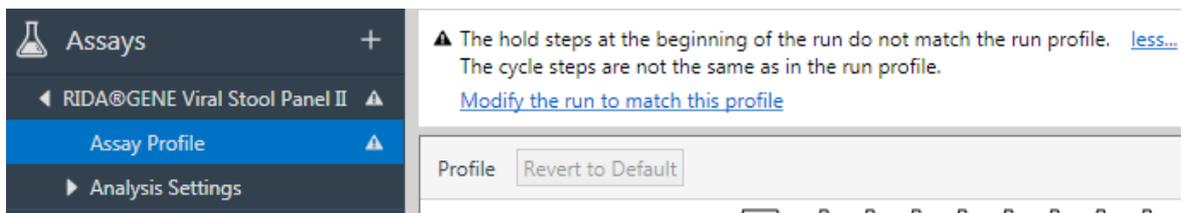


Abb. 37: Warnung bei Nichtkompatibilität von Assay (Test) und Run Profil aus dem Template (Vorlage).



Allgemeiner Sicherheitshinweis!

Testen Sie alle modifizierten Profile an einer kleinen Teilmenge der Proben, um zu bestätigen, dass diese Änderungen gültig sind, bevor Sie Versuche mit einer großen Anzahl von Proben durchführen. Dadurch vermeiden Sie einen wesentlichen Verlust wertvoller Proben und Reagenzien. Die Folge könnte eine suboptimale Leistung der qPCR sein, was zu schlechten Ergebnissen führt.

9 Lauf starten

Wählen Sie das **Instrument (Gerät)**, das Sie für den Lauf verwenden möchten, in der Symbolleiste aus.

Nur Geräte in **Idle (Leerlauf)** können ausgewählt werden, um einen Lauf zu starten.

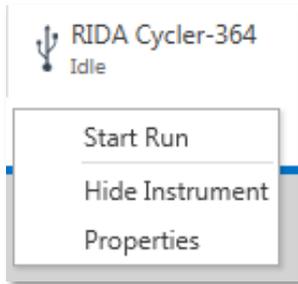


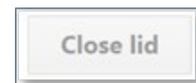
Abb. 38: Verfügbare Geräte werden in der Symbolleiste angezeigt

Wenn das Gerät ausgewählt ist, starten Sie den Lauf, indem Sie die Option **Start Run in der Dropdown-Liste auswählen.**

Ein Bestätigungsdialogfeld wird angezeigt.

Achten Sie darauf, dass die Röhrenklammer korrekt im Rotor positioniert ist, um zu verhindern, dass sich die Reaktionsröhrchen während eines Laufs lösen.

Stellen Sie sicher, dass der Deckel geschlossen ist, bevor Sie den Lauf starten. Ein Deckelsensor erkennt, ob der Deckel geöffnet ist, und verhindert das Starten des Geräts, während Sie eine Warnung über diesen Zustand informiert.



Prüfen Sie nach, ob das angezeigte Volumen für den angewählten Lauf korrekt ist.

Die LED-Anzeige des RIDA®CYCLER blinkt nun blau. Dies zeigt anderen Benutzern an, dass das Gerät ausgewählt wurde, um einen Lauf zu starten. Kein anderer Benutzer kann einen Lauf an dem Gerät starten, bis dieser Lauf abgeschlossen ist bzw. die Verbindung zu diesem Gerät durch „Cancel“ abgebrochen wird. Auf dem PC eines anderen Benutzers wird das Gerät nach Sterten des Laufs als Offline angezeigt und kann folglich nicht mehr ausgewählt werden.

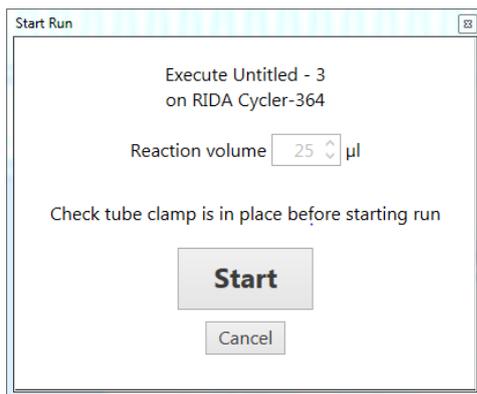


Abb. 39: Fenster für **Start Run (Lauf starten)**

Zum Ausführen des Laufs klicken Sie im Dialogfenster Start Run auf die Schaltfläche **Start (Lauf starten).**

Das Gerät verriegelt automatisch den Deckel und zentrifugiert die Proben. Im Anschluss startet direkt das hinterlegte thermale Profil. Die LED-Anzeige wechselt zu grün, um andere Anwender darüber zu informieren, dass der RIDA®CYCLER in Betrieb ist.

9.1 Probeneditor

Unter **Samples editor (Probeneditor)** können die Proben in Tabellenformat angezeigt und annotiert werden. Die Informationen zu den einzelnen Proben können vor, während oder nach einem Lauf bearbeitet werden. Wenn Proben nicht ordnungsgemäß mit Informationen versehen sind, kann dies die Analyse erschweren. Für die Probenannotation wird eine Standardtabelle bereitgestellt, die Position der Spalten ist jedoch veränderbar.

9.1.1 Layout der Kavitäten

Das Layout der Kavitäten ermöglicht das Bestücken aus einer 96-Well-Platte mit einer Mehrkanalpipette, wobei die Ausrichtung von Spalten zu Zeilen wechselt. Um sicherzustellen, dass die Software diese Änderung anzeigt, wählen Sie eine der folgenden Optionen aus.

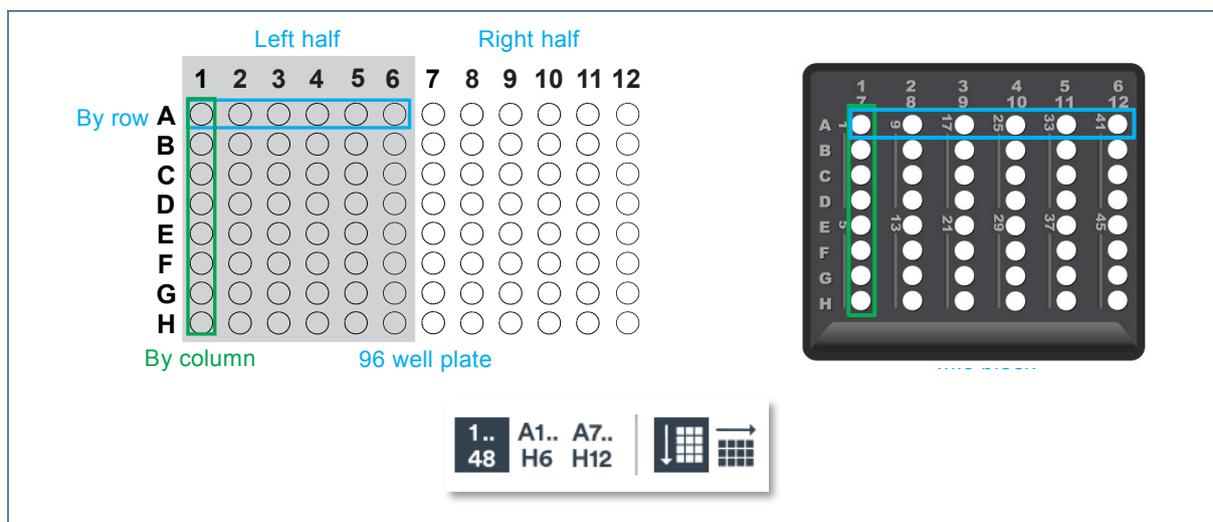


Abb. 40: Layout der Kavitäten

Kavitäten entweder numerisch (1, 2, 3 ...) oder alphanumerisch (A1, B1, C1) anzeigen.

Beim Bestücken aus einer 96-Well-Platte wählen Sie, ob die Proben von der linken Hälfte der 96-Well-Platte (A1 - H6) oder der rechten Hälfte (A7 - H12) angezeigt werden sollen.

Wenn Sie mit einer Mehrkanalpipette aus einer 96-Well-Platte bestücken, ändern Sie die Ausrichtung der Anzeige von **by column (nach Spalte)** zu **by rows (nach Zeilen)**.

9.1.2 Ausfüllen der Zellen

Zellen können einzeln oder in Gruppen ausgefüllt werden.

Mit der **Enter**-Taste wechseln Sie zur nächsten Zelle nach unten.

Mit der **Tab**-Taste gelangen Sie zur nächsten Spalte.

Verwenden Sie die Entfernen-Taste, um den Inhalt einer Zelle zu löschen.

Kopieren und fügen Sie Namen und Konzentrationen aus anderen Softwareprogrammen (z.B. Microsoft® Excel®) ein.

9.1.3 Farbkennzeichnung

Wählen Sie die gewünschte **Color (Farbe)** für jede Probe (optional).

Wählen Sie eine beliebige Farbe aus der Farbpalette oder erstellen Sie Ihre eigenen Farben mit Hilfe der Farbkarte.

Um einen Farbverlauf zu erstellen, wählen Sie die erste Farbe und markieren Sie bis zur letzten gewünschten Farbe. Klicken Sie dann auf das Symbol **Auto fill (Automatisch Ausfüllen)**.



Abb. 41: Symbol Auto fill (Automatisch Ausfüllen)

9.1.4 Probenbenennung

Geben Sie den **Name (Namen)** für jede Probe ein.

Proben mit denselben Zeichen und Tests werden als Replikate behandelt und in den meisten Analysen mit einem Mittelwert (\bar{x}) und einer Standardabweichung ($x\sigma_{(n-1)}$) angegeben.

Proben mit den gleichen Zeichen, aber unterschiedlichen Tests werden ausgehend vom Typ der gewählten Analyse verknüpft.

Sie können mehrere Zellen in einer Spalte markieren und dieselben Zeichen eingeben, um Replikate zu annotieren. Geben Sie alternativ den Namen in eine Zelle ein, markieren Sie diese Zelle und andere Zellen, die Teil der Replikate sind (markieren Sie nicht-benachbarte Zellen mit Strg + Klick), und wählen Sie dann das Symbol **Fill down (Abwärts ausfüllen)**, um allen ausgewählten Zellen den gleichen Namen zu geben.



Abb. 42: Symbol Fill down (Abwärts ausfüllen)

Verwenden Sie das Symbol **Auto fill (Automatisch Ausfüllen)**, um aufeinanderfolgende Proben zu annotieren (z.B. Probe 1, Probe 2, Probe 3...). Gehen Sie folgendermaßen vor, um Replikate zuzulassen:

Geben Sie die erste Zeichengruppe für den ersten Namen ein (Sample 1).	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Colour</th> <th>Name</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>■</td> <td>Sample 1</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>■</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		Colour	Name	1	■	Sample 1	2	■										
	Colour	Name																	
1	■	Sample 1																	
2	■																		
Lassen Sie die gleiche Anzahl von Zeilen wie die Anzahl der erforderlichen Replikate unter dem ersten Namen leer. Geben Sie den zweiten Namen der Sequenz ein (Sample 2).	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Colour</th> <th>Name</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>■</td> <td>Sample 1</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>■</td> <td></td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>■</td> <td></td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>■</td> <td>Sample 2</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>■</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		Colour	Name	1	■	Sample 1	2	■		3	■		4	■	Sample 2	5	■	
	Colour	Name																	
1	■	Sample 1																	
2	■																		
3	■																		
4	■	Sample 2																	
5	■																		

<p>Markieren Sie nun alle Zellen, die zum Ausfüllen der Namen und Replikate erforderlich sind.</p>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 5%;">#</th> <th style="width: 15%;">Colour</th> <th style="width: 80%;">Name</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>■</td><td>Sample 1</td></tr> <tr><td>2</td><td>■</td><td></td></tr> <tr><td>3</td><td>■</td><td></td></tr> <tr><td>4</td><td>■</td><td>Sample 2</td></tr> <tr><td>5</td><td>■</td><td></td></tr> <tr><td>6</td><td>■</td><td></td></tr> <tr><td>7</td><td>■</td><td></td></tr> <tr><td>8</td><td>■</td><td></td></tr> <tr><td>9</td><td>■</td><td></td></tr> <tr><td>10</td><td>■</td><td></td></tr> <tr><td>11</td><td>■</td><td></td></tr> <tr><td>12</td><td>■</td><td></td></tr> <tr><td>13</td><td>■</td><td></td></tr> <tr><td>14</td><td>■</td><td></td></tr> <tr><td>15</td><td>■</td><td></td></tr> <tr><td>16</td><td>■</td><td></td></tr> </tbody> </table>	#	Colour	Name	1	■	Sample 1	2	■		3	■		4	■	Sample 2	5	■		6	■		7	■		8	■		9	■		10	■		11	■		12	■		13	■		14	■		15	■		16	■	
#	Colour	Name																																																		
1	■	Sample 1																																																		
2	■																																																			
3	■																																																			
4	■	Sample 2																																																		
5	■																																																			
6	■																																																			
7	■																																																			
8	■																																																			
9	■																																																			
10	■																																																			
11	■																																																			
12	■																																																			
13	■																																																			
14	■																																																			
15	■																																																			
16	■																																																			
<p>Klicken Sie auf das Symbol Auto fill (Automatisch Ausfüllen).</p>																																																				
<p>Die fortlaufenden Namen basieren auf den ersten beiden Eingaben und die Replikate für jeden Namen werden automatisch ausgefüllt.</p>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 5%;">#</th> <th style="width: 15%;">Colour</th> <th style="width: 80%;">Name</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>■</td><td>Sample 1</td></tr> <tr><td>2</td><td>■</td><td>Sample 1</td></tr> <tr><td>3</td><td>■</td><td>Sample 1</td></tr> <tr><td>4</td><td>■</td><td>Sample 2</td></tr> <tr><td>5</td><td>■</td><td>Sample 2</td></tr> <tr><td>6</td><td>■</td><td>Sample 2</td></tr> <tr><td>7</td><td>■</td><td>Sample 3</td></tr> <tr><td>8</td><td>■</td><td>Sample 3</td></tr> <tr><td>9</td><td>■</td><td>Sample 3</td></tr> <tr><td>10</td><td>■</td><td>Sample 4</td></tr> <tr><td>11</td><td>■</td><td>Sample 4</td></tr> <tr><td>12</td><td>■</td><td>Sample 4</td></tr> <tr><td>13</td><td>■</td><td>Sample 5</td></tr> <tr><td>14</td><td>■</td><td>Sample 5</td></tr> <tr><td>15</td><td>■</td><td>Sample 5</td></tr> <tr><td>16</td><td>■</td><td></td></tr> </tbody> </table>	#	Colour	Name	1	■	Sample 1	2	■	Sample 1	3	■	Sample 1	4	■	Sample 2	5	■	Sample 2	6	■	Sample 2	7	■	Sample 3	8	■	Sample 3	9	■	Sample 3	10	■	Sample 4	11	■	Sample 4	12	■	Sample 4	13	■	Sample 5	14	■	Sample 5	15	■	Sample 5	16	■	
#	Colour	Name																																																		
1	■	Sample 1																																																		
2	■	Sample 1																																																		
3	■	Sample 1																																																		
4	■	Sample 2																																																		
5	■	Sample 2																																																		
6	■	Sample 2																																																		
7	■	Sample 3																																																		
8	■	Sample 3																																																		
9	■	Sample 3																																																		
10	■	Sample 4																																																		
11	■	Sample 4																																																		
12	■	Sample 4																																																		
13	■	Sample 5																																																		
14	■	Sample 5																																																		
15	■	Sample 5																																																		
16	■																																																			

Fig. 43: Optionen für die Benennung von Proben

9.1.5 Auswahl Probenotyp

Wählen Sie den **Type (Typ)** der Probe aus.

Es stehen sieben Optionen zur Auswahl. Der gewählte Typ bestimmt die Art und Weise, in der die Probe während der Analyse von der Software verarbeitet wird.

Um mehrere Zellen gleichzeitig zu ändern, markieren Sie die Zellen, drücken die F2-Taste auf Ihrer Tastatur und wählen dann aus den folgenden Optionen aus:

Unknown (Unbekannt):	Standardeinstellung für alle Proben, die untersucht werden.
Standard:	Eine Probe mit einer bekannten Konzentration, die zur Erzeugung einer Standardkurve verwendet wird, aus der eine unbekannte Probenmenge berechnet oder die zur Bestimmung der Amplifikationseffizienz verwendet werden kann.
Positive Control (Positivkontrolle):	Die Probe enthält bekanntlich das gewünschte Ziel-Gen. Eine positive Kontrolle wird verwendet, um zu bestätigen, dass der Test funktioniert, und hilft, falsch-negative Ergebnisse zu vermeiden.
Negative Control (Negativkontrolle):	Die Probe enthält bekanntlich nicht das gewünschte Ziel-Gen. Eine Negativkontrolle wird verwendet, um die Kontamination des Tests zu überwachen, und hilft, falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden.
Extraction Control (Extraktionskontrolle):	Eine Extraktionskontrolle wird verwendet, um sicherzustellen, dass die DNA-Extraktion kontaminationsfrei durchgeführt worden ist.
NTC (No Template Control):	Eine Probe, die keine Ziel-Gene enthält. NTCs werden verwendet, um Amplikon-Kontamination nachzuweisen. Die NTC kann die Negativkontrolle eines internen Amplifikationskontroll-Template enthalten, um sicherzustellen, dass die PCR funktioniert.
Reference Material (Referenzmaterial):	Bei diesem Probenotyp handelt es sich um eine Probe mit einer definierten Menge (z.B. SureFood® QUANTARD Allergen 40). Es wird in der absoluten Quantifizierung verwendet, um gemessene DNA-Mengen unbekannter Proben (in ppm) mit den Informationen aus der entsprechenden Standardkurve zu korrelieren.

9.1.6 Probenkonzentrationen

Wählen Sie die zu vermessenden Einheiten aus.

Sie können aus einer Liste von Einheiten wählen. Geben Sie alternativ Ihre eigenen Einheiten in das vorgesehene Textfeld ein.

Geben Sie eine **Concentration (Konzentration)** für jeden Standard ein.

Bei der Verwendung von Standards muss für jeden Messpunkt ein Wert angegeben werden. Der Wert kann eine quantifizierbare absolute oder beliebige Zahl sein. Zahlen können auch in wissenschaftlicher Schreibweise eingegeben werden ($1E03 = 1 \times 10^3 = 1000$).

Geben Sie die Werte nacheinander ein oder verwenden Sie die Option **Auto fill (Automatisch Ausfüllen)**, um schnell eine serielle Verdünnung und Replikate hinzuzufügen, indem Sie Folgendes tun:

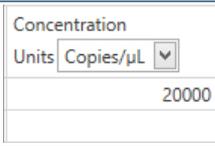
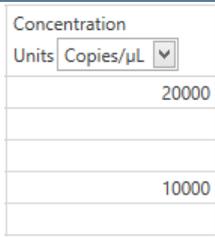
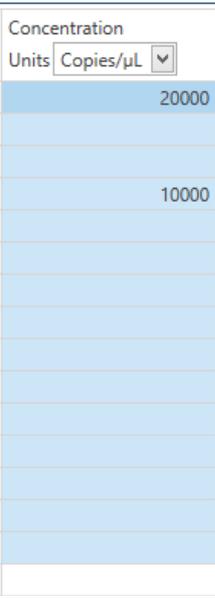
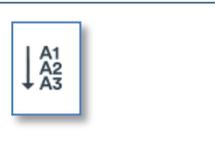
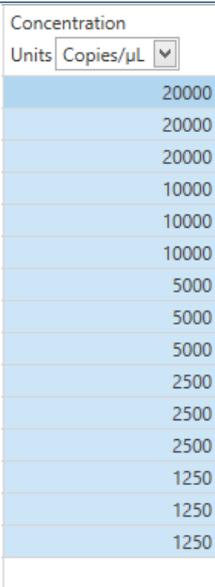
<p>Geben Sie den ersten Konzentrationswert (20.000) ein.</p>	
<p>Lassen Sie die gleiche Anzahl von Zeilen wie die Anzahl der erforderlichen Replikate unter der ersten Konzentration leer. Geben Sie die zweite Konzentration der Verdünnungsreihe (10.000) ein.</p>	
<p>Markieren Sie nun alle Zellen, die zur Vervollständigung der Verdünnungsreihe und Replikate erforderlich sind.</p>	
<p>Klicken Sie auf das Symbol Auto fill (Automatisch Ausfüllen).</p>	
<p>Die Konzentrationen werden ausgehend von den ersten beiden Eingaben ausgefüllt und die Replikate für jede Konzentration werden automatisch ausgefüllt.</p>	

Abb. 44: Optionen bei der Eingabe von Konzentrationen von Verdünnungen und Replikaten

9.1.7 Multiplex-Standards

Sie können Standardkonzentrationen für jeden Kanal einzeln eingeben.

Wählen Sie das Symbol **Toggle between single and multiplex standards (Zwischen Single- und Multiplex-Standards wechseln)**, um diese Option zu verwenden. Sie müssen sicherstellen, dass der Test als Multiplex eingerichtet wurde.

Ein Wechsel zwischen Single und Multiplex ist möglich. Es kann jedoch nur ein Typ während der Analyse angezeigt und angewendet werden.



Abb. 45: Symbol für das Wechseln zwischen Single- und Multiplex-Standards

Green Channel Standard...	Yellow Channel Standard...	Orange Channel Standar...	Red Channel Standards...
% ▾	% ▾	% ▾	% ▾
9	35	1	55
1	55	9	35
25	25	25	25
55	9	35	1

Abb. 46: Übersicht der Standardkonzentrationen bei der Verwendung von Multiplex-Standards in den einzelnen Kanälen

9.1.8 Verknüpfen eines Tests mit einer Probe

Ein Test muss mit einer Probe verknüpft sein, damit die Software die Probe erkennen und richtig analysieren kann. Wenn ein Test keiner Probe zugeordnet ist, wird die Probe nicht analysiert.

Verknüpfen Sie einen Assay (Test) mit einer Probe.

Wählen Sie die gewünschten Proben aus, indem Sie die Zellen in der Spalte **Assays (Tests)** markieren. Verwenden Sie Strg + Klick, um nicht-benachbarte Proben zu markieren.

Wählen Sie im Fenster **Available Assays (Verfügbare Tests)** den gewünschten Test aus und ziehen ihn per Drag & Drop in die markierten Zellen. Klicken Sie alternativ auf die ausgewählten Zellen in der Spalte **Assays (Tests)** und wählen Sie in der Dropdown-Liste den/die gewünschten Test(s) aus, indem Sie das Kontrollkästchen neben dem Testnamen oder **Select All (Alle auswählen)** aktivieren. Klicken Sie dann auf die Schaltfläche **OK**.

Um einen Test aus der Spalte **Assays (Tests)** zu entfernen, verwenden Sie die Entf-Taste Ihrer Tastatur oder klicken Sie auf die Zelle, um in der Dropdown-Liste **None (keinen)** auszuwählen.

Deaktivieren Sie einfach den Test aus der Liste, um ihn zu entfernen, oder wählen Sie **Select All (Alle Auswählen)**, um alle Tests zu entfernen.



Abb. 47: Fenster zur Auswahl von **Available Assays (Verfügbare Tests)**

9.1.9 Optionale Spalten

Zusätzliche Spalten können dem **Samples Editor (Probeneditor)** mit dem Symbol **Select visible sample data columns (Sichtbare Probandenspalten auswählen)** hinzugefügt werden. Die folgenden Spalten können der Tabelle hinzugefügt oder aus der Tabelle entfernt werden:

Standard Concentration (Standardkonzentration): Die Konzentrationen werden für die Standardkurvenanalyse verwendet.

RIN: Geben Sie eine RNA Integritätsnummer für jede eingegebene RNA ein.

Comment (Anmerkung): Geben Sie zusätzliche Informationen zu den Proben an.

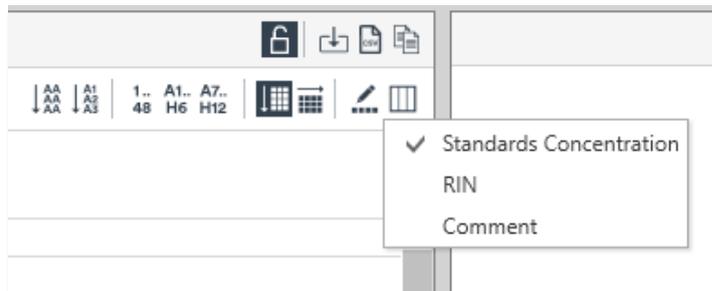


Abb. 48: **Sichtbare Probandenspalten auswählen**

9.1.10 Proben importieren

Das Importieren von Probanden aus einer Reihe von unterschiedlichen Dateitypen ist möglich und vereinfacht die Annotation von Proben.

	A	B	C	D
1	Well	Sample ID	Concentration	
2		1 Sample 1	82	
3		2 Sample 2	158	
4		3 Sample 3	569	
5		4 Sample 4	924	
6		5 Sample 5	717	
7		6 Sample 6	731	
8		7 Sample 7	199	
9		8 Sample 8	110	
10		9 Sample 9	184	
11		10 Sample 10	812	
12		11 Sample 11	113	
13		12 Sample 12	246	
14		13 Sample 13	711	

Abb. 49: Beispiel für Probandaten

Wählen Sie das Symbol **Import Samples (Proben importieren)**, um Probandaten aus einer anderen Quelle zu importieren.



Sie können aus allen durch Komma, Tabulator oder Leerzeichen getrennten Dateien importieren.

Suchen und wählen Sie die zu importierende Datei.

Abb. 50: Symbol für den Import von Probandaten

Wählen Sie die zu importierenden Felder aus und in welche Spalte des Probeneditors diese eingefügt werden sollen.

Nachdem die Laufdatei ausgewählt wurde, zeigt eine Tabelle alle Felder in der Datei an. Sie haben die Möglichkeit, den Typ der Trennung (z.B. Komma) und wie viele Zeilen ignoriert werden sollen, auszuwählen, bevor die Daten erfasst werden.

Wählen Sie als Nächstes die zu importierenden Felder aus, indem Sie die Spalte aus den Dateien mithilfe des Dropdown-Menüs mit einer der Spalten im Probeneditor verknüpfen.

Sie haben die Option, den Import-Stil als Vorlage zu speichern.

Auf diese Weise können Sie den Import schneller abschließen, ohne bei wiederholten Läufen die zuvor durchgeführte Verknüpfung erneut durchführen zu müssen.

9.1.11 Warnungen im Probeneditor

Verschiedene Warnungen werden angezeigt, wenn Anmerkungen nicht korrekt durchgeführt wurden. Hier einige Beispiele:

- Wenn Standards als **Type (Typ)** ausgewählt wurden, aber keine Werte in das Feld **Standards Concentration (Standardkonzentration)** eingegeben wurden.
- Tests wurden nicht mit einer bearbeiteten Probenzeile verknüpft.

▲ The standard in well 1 does not have a concentration defined.
Some named samples do not have an assay assigned to them.

Abb. 51: Beispiel eines möglichen Warnhinweises

9.1.12 Probeneditor sperren



Alle Felder können gesperrt werden, um versehentliche Änderungen zu verhindern. Nach dem Sperren ist keines der Felder annotierbar, bis es wieder entsperrt wird.

Abb. 52: Symbol für Probeneditor sperren

9.1.13 Informationen

Geben Sie den Namen für den **Operator (Bediener)** ein (optional).

Geben Sie **Notes (Anmerkungen)** zum Lauf ein (optional).

Geben Sie genügend Details an, damit der Lauf zu einem späteren Zeitpunkt verständlich ist. Details können den Untersuchungszweck des Laufs oder Anmerkungen zu den Proben (z.B. Probenmatrix) umfassen.

Die Integrität der Daten wird im Rahmen der 21CFR11-Empfehlungen (siehe Anhang B) ebenfalls angegeben.



Abb. 53: Fenster für die Eingabe von Informationen zum Lauf

10 Erstellung von Vorlagen zur Wiederverwendung

Mit Vorlagen können Läufe zur mehrmaligen Verwendung eingerichtet werden. Beispielsweise können feste Probenamen zugewiesen werden.

10.1 Eine Vorlage erstellen

Starten Sie einen **New (Neuen) Lauf**.

Führen Sie Ihren Lauf mit denselben, vorherig erläuterten Methoden aus.

Wählen Sie den **Abwärtspfeil neben der Schaltfläche Save as (Speichern unter)** und anschließend **Template (Vorlage)**.

Speichern Sie die Vorlage in der Vorlagenbibliothek in
C:\ProgramData\RBiopharm\RIDA®CYCLER\DefaultTemplates.

Sie haben auch die Möglichkeit, Unterordner innerhalb der Bibliothek zu erstellen.

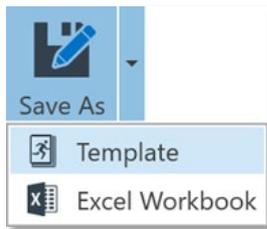


Abb. 54: Schaltfläche **Save as (Speichern unter)**

10.2 Eine Vorlage öffnen

Installieren Sie eine Vorlage (Schaltfläche Help (Hilfe) in der Symbolleiste).

Wählen Sie in der Schaltfläche **New (Neu) auf der Symbolleiste die Vorlage aus.**

Der Lauf wird mit allen gespeicherten Parametern, einschließlich der Probenannotationen, geöffnet. Starten Sie den Lauf wie vorherig erläutert (Abschnitt 9).

11 Während des Laufs

Sobald die Erfassung beginnt, werden die Rohdaten für die im Abschnitt **Data (Daten)** ausgewählten Kanäle angezeigt. Die Daten werden nach jedem Messzyklus aktualisiert und das Signal wird skaliert, um die bestmögliche Auflösung zu gewährleisten. Gruppen oder einzelne Proben können während eines Laufs markiert, ausgewählt oder abgewählt werden. Sobald genügend Daten für eine aussagekräftige Analyse verfügbar sind, kann eine Analyse auch schon vor Abschluss eines Laufs durchgeführt werden. Wenn der Lauf abgeschlossen ist, stehen die Rohdaten weiterhin zur Ansicht zur Verfügung.

Sobald der Lauf beginnt, wird ein Banner mit einer **Run Summary (Laufübersicht)** angezeigt.



Abb. 55: Banner **Run Summary (Laufübersicht)**

Im Banner **Run Summary (Laufübersicht)** werden die Haltetemperatur oder die Zyklusnummer auf der linken Seite, neben dem Namen des Geräts angezeigt.

Ein Diagramm der **Profile Summary (Profilübersicht)** wird ebenfalls angezeigt. Ein Zeitstrahl (in Grau) über dem thermalen Profil informiert über den Verlauf des Experiments.

Die **Time Remaining (Verbleibende Zeit)**, bis zum Abschluss des Laufs, wird auf der rechten Seite des Banners **Run Summary (Laufübersicht)** angezeigt.

11.1 Profil während eines Laufs ändern (optional)

Das Banner **Run Summary (Laufübersicht)** bietet auch zwei Funktionen zur Steuerung des Laufs: **Skip (Überspringen)** und **Abort (Abbrechen)**.

Einen Abschnitt des Profils überspringen

Verwenden Sie die Funktion **Skip (Überspringen)**, wenn Sie zum nächsten Abschnitt des Profils übergehen möchten.

Sie können die letzte Anzahl von Zyklen eines Laufprofils überspringen, wenn Sie der Meinung sind, dass eine ausreichende Anzahl an Zyklen zur Erzeugung des Amplikons vorhanden ist.

Einen Lauf abbrechen

Sie können den Lauf jederzeit abbrechen, indem Sie im Fenster **Run Summary (Laufübersicht)** die Funktion **Abort (Abbrechen)** wählen.



Warnung, heiße Oberfläche!

Bei einem benutzerseitig abgebrochenen Lauf, den Deckel nicht öffnen, bis das Gerät abgekühlt ist. Der Rotor in der Kammer kann über 40 °C heiß sein. Rotor mindestens 5 Minuten lang nicht berühren, um Verletzungen zu vermeiden.

11.2 Daten

Die Rohdaten werden für jeden zu erfassenden Kanal angezeigt und in der **Navigator Bar (Navigationsleiste)** aufgelistet.

Die Zyklusdaten werden als Zykluszahl (x-Achse) gegen den Fluoreszenzwert (y-Achse) mit einem maximalen Fluoreszenzwert von 100 Einheiten aufgetragen. Zu Beginn des Laufs ist die Fluoreszenz auf 0 - 10 oder 70 - 90 Einheiten skaliert, je nach der gewählten Option **Adjust Gain Settings (Verstärkung einstellen)**. Wenn die Echtzeitkurve über 10 Einheiten hinausgeht oder unter 70 Einheiten fällt, wird das Diagramm automatisch skaliert, um sicherzustellen, dass die maximale Kurve 90 % des veranschaulichten Diagramms einnimmt.

11.3 Meldungen

Alle Warnungen über den Lauf werden zusammen mit der Uhrzeit, zu der sie aufgetreten sind, unter **Messages (Meldungen)** angezeigt.

Übliche Meldungen enthalten die Startzeit, den Gerätenamen und die Firmware-Version.

Einige Meldungen können Warnungen sein, wie z.B. die Inkompatibilität eines ausgewählten Tests oder ein Verlust der Kommunikation zwischen RIDA®CYCLER und Computer sowie deren Wiederherstellung.

Die Autogain-Werte, die während des Laufs ermittelt wurden, werden ebenfalls in den Meldungen angezeigt.

Während der Analyse werden alle Änderungen an Parametern in der Meldungsliste protokolliert, nachdem die Laufdatei gespeichert wurde. Durch dieses Verfahren ist die Software 21CFR11-konform, indem Nachverfolgbarkeit gewährleistet wird (siehe Anhang B).

Messages				
Time	Priority	Category	User	Message
2/1/2018 3:47:28 PM	Information	Run	Admin	Run started via Serial on "RIDA Cycler-365" S/N M0000365 F/W v2.24 S/W v0.1.0
2/1/2018 3:55:04 PM	Information	Run	Admin	Autogain completed for Green using Sample: 34, Detector gain: 6x, LED power: 303, Scale: 1.02
2/1/2018 3:55:06 PM	Information	Run	Admin	Autogain completed for Yellow using Sample: 34, Detector gain: 1x, LED power: 750, Scale: 1.35
2/1/2018 3:55:07 PM	Information	Run	Admin	Autogain completed for Red using Sample: 19, Detector gain: 1x, LED power: 400, Scale: 1.50

Abb. 56: Laufbezogene Übersicht aufgetretener Warnhinweise

12 Analyse

In der Software stehen folgende Analysetypen zur Verfügung: **Cycling**, **Melt (Schmelzkurvenanalyse)**, **Absolute Quantification (Absolute Quantifizierung)**, **Allelic Discrimination (Allelische Diskriminierung)** und **Identifizier**. Analysenspezifische Parameter können bearbeitet werden. Berichtstabellen werden zusammen mit verschiedenen Diagrammen, je nach Analysetyp, angezeigt.

Um eine neue Analyse zu starten, wählen Sie in der Navigationsleiste die Schaltfläche **Add (Hinzufügen) neben dem Analysetyp aus.**

Wählen Sie eine der folgenden Optionen aus:

1. Cycling (Cycling-Analyse)
2. Melt (Schmelzkurvenanalyse)
3. Absolute Quantification (Absolute Quantifizierung), beinhaltet die Erstellung einer Standardkurve
4. Allelic Discrimination (Allelische Diskriminierung)
5. Identifizier

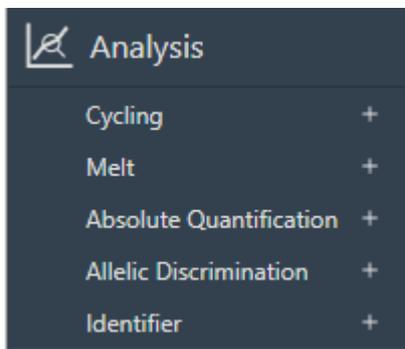


Abb. 57: Analyseleiste

Wählen Sie dann den zu analysierenden Parameter aus der Liste aus.

Die aufgeführten Parameter basieren auf den Assays (Tests), die vor dem Start des Laufs ausgewählt wurden. Für Multiplex-Tests wird jeder Parameter als Teil des Assays (Tests) angezeigt.

Der ausgewählte Parameter wird in der Navigationsleiste unterhalb des Analysetyps angezeigt. Sie können den Namen bearbeiten, indem Sie darauf doppelklicken.

Für jeden Lauf sind mehrere Analysen möglich, wobei die angezeigte Analyse in der Navigationsleiste blau markiert ist.

Löschen Sie eine Analyse, indem Sie die Schaltfläche **Delete (Löschen)** neben dem Parameter auswählen.

12.1 Cycling-Analyse

Mit der **Cycling Analysis (Cycling-Analyse)** können Sie den Quantifizierungszyklus (Cq) und die Reaktionseffizienz jeder Probe in Ihrem Datensatz bestimmen.

Die Cycling-Analyse wird immer mit jedem anderen Analysetyp bereitgestellt, der Cycling-Daten verwendet ((**Standard Curve (Standardkurve)** und **Absolute Quantification (Absolute Quantifizierung)**)), sodass Sie Parameter anpassen können, die mit der Generierung von Cq - und Effizienzwerten verknüpft sind.

Wenn Sie **Cycling Analysis (Cycling-Analyse)** auswählen, trägt die Software standardmäßig Baseline-korrigierte Kurven als Fluoreszenz (y-Achse) gegen die Zykluszahl (x-Achse), im linearen Maßstab für den ausgewählten Parameter auf.

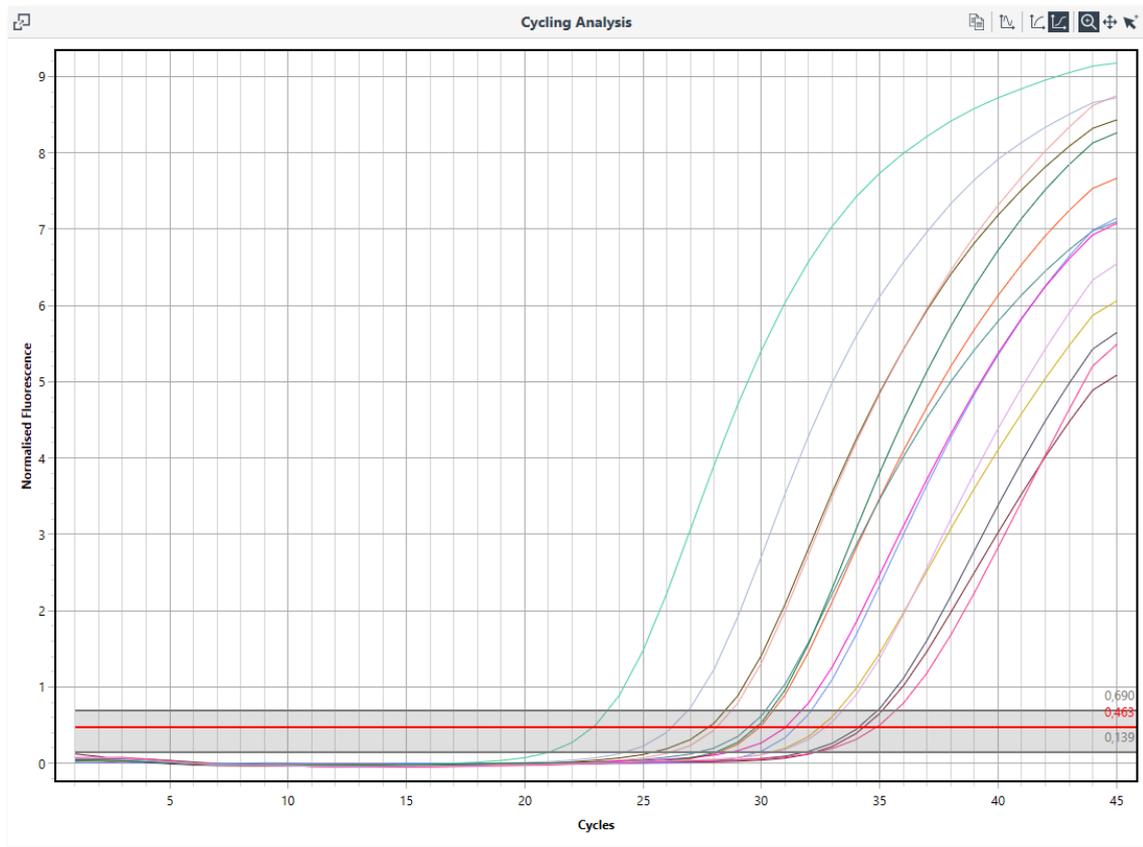


Abb. 58: Fenster **Cycling Analysis** (Cycling-Analyse)

12.1.1 Diagrammtypen



Abb. 59: Schaltflächen zum Wechseln zwischen verschiedenen Diagrammtypen

Derivatives (Ableitungen): Die Kurven der ersten und zweiten Ableitung für die ausgewählten Daten können parallel zu den Baseline-korrigierten Amplifikationskurven angezeigt werden.

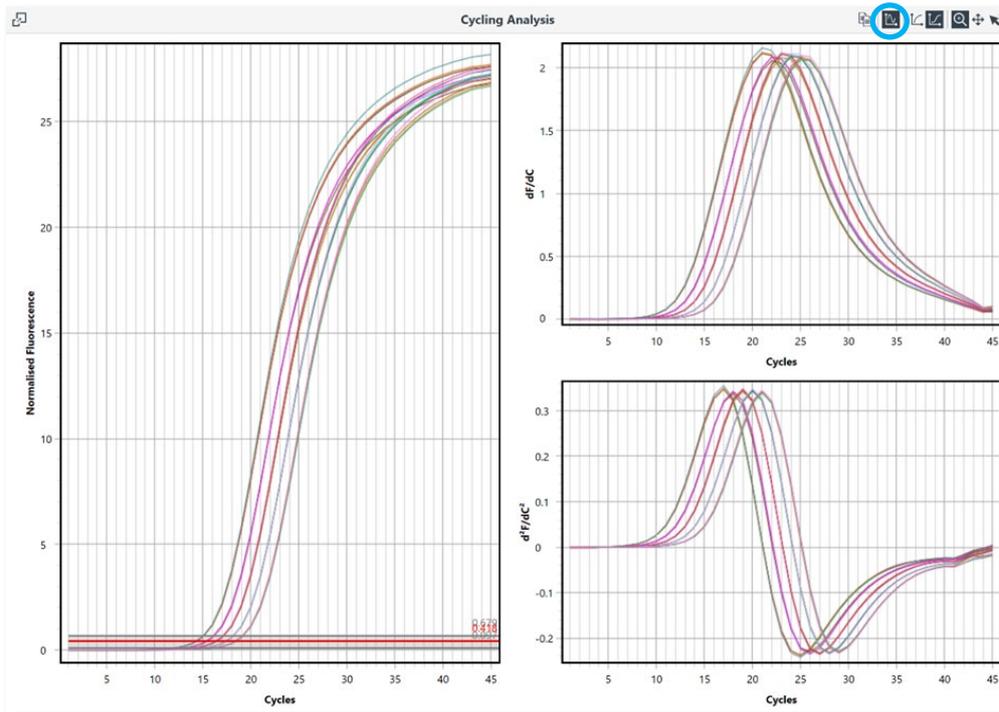


Abb. 60: Optionen der Cycling-Analyse

Linear y-Axis (Lineare y-Achse): Lassen Sie sich die Baseline-korrigierten Cycling-Daten mit der y-Achse in linearer Skalierung anzeigen, indem Sie das Symbol für die lineare y-Achse auswählen.

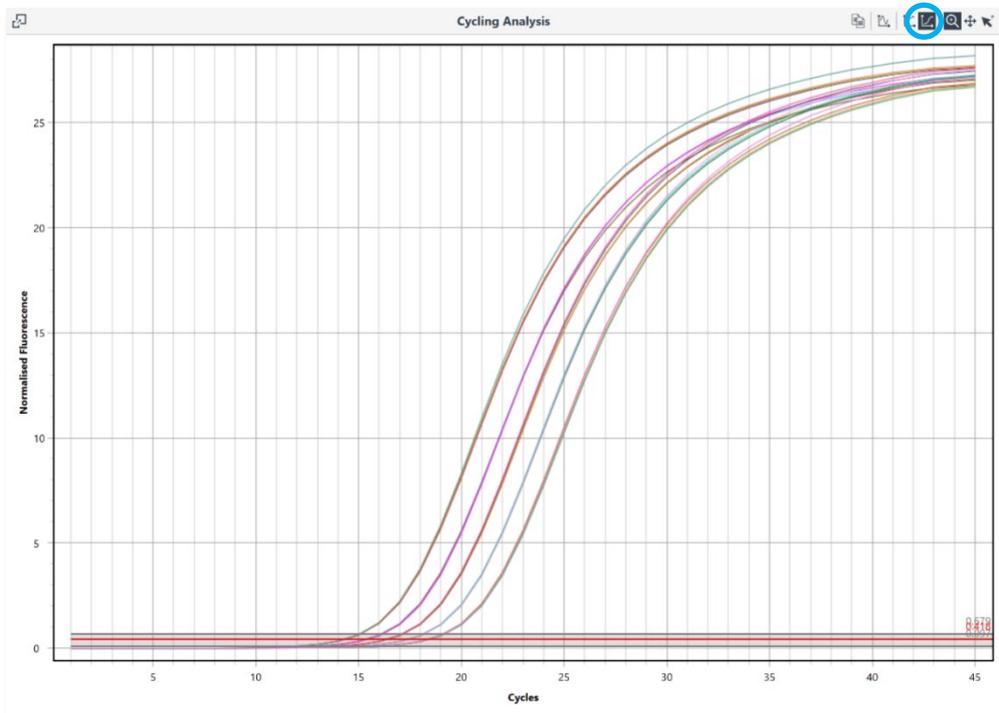


Abb. 61: Lineare y-Achse

Log y-Axis (Logarithmische y-Achse): Die Anzeige der Daten in der logarithmischen Ansicht ermöglicht eine bessere Visualisierung des exponentiellen Bereichs der Amplifikationskurve und ist daher die Standardoption. Sie können zur logarithmischen Skala zurückkehren, indem Sie das Symbol für Log y-Achse auswählen.

12.1.2 Parameter der Cycling-Analyse

Ein Standard-Parametersatz wird auf die Testdaten angewendet und liefert eine automatische Berechnung der C_q - und Effizienzwerte, die in der Ergebnistabelle aufgeführt sind. **Sie können folgende Parameter ändern: 'Ignore cycles before', 'Threshold start' und 'Auto set threshold'.**

Method

- **Dynamic (Dynamisch):** Bestimmt den gemittelten Grundlinienwert, der vor der Erfassung der spezifischen Amplifikation gemessen wurde (Take-off), subtrahiert den Durchschnittswert von den gemessenen Werten und berücksichtigt dann jede Steigung in der Grundlinienkurve, um die Grundlinie der Probe zu korrigieren. Der Take-off wird berechnet, indem das Maximum der zweiten Ableitung als Ausgangspunkt verwendet wird.

Der dynamische Algorithmus versucht, ein W-o-L (im Diagramm grau schattiert) einzustellen, indem er die obere Grenze des Fensters bei dem mittleren Fluoreszenzniveau beginnt, das beim Maximum der zweiten Ableitung gefunden wird. Anschließend wird eine iterative Modifikation des W-o-L durchgeführt, bis das Optimum gefunden ist, das die geringste Abweichung zwischen den individuellen Wirkungsgraden und der mittleren Effizienz der Proben im Datensatz aufweist (Ramakers et al. 2003; Ruijter et al. 2009). Vom W-o-L aus wird der Threshold (rote Linie) auf 75 % des Fensterbereichs eingestellt. Proben ohne nachweisbare Verstärkung oder Proben unterhalb einer benutzerdefinierten Fluoreszenzgrenze werden nicht in die W-o-L-Berechnung einbezogen.

Ignore cycles before (Zyklen vor ... ignorieren): Verwenden Sie diese Einstellung, wenn zu Beginn des Laufs eine signifikante Abweichung in der Grundlinie vorliegt. Diese Veränderungen können aufgrund vieler Faktoren auftreten, wie z.B. zu hohe DNA-Konzentrationen oder unzureichende Denaturierung von doppelsträngiger DNA. Durch Anwendung dieser Einstellung kann die Analyse mit der **Dynamic (Dynamischen)** Grundlinienkorrektur verbessert werden.

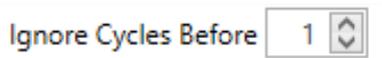


Abb. 62: Symbol Ignore Cycles Before (Zyklen vor ... ignorieren)

Cycle threshold (Zyklenschwellenwert): Der **cycle threshold (Zyklenschwellenwert)** wird verwendet, um den C_q -Wert jeder ausgewählten Probe zu bestimmen, und wird automatisch von der Software eingestellt.

Auto set threshold (Schwellenwert automatisch einstellen): Verwendet das W-o-L, um den Threshold einzustellen.

Bei einigen Datensätzen wird der W-o-L möglicherweise nicht bestimmt und der Schwellenwert wird auf einen Standardwert von 0,1 festgelegt.

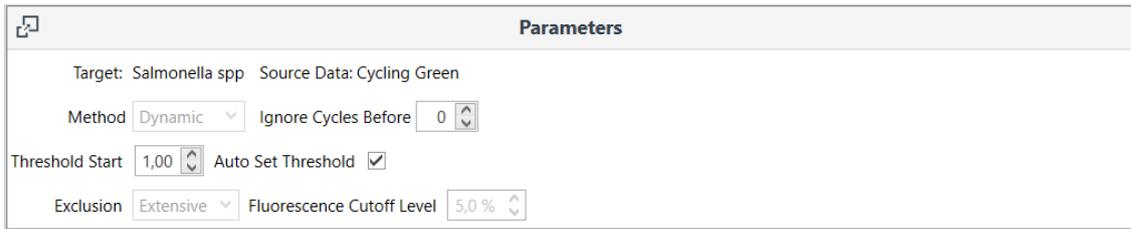
Sowohl das W-o-L als auch der Schwellenwert ändern sich, wenn Proben abgewählt oder wieder in die Analyse aufgenommen werden, da das W-o-L aus dem Testdatensatz bestimmt wird. Wenn Sie bestimmte Proben ansehen möchten, ohne die Analyse zu beeinflussen, verwenden Sie die Funktion **View (Anzeigen)** im **Samples Selector (Probenauswahl)**, um Kurven nur aus dem Diagramm und nicht aus der Analyse zu entfernen.

Auto set threshold

Abb. 63: Symbol Auto set threshold (Schwellenwert automatisch einstellen)

Manuelle Anpassung des Schwellenwerts

Um den Threshold manuell einzustellen, ist die Funktion **Auto set threshold** zu deaktivieren. Anschließend kann der gewünschte Schwellenwert manuell eingegeben oder per Pfeiltasten eingestellt werden.



Parameters

Target: Salmonella spp Source Data: Cycling Green

Method: Dynamic Ignore Cycles Before: 0

Threshold Start: 1,00 Auto Set Threshold:

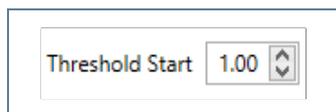
Exclusion: Extensive Fluorescence Cutoff Level: 5,0%

Abb. 64: Eingabefeld zur Anpassung des Thresholds

 Allgemeiner Sicherheitshinweis!

Bei einigen Datensätzen mit schwacher Amplifikation kann ein W-o-L möglicherweise nicht bestimmt werden, was dazu führt, dass der Schwellenwert nicht automatisch eingestellt werden kann. Unter diesen Umständen wird eine Warnung neben dem Feld Auto set threshold (Schwellenwert automatisch einstellen) angezeigt.

Threshold start (Schwellenwert Start): Sie können störende Bereiche zu Beginn der Baseline-korrigierten Echtzeitkurve vermeiden, indem Sie die Startposition des Schwellenwerts verschieben. Geben Sie hierzu einen Wert in das Textfeld „Threshold Start“ (Schwellenwert Start) ein.



Threshold Start 1.00

Abb. 65: Eingabefeld Treshold Start (Schwellenwert Start)

 Allgemeiner Sicherheitshinweis!

Es wird nicht empfohlen, zwei verschiedene Experimente mit dem gleichen Zyklusschwellenwert oder W-o-L zu analysieren. Verschiedene Tests haben unterschiedliche Effizienzen, welche die Leistungsfähigkeit der Analysealgorithmen beeinflussen können.

Fluorescence Cutoff (Fluoreszenz-Cutoff): Dieser Parameter schließt Proben aus, die unter den definierten Prozentsatz der maximalen Fluoreszenzänderung fallen. Geringe Veränderungen der Fluoreszenz können die Bestimmung der Cq -Werte durch Verändern des W-o-L stören. Einige dieser kleinen Veränderungen können auf Selbsthydrolyse der Sonden und gegenseitige Beeinflussung von Farbstoffen zurückgeführt werden. Der Standardwert ist auf 5 % festgelegt.

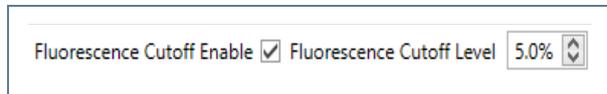


Abb. 66: Eingabefeld Fluorescence Cutoff (Fluoreszenz-Cutoff)

Auto Exclusion (Automatischer Ausschluss): Wenn die Probe ausgeschlossen wird, wird ihr Cq -Wert nicht bestimmt und sie wird nicht für die Berechnung des Linearitätsfensters verwendet. Abhängig von den Ausschlusskriterien kann eine Probe aus einem oder mehreren der folgenden Gründe ausgeschlossen werden:

- **Keine Amplifikation:** Die gefilterte Fluoreszenzkurve der Probe zeigt keine ausreichende Amplifikation. Die Fluoreszenzänderung der Probe muss um das Siebenfache steigen. Nähere Erläuterungen hierzu, siehe: „*Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data*“ Nucleic Acids Research, 2009, Vol. 37, No. 6 e45, in der Bildunterschrift von Abbildung 3. Um für die Berechnung berücksichtigt zu werden, muss die Probenfluoreszenz folgende Bedingung erfüllen:

$$f_{first} - f_{min} \geq 7 \times (f_{max} - f_{min})$$

wobei

f_{min} der kleinste gefilterte Fluoreszenzwert ist;

f_{first} der erste gefilterte Fluoreszenzwert ist, der sich von f_{min} unterscheidet;

f_{max} der maximale gefilterte Fluoreszenzwert ist.

- **Fluoreszenz-Cutoff:** Der maximale Wert der gefilterten Fluoreszenzkurve einer Probe überschreitet nicht den Fluoreszenz Cutoff-Wert.
- **Normalisierungsfehler:** Es kann kein anfänglicher linearer Bereich gefunden werden.

Der Ausschluss ist festgelegt auf:

Extensive (Extensiv): Proben werden ausgeschlossen, wenn sie keine Amplifikation zeigen, wenn die Normalisierung fehlschlägt oder sie den Fluoreszenz-Cutoff verfehlen.

Wenn eine Probe ausgeschlossen wird, wird ihr Result (Ergebnis) in der Tabelle Cycling Analysis Results (Ergebnisse Cycling-Analyse) auf **Excluded (Ausgeschlossen)** gesetzt.

Window of Linearity (Linearitätsfenster): Jede ausgeschlossene Probe wird nicht in die Berechnung des Linearitätsfensters einbezogen. Außerdem können Proben aus der Berechnung des Linearitätsfensters ausgeschlossen werden, wenn:

- Die Maxima der zweiten Ableitung am äußersten Ende des Datenbereichs auftreten;
- Der Logarithmus der normalisierten Fluoreszenzkurve in der Nähe der Maxima der zweiten Ableitung nicht definiert ist.

Wenn eine nicht ausgeschlossene Probe aus der Berechnung des Linearitätsfensters ausgeschlossen wurde, besitzt sie keine Berechnung des Effizienz- oder R^2 -Wertes und ihr Eintrag in der Spalte **Result (Ergebnis)** in der Tabelle **Cycling Analysis Results (Ergebnisse Cycling-Analyse)** wird auf **Excluded from WOL** (Von W-o-L ausgeschlossen) gesetzt.

12.1.3 Tabelle „Ergebnisse Cycling-Analyse“

Die Ergebnistabelle ist so organisiert, dass sie den Mittelwert (\bar{x}) und die Standardabweichung ($x\sigma_{n-1}$) der Cq -Werte für Probenreplikate anzeigt. Die einzelnen Probenergebnisse werden direkt unter der Replikat-Zeile in den folgenden Spalten angezeigt:

Results				
Well	Cq	Efficiency	R ²	Result
Standard 1				$\bar{x} = 14.29 \sigma = 0.02$
1	14.31	0.91	1.00000	
2	14.29	0.92	1.00000	
3	14.31	0.91	0.99999	
4	14.27	0.92	1.00000	
Standard 2				$\bar{x} = 15.37 \sigma = 0.03$
5	15.33	0.92	0.99999	
7	15.37	0.93	0.99998	
8	15.40	0.91	0.99998	
Standard 3				$\bar{x} = 16.37 \sigma = 0.03$
Standard 4				$\bar{x} = 17.40 \sigma = 0.02$
Standard 5				$\bar{x} = 18.38 \sigma = 0.03$
Unknown Sample 2				$\bar{x} = 16.34 \sigma = 0.00$

Abb. 67: Tabelle „Ergebnisse Cycling-Analyse“

Well (Kavität): Die Reihenfolge der Kavitätennummern hängt von der Gruppierung der Proben ab, da der Name der Probenreihenfolge alphanumerisch (gruppiert) oder numerisch (ungruppiert) sein kann.

Cq (crossing point): Dies ist der Wert des Quantifizierungszyklus für jede Probe, der vom eingestellten Zyklusschwellenwert (Theshold) abhängt.

Efficiency (Effizienz): Die Effizienz der Amplifikation wird für jede Probe mit dem von Ramakers *et al.* (2003) beschriebenen LinRegPCR-Algorithmus berechnet. Anhand der Steigung der linearen Regressionslinie des berechneten W-o-L wird die Effizienz als $E = 10^{\text{Steigung}} - 1$ berechnet. Alternativ kann ein einzelner Effizienzwert für einen ausgewählten Test mit dem Verfahren der Standardkurvenanalyse bestimmt werden.

R²: Dieser Wert ist ein Qualitätsmaß der linearen Regression, der zur Berechnung der Amplifikationseffizienz verwendet wird (Werte > 0,98 sind akzeptabel).

Result (Ergebnis): Vorkommnisse im Zusammenhang mit der Qualität der Probe werden in dieser Spalte angezeigt, beispielsweise wenn ein Cq -Wert nicht bestimmt werden kann.

12.1.4 Probenabwählenselektor für Cycling-Analyse

Die Ergebnistabelle kann komprimiert werden, indem die einzelnen Probenergebnisse mithilfe des Dreiecks am Anfang jeder Replikatzeile ausgeblendet werden oder die Option **Full Collapse (Vollständig reduzieren)** im Probenabwählenselektor für die gesamte Tabelle ausgewählt wird. Klicken Sie mit der linken Maustaste auf den Probenabwählenselektor, um sich die verschiedenen Sortieroptionen für die Tabelle anzeigen zu lassen.

Um die Proben in Replikaten in alphanumerischer Reihenfolge zu sortieren, verwenden Sie die Option **Group by this column (Nach dieser Spalte gruppieren)**. Andernfalls wählen Sie die Option **Ungroup (Gruppierung aufheben)**, damit die Proben in der Reihenfolge der Kavitätensnummer angezeigt werden. Die einzelnen Proben können für jede Spalte für gruppierte und nicht gruppierte Tabellen in **Ascending or Descending (Aufsteigender oder Absteigender)** Reihenfolge sortiert werden. Verwenden Sie diese Option, um den Bereich der Cq - oder Effizienzwerte zu bestimmen, indem Sie sich die höchsten bis niedrigsten Werte anzeigen lassen.

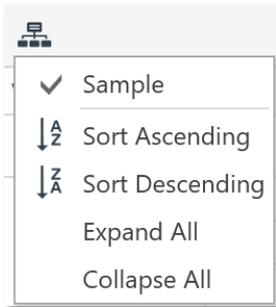


Abb. 68: Probentabellenselektor für Cycling-Analyse

12.1.5 Unverankerte Fenster (Floating windows)

Unter bestimmten Umständen kann es erforderlich sein, entweder das Diagramm der Cycling Analyse oder die Parameter der Cycling Analyse parallel zu einem anderen Analysetyp anzuzeigen. Beispielsweise möchten Sie vielleicht anhand einer Standardkurve beobachten, wie sich eine Änderung des Zyklusschwellenwerts auf die Reaktionseffizienz auswirkt. Mit der Option „Floating Windows“ können Sie diese Ansicht mit mehreren Analysefenstern herstellen.



Abb. 69: Symbol Pop out copy of panel into floating window (Kopie des Feldes in unverankertes Fenster einfügen)

Wählen Sie das Symbol Pop out copy of panel into floating window (Kopie des Feldes in unverankertes Fenster einfügen) aus.

Es befindet sich in der oberen linken Ecke des Diagramms der Cycling-Analyse oder der Parameterfenster.

Sie können das unverankerte Fenster an eine beliebige Position des Bildschirms bewegen.

Wenn das Fenster unverankert ist, können Sie die übergeordnete Analyse auswählen (z.B. absolute Quantifizierung).

Jede am unverankerten Fenster vorgenommene Änderung wird in der zugehörigen übergeordneten Analyse dargestellt.

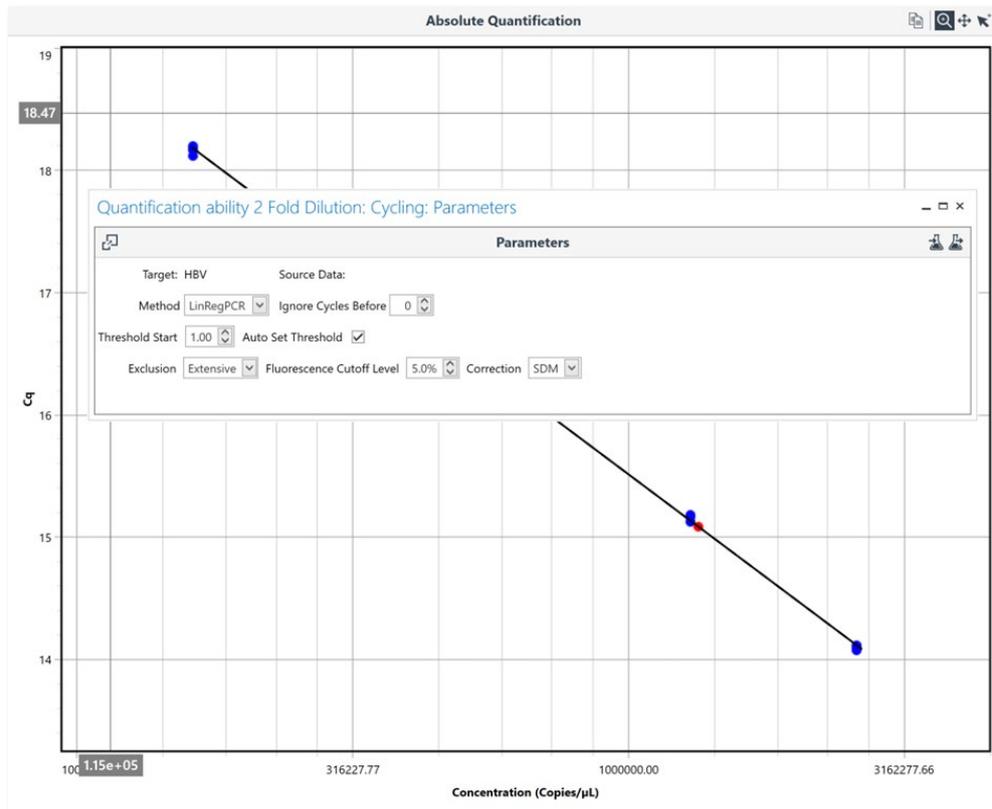


Abb. 70: Unverankertes Fenster

Wählen Sie das Löschsymbolsymbol in der oberen rechten Ecke des unverankerten Fensters aus, um das unverankerte Fenster zu schließen.

12.2 Schmelzkurvenanalyse (Melt)

Mit der Schmelzkurvenanalyse kann die Peak-Dissoziationstemperatur (T_m) einer Probe aus den Schmelzdaten bestimmt werden. Die grundlegende Schmelzkurvenanalyse kann typischerweise als Maß für die analytische Spezifität eines Assays verwendet werden. Nach Auswahl der Option Schmelzkurvenanalyse wird ein Diagramm angezeigt, das die erste Ableitungskurve, die als $\frac{dF}{dT}$ (y-Achse) dargestellt wird, gegen die Temperatur in °C (x-Achse) für das gewählte Ziel anzeigt. Der Schwellenwert der Schmelzkurve kann auf einen beliebigen Wert eingestellt werden, zusammen mit verschiedenen anderen Schmelzparametern.

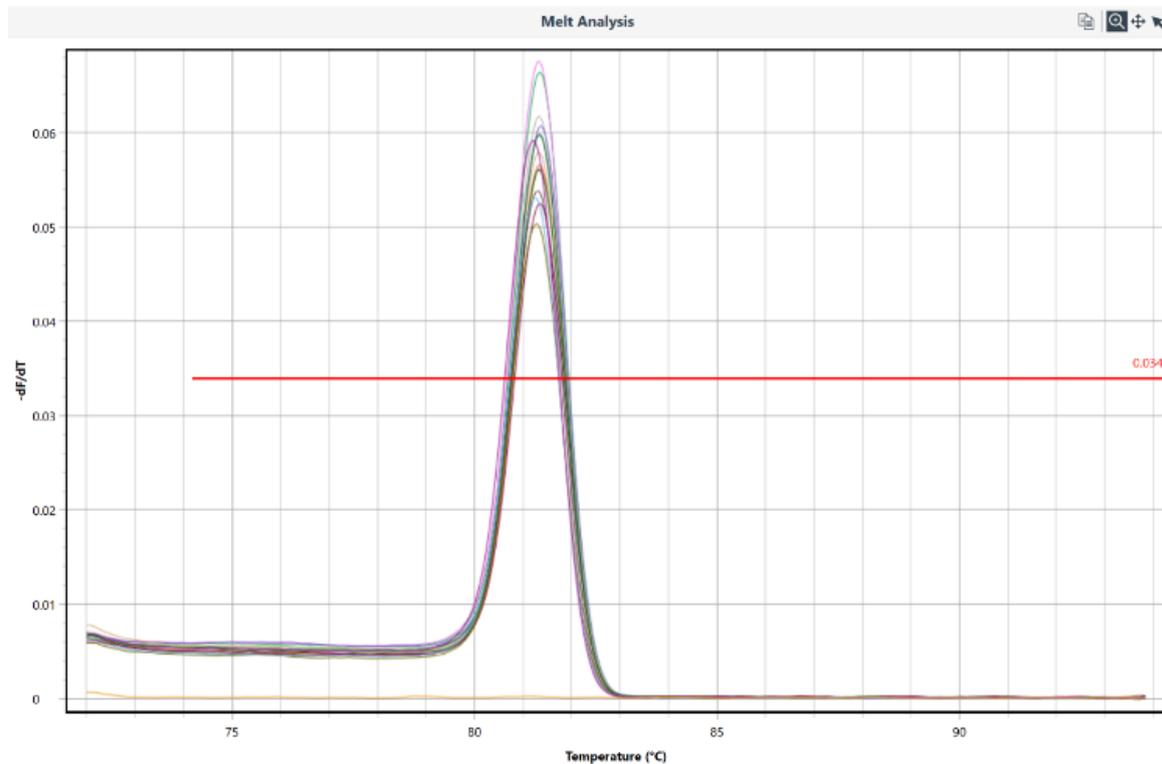


Abb. 71: Fenster Melt Analysis (Schmelzkurvenanalyse)

12.2.1 Parameter für Schmelzkurvenanalyse

Folgende Parameter können angepasst werden:

Target: IC/Dientamoeba fragilis

Threshold starting at °C

Invert Data

Filtering

Abb. 72: Parameter in Schmelzkurvenanalysen

Threshold (Schwellenwert): Ändern Sie den Schwellenwert, indem Sie entweder die rote Linie im Diagramm nach oben oder unten verschieben oder einen Zahlenwert in das Feld **Threshold (Schwellenwert)** eingeben. Es werden nur Peaks über der Schwellenlinie angezeigt

Threshold Start: Um frühere Peaks zu ignorieren, schieben Sie die rote Linie von links nach rechts, indem Sie an den Anfang der Schwellenlinie klicken, oder geben Sie einen Zahlenwert in das Feld **Threshold Start Temperature** ein.

Invert (Invertieren): Die ersten abgeleiteten Schmelzkurven können invertiert werden, um die Analyse von Daten zu ermöglichen, die mit Chemikalien wie gequenchten FRET-Dualhybridisierungs sonden oder Plexor® erzeugt wurden.

12.3 Absolute Quantifizierung

Mit dieser Analyseoption können Sie die unbekannte Konzentration einer Probe anhand einer Standardkurve quantifizieren. Darüber hinaus kann, zusammen mit einem Referenzmaterial bekannter Allergenkonzentration, der Gehalt an unbekanntem Proben mit Einheiten wie z.B. ppm charakterisiert werden.

12.3.1 Quantifizierungsanalyse mit Standardkurven

Mit der Funktion **Standard Curve Analysis (Standardkurvenanalyse)** können Sie die Effizienz eines Tests mithilfe einer seriellen Verdünnungsreihe einer Probe mit bekannter Konzentration bestimmen. Diese Methode kann als Alternative zur LinRegPCR-Methode für die Berechnung der Reaktionseffizienz verwendet werden. Die Analysemethode befindet sich in der Analyseoption **Absolute Quantification (Absolute Quantifizierung)**.

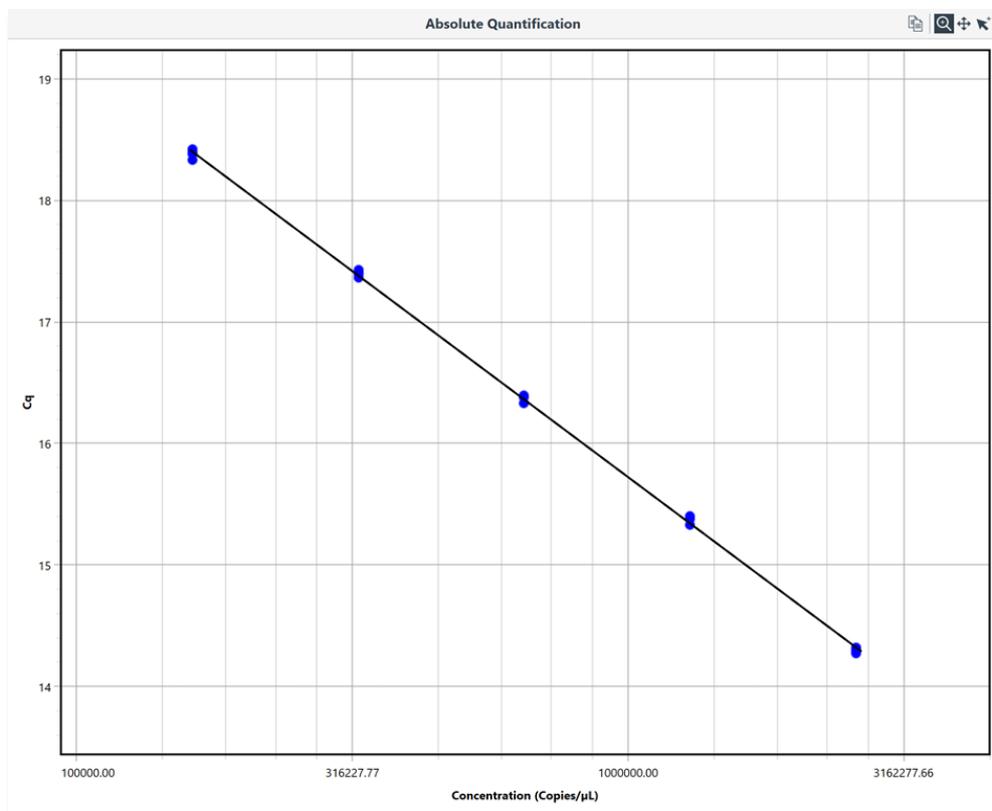


Abb. 73: Standardkurve - Datenpunkte der seriell verdünnten Standard-DNA sind blau dargestellt.

12.3.2 Standardkurvencharakteristik

Die Methode verwendet die Funktion **Cycling Analysis (Cycling-Analyse)**, um Cq -Werte zu ermitteln, und trägt sie (y-Achse) gegen den Logarithmus der gegebenen Konzentration (x-Achse) für jeden im Probeneditor annotierten Standard auf. Eine Regressionsgerade wird für das Diagramm erzeugt, aus der die Steigung der Geraden bestimmt wird.

Effizienz: In einem Übersichtsfenster werden die Werte für **R-Quadrat (R^2)**, und der **Equation (Geradengleichung)**, bestehend aus der Steigung (m) und dem y-Achsschnittpunkt, angezeigt.

Aus der Steigung der Geraden wird die Effizienz mit der Gleichung $10^{\frac{-1}{\text{Steigung}}} - 1$ berechnet und als ein Wert von 0 bis 1 ebenfalls angezeigt.

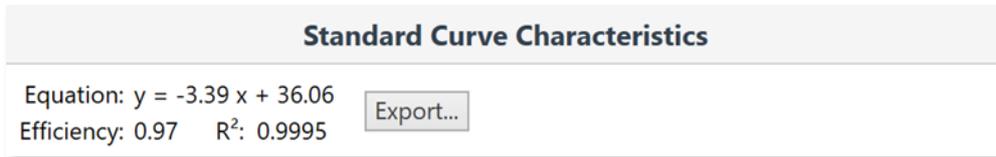


Abb. 74: Übersicht Standard Curve Characteristics (Standardkurven Charakteristika)

R-Quadrat-Wert: Der R^2 -Wert ist ein Maß für den Prozentsatz der Daten, die mit der Hypothese übereinstimmen, dass die gegebenen Standards eine Standardkurve bilden. Mit anderen Worten, wenn der R^2 -Wert niedrig ist, aggregieren die gegebenen Standards nicht sehr gut zur Regressionsgeraden und daher ist die berechnete Effizienz möglicherweise nicht zuverlässig.

Ein Wert von $> 0,98$ ist typischerweise ein guter R^2 -Wert. Ein guter R^2 -Wert kann auch dann für eine schlechte Standardkurve erzielt werden, wenn nicht genügend Standards verwendet wurden. Es wird empfohlen, dass sich die Standards über mindestens 5 \log_{10} Konzentrationen erstrecken.

Exportieren Sie die Standardkurve so, dass sie in späteren Läufen verwendet werden kann.

Die Standardkurve wird als *.micsc-Datei am gewünschten Speicherort abgelegt. Diese Datei kann in jeden Lauf importiert werden, der Cycling-Daten enthält, und als Teil der Analyse der absoluten Quantifizierung verwendet werden.

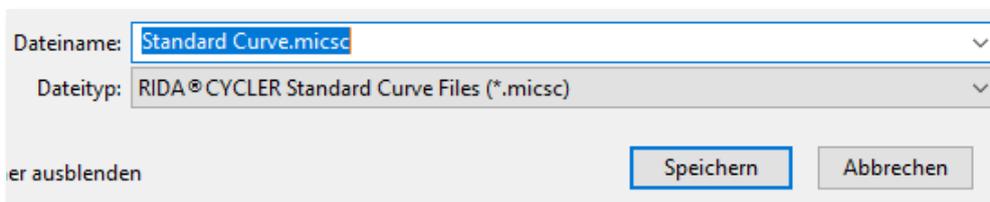


Abb. 75: Exportieren der Standardkurve

12.3.3 Importieren einer Standardkurve

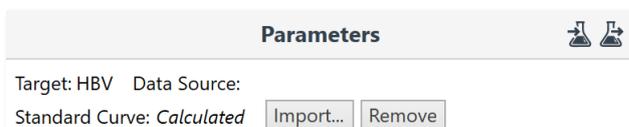


Abb. 76: Parameters (Parameter) Import einer Standardkurve

Importieren einer Standardkurve. Suchen Sie die Standardkurvendatei (*.micsc) an der Stelle, an der die Standardkurve exportiert wurde. Die Software wendet die Standardkurvenformel auf die Daten an und zeigt die Kurve in der Grafik an.

Es ist erforderlich, dass ein Standardkurven-Kalibrator verwendet wird, um die importierte Standardkurve zu überprüfen. Kommentieren Sie den Kalibrator im **Samples editor (Probeneditor)**, indem Sie ihm den Typ Standard zuweisen. Geben Sie dann die Konzentration für den Standardkalibrator ein. Für einen Kalibrator können eine Reihe von Replikaten ausgeführt werden, für eine importierte Standardkurve kann eine beliebige Anzahl an Kalibratoren verwendet werden.

Wenn Sie keinen Standardkalibrator anwenden, wird eine Warnung oberhalb der Standardkurve angezeigt. Eine Warnung wird auch angezeigt, wenn der Standardkalibrator eine Abweichung von ± 1 Zyklus aufweist.

12.3.4 Ergebnistabelle für die Standardkurve

Die **Standard Curve Results table** (Ergebnistabelle für die Standardkurve) enthält die folgenden Kennzahlen:

Cq (crossing point): Quantifizierungszykluswert für einen einzelnen Standard.

Given Concentration (gegebene Konzentration): Die gegebene Konzentration ist der Wert, der im **Samples editor (Probeneditor)** annotiert ist. Die ausgewiesenen Einheiten werden auch in der Spaltenüberschrift angezeigt. Das Einheitenmaß wird aus einer Liste im **Samples editor (Probeneditor)** ausgewählt.

Calculated Concentration (berechnete Konzentration): Ist eine angepasste Konzentration für einen einzelnen Standard, basierend auf der Regressionsgeraden. Die angepasste Konzentration wird berechnet, indem der Cq-Wert verwendet wird, um die neue Konzentration aus der Regressionsgeraden zu interpolieren. Der Mittelwert (\bar{x}) und die Standardabweichung (σ) für eine Reihe von Wiederholungen wird ebenfalls in der obersten Reihe für das Set angezeigt.

Percentage Variation (prozentuale Variation): Ist die prozentuale Differenz zwischen den gegebenen und berechneten Konzentrationen.

Standard Curve Results						
Well	Sample	Cq	Given Concentration (Copies/Reaction)	Calculated Concentration (Copies/Reaction)	% Variation	Calculated Reference (ppm)
12	S0	19,52	5E+05	5,318E+05	6,37	278,5
13	S1	22,74	5E+04	5,329E+04	6,57	27,9
14	S2	26,27	5000	4282	14,35	2,242
15	S3	29,45	500	439,9	12,02	0,2303
16	S4	32,28	50	58,54	17,07	0,03065

Abb. 77: Ergebnistabelle für die Standardkurve

12.2.5 Cycling-Analyse für Standardkurven

Cycling Analysis (Cycling-Analyse) wird verwendet, um die Cq-Werte für die Standardkurve zu bestimmen. Daher wird **Cycling Analysis (Cycling-Analyse)** automatisch mit der **Standard Curve Analysis (Standardkurvenanalyse)** gekoppelt und erscheint in der Navigationsleiste darunter. Verwenden Sie **Cycling Analysis (Cycling-Analyse)**, um Änderungen an Analyseparametern wie **Threshold Start** oder **Ignore Cycles Before** (erste Zyklen ignorieren) vorzunehmen. Es werden die gleichen Testparameter, welche für eine einzelne **Cycling Analysis (Cycling-Analyse)** vorgegeben sind, bei der Kopplung mit einer **Standard Curve Analysis (Standardkurvenanalyse)** angewendet. Wenn Sie den Probenselektor verwenden, um Proben aus der **Cycling Analysis (Cycling-Analyse)** zu entfernen, führt dies zu einer Neuberechnung der Amplifikationseffizienz in der Standardkurvenanalyse.



Abb. 78: Navigationsleiste Absolute Quantifizierung

12.3.6 Absolute Quantifizierung

Die Analysemethode **Absolute Quantification (Absolute Quantifizierung)** besitzt alle Funktionen, die im Abschnitt **Standard Curve Analysis (Standardkurvenanalyse)** beschrieben sind, erweitert um die zusätzliche Bestimmung unbekannter Konzentrationen mit Hilfe von Referenzmaterial.

Im Diagramm für die Standardkurve werden Standards als **blaue** Punkte, Unbekannte als **rote** Punkte und Referenzmaterial als **grüne** Punkte dargestellt. Proben, die außerhalb der Grenzen der Standardkurve liegen, werden in einer gestrichelten Linie angezeigt. Proben außerhalb der Grenzen einer Standardkurve sollten mit Vorsicht behandelt werden. Um zu vermeiden, dass Proben außerhalb der Grenzen der Standardkurve liegen, sollten Sie sicherstellen, dass Ihre Standardkurve genügend Verdünnungspunkte enthält, um alle Ihre potenziellen, unbekanntes Proben abzudecken. Dies kann die Bestimmung des linearen dynamischen Bereichs und/oder der Nachweisgrenze (LoD) des verwendeten Tests erfordern.

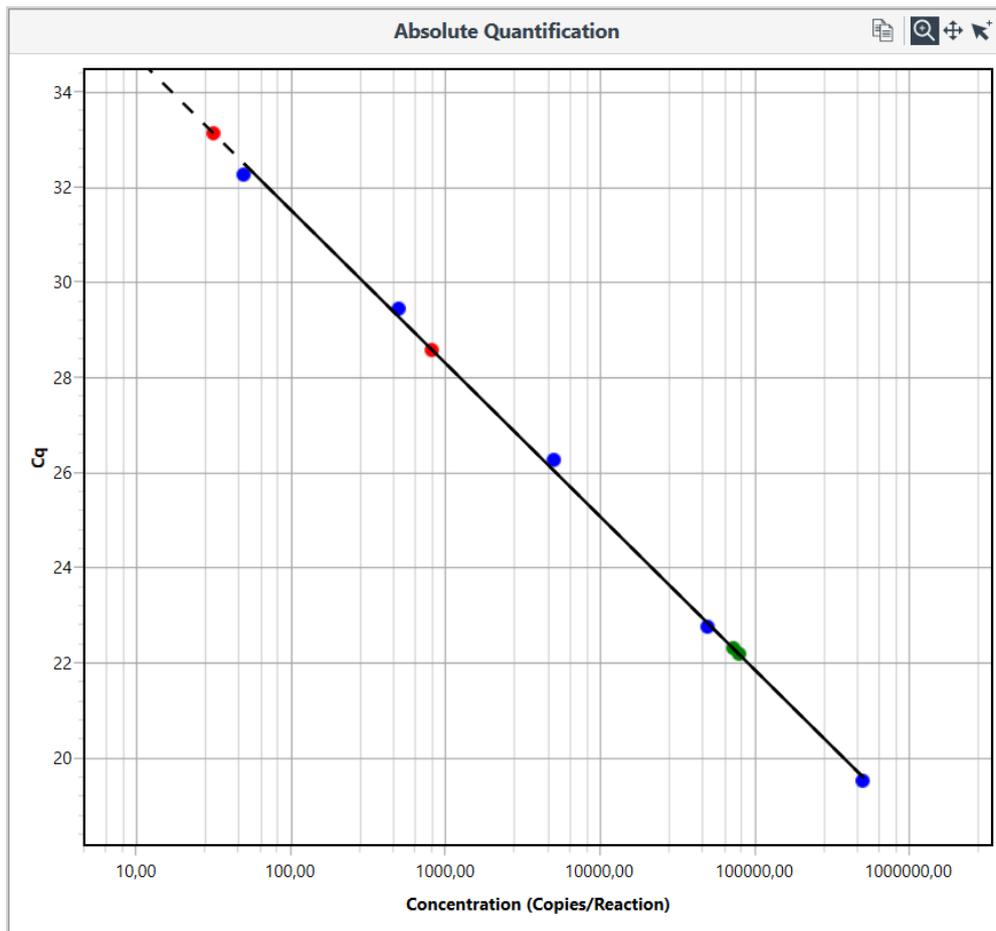


Abb. 79: Diagramm einer Standardkurve - Standards als **blaue** Punkte, unbekanntes Proben in Rot, Referenzmaterial in Grün.

12.3.7 Probenergebnistabelle

In der Tabelle **Sample Results table** (Probenergebnistabelle) wird die **Calculated Concentration** (Berechnete Konzentration) für jede unbekannte Probe angezeigt. Der Mittelwert und die Standardabweichung für eine Reihe von Replikaten werden ebenfalls in der obersten Zeile für die Reihe angezeigt. Die zuvor im **Samples editor** (Probeneditor) ausgewählte Einheit wird unter dem Titel **Calculated Concentration** (Berechnete Konzentration) angezeigt.

Die Cq -Werte für jede Probe werden ebenfalls in der **Sample Results table** (Probenergebnistabelle) angegeben.

Sample Results					
Well	Sample	Cq	Calculated Concentration (Copies/Reaction)	Calculated Reference (ppm)	
1	Sample 1	34,05	16,53	0,008658	^
2	Sample 2	35,16	7,478	0,003915	
3	Sample 3	35,46	6,011	0,003147	
4	Sample 4	32,72	42,56	0,02228	
5	Sample 5	33,14	31,63	0,01656	
6	Sample 6	32,61	46,09	0,02413	
7	Q40	22,30	7,308E+04	38,27	
8	Q40	22,17	7,985E+04	41,81	
9	EC				
10	NTC				
11	PTC	28,58	819,4	0,429	v

Abb. 80: Probenergebnistabelle

12.4 Allelische Diskriminierung (Allelic Discrimination)

Allelische Diskriminierung ermöglicht die Bestimmung von Genotypen unter Verwendung von kinetischen Echtzeitdaten, die aus Multiplex-Assays unter Verwendung der Hydrolysesonden-Chemie gewonnen wurden. Das Vorhandensein eines Allels wird durch eine Echtzeit-Verstärkungskurve innerhalb des spezifischen Kanals angezeigt, die der dafür vorgesehenen Sonde entspricht. Das

Vorhandensein beider Allele deutet auf Heterozygotie hin.

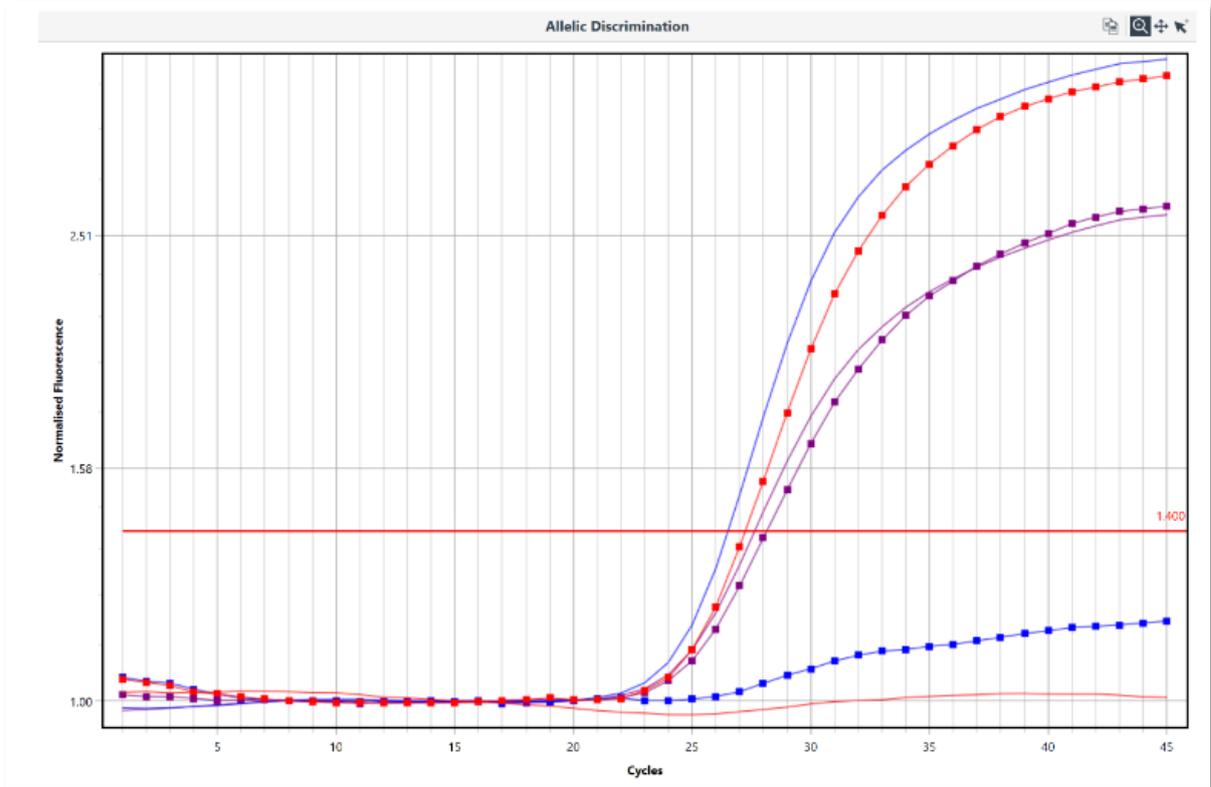


Abb. 81: Fenster Allelic Discrimination (Allelische Diskriminierung)

12.4.1 Parameter für Allelische Diskriminierung

Stellen Sie den Threshold (Schwellenwert) manuell auf ein Level ein, das erforderlich ist, um jedes Allel vom Hintergrund-Signal-Level zu unterscheiden.

12.5.2 Ergebnistabelle für Allelische Diskriminierung

Durch die Verknüpfung der Genotypbezeichnungen mit jedem Allel und der Festlegung des Schwellenwertes werden die Proben in der Ergebnistabelle zusammengefasst.

Results  		
Well	Sample	Genotype
1	Sample 1	Heterozygote
3	Sample 2	Wild Type
8	Sample 3	Mutation

Abb. 82: Probenergebnistabelle

12.5 Identifier

Normalisierte real-time-PCR-Kurven werden für jedes Target in einem Analysediagramm, in linearer Darstellung, abgebildet. Es besteht die Möglichkeit, alle Targets im gleichen Diagramm oder in einzelnen Diagrammen anzeigen zu lassen. Bei der Darstellung in einzelnen Diagrammen erfolgt die Auswahl des gewünschten Targets über die Diagrammreiter.

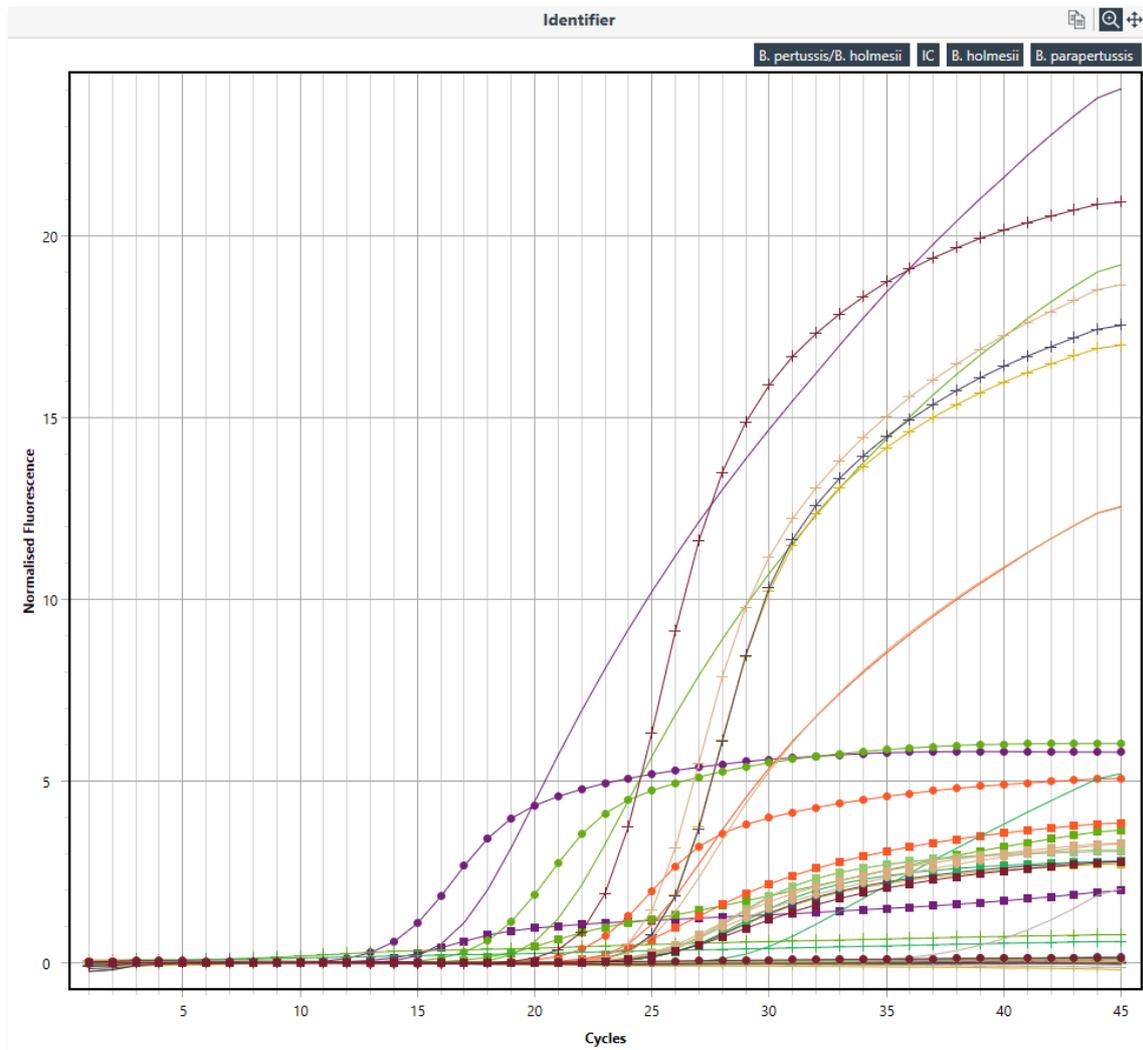


Abb. 83 Fenster Identifier

Über die Kanalaufistung im rechten oberen Bereich des Identifiers können die einzelnen Kanäle an- bzw. abgewählt werden.



Abb. 84 Einstellung der Kanalansicht

13 Projekte

Die Funktion Projects (Projekte) ermöglicht es dem Anwender, mehrere Läufe in einer Analyse zu kombinieren. Bis zu zehn Durchläufe können pro Projekt kombiniert werden, so dass bis zu 480 Proben gleichzeitig analysiert werden können.



Allgemeiner Sicherheitshinweis!

In der aktuellen Software Version (1.2.0) ist diese Funktion nur für Cycling Analysen, Schmelzkurvenanalysen und Absolute Quantifizierung verfügbar.

Um mehrere Läufe zu analysieren, wählen Sie **New (Neu)** und dann Projects (Projekte).

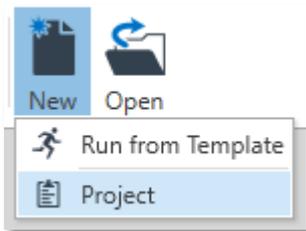


Abb. 85: Projekterstellung

Über die Schaltfläche **Runs +** in der Navigationsleiste für Läufe kann der Computer nach Lauf (Run)-Dateien durchsucht werden. Wählen Sie die Lauf (Run)-Dateien aus, die Sie kombinieren und analysieren möchten.

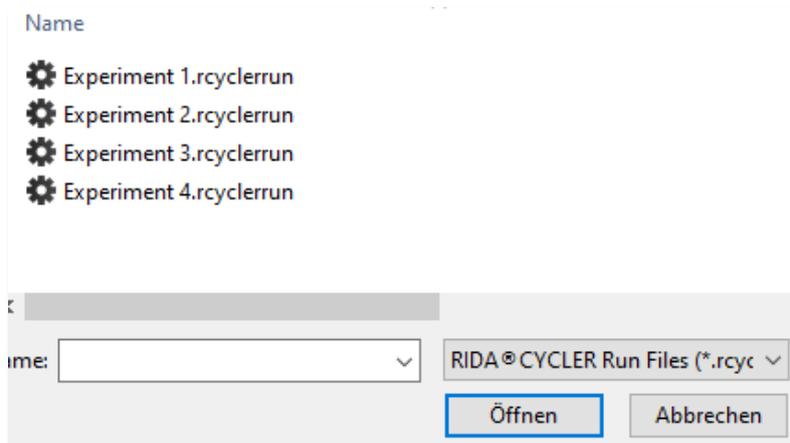


Abb. 86: Auswahl der Laufdateien

Stellen Sie sicher, dass die Ausführungsdateien miteinander kompatibel (gleiches Thermales Profil) sind. Jede hinzugefügte Laufdatei wird alphabetisch (A, B, C...) in der Reihenfolge ihrer Auswahl gekennzeichnet. Proben aus diesem Lauf werden ebenfalls mit Laufvoreinstellung in der Ergebnistabelle gekennzeichnet. Informationen zu jeder Laufdatei, wie z.B. Profil, Proben und die Rohdaten, können angezeigt werden, indem Sie den Laufdateipfad in der Navigationsleiste öffnen. Entfernen Sie eine Laufdatei aus dem Projekt, indem Sie die Schaltfläche **Delete (Löschen)** verwenden.

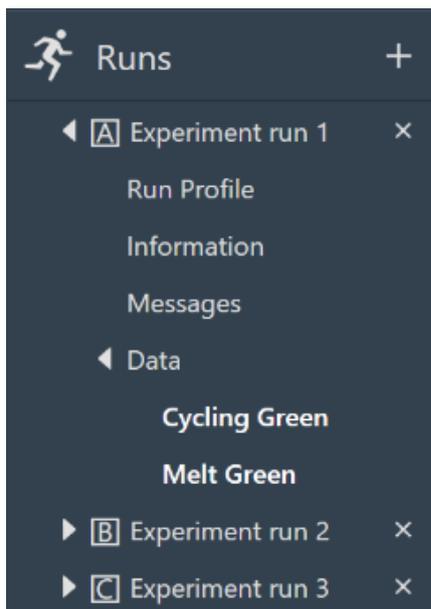


Abb. 87: Abrufen der Daten zu einzelnen Läufen

Jeder Assay, der im Lauf-Set verwendet wurde, erscheint im Assay-Abschnitt der Navigationsleiste. Sie können sich die Assay-Einstellungen ansehen, indem Sie den Baum öffnen.

Betrachten und/oder ändern Sie die **Samples (Proben)**, die Sie im Abschnitt **Project Setup (Projekteinstellungen)** der Navigationsleiste bearbeiten.

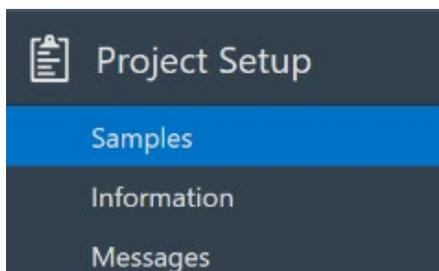


Abb. 88: Ändern von Sample (Proben) im Project Setup (Projekteinstellungen)

Proben werden für jeden Lauf angezeigt und in der Reihenfolge aufgelistet, in der der Lauf beim Start ausgewählt wurde. Der Laufname wird oben in der Beispielliste angezeigt und jede Laufliste kann über das kleine Dreieckssymbol links neben dem Laufnamen ein- oder ausgeblendet werden. Die Well-Nummernformate bleiben erhalten, bis Sie das Format im Projekt-Probeneditor auswählen, wodurch alle Läufe auf dieses Format zurückgesetzt werden. Die ausgewählte Schaltfläche im Sample-Editor (Probeneditor) wird auf die Option gesetzt, die im ersten Lauf verwendet wurde. Wenn Sie also alle Läufe so ändern möchten, dass sie übereinstimmen, müssen Sie eine andere Option auswählen und dann wieder zu der gewünschten wechseln.

Samples					
Colour	Name	Type	Standards Concentration	Gr	
▶ Run Name: Experiment run 1					
▶ Run Name: Experiment run 2					
◀ Run Name: Experiment run 3					
1	Standard 1	Standard	5000000		
2	Standard 1	Standard	5000000		
3	Standard 1	Standard	5000000		
4	Standard 2	Standard	1250000		
5	Standard 2	Standard	1250000		
6	Standard 2	Standard	1250000		
7	Standard 3	Standard	781250		
8	Standard 3	Standard	312500		
9	Standard 3	Standard	312500		
10	Standard 4	Standard	312500		
11	Standard 4	Standard	781250		
12	Standard 4	Standard	781250		
13	Standard 5	Standard	195000		
14	Standard 5	Standard	195000		
15	Standard 5	Standard	195000		
16	Sample 1	Unknown			
17	Sample 1	Unknown			
18	Sample 1	Unknown			
19	Sample 1	Unknown			
20	Sample 2	Unknown			

Abb. 89: Probenübersicht

Geben Sie alle Informationen über das Projekt in das dafür vorgesehene Feld ein.

Alle Vorgänge werden während der Analyse des Projekts aufgezeichnet und im Bereich **Messages (Nachrichten)** angezeigt.

13.1 Projektanalyse

Wählen Sie die gewünschten Analysetyp über +, um eine neue Analyse zu starten. Wählen Sie aus der Liste der verfügbaren Optionen den Assay aus, den Sie analysieren möchten.

Alle Proben werden in einem Diagramm (Graphen) dargestellt.

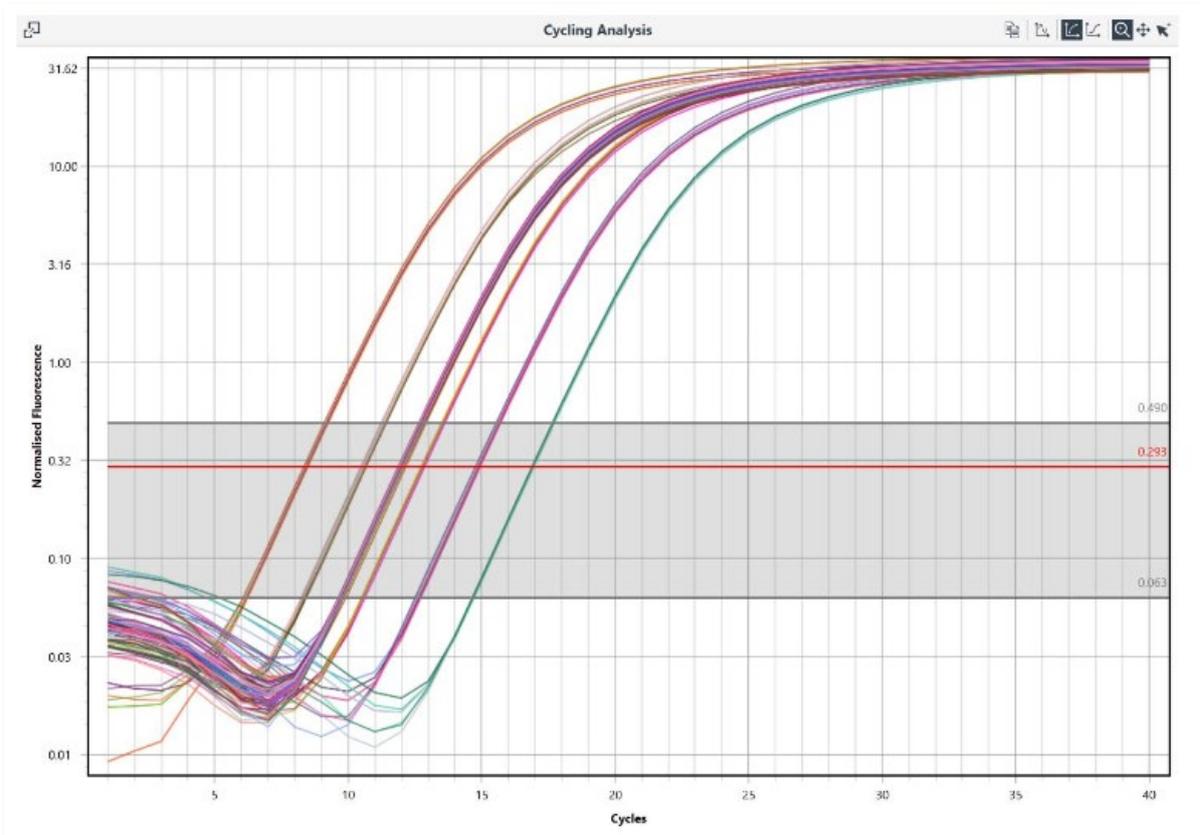


Abb. 90: Anzeige aller Proben in einem Graphen

Alle gleichen Optionen, die für jeden Analysetyp zur Verfügung stehen, stehen für ein **Project (Projekt)** zur Verfügung (siehe Analyse).

Die Ergebnistabellen sind ähnlich, jedoch werden die Ergebnisse für einzelne Proben mit Laufordnungsvoreinstellung für das Well (z.B. 1A, 1B, 1C....) angezeigt.

Results				
Well	Cq	Efficiency	R ²	Result
▶ NTC				
▶ Sample 1				$\bar{x} = 12.00 \sigma = 0.07$
16 [A]	11.93	0.99	0.99996	
16 [B]	11.95	0.99	0.99995	
16 [C]	11.95	0.99	0.99995	
17 [A]	11.97	0.98	0.99996	
17 [B]	12.12	0.99	0.99999	
17 [C]	12.12	0.99	0.99999	
18 [A]	12.00	0.98	0.99995	
18 [B]	12.02	0.98	0.99994	
18 [C]	12.02	0.98	0.99994	
19 [A]	11.91	0.98	0.99994	
19 [B]	12.03	0.99	0.99997	
19 [C]	12.03	0.99	0.99997	
▶ Sample 2				$\bar{x} = 11.96 \sigma = 0.02$
▶ Sample 3				$\bar{x} = 11.95 \sigma = 0.06$
▶ Sample 4				$\bar{x} = 11.95 \sigma = 0.07$
▶ Sample 5				$\bar{x} = 11.95 \sigma = 0.05$
▶ Sample 6				$\bar{x} = 11.94 \sigma = 0.04$
▶ Sample 7				$\bar{x} = 11.95 \sigma = 0.04$
▶ Sample 8				$\bar{x} = 11.94 \sigma = 0.06$
▶ Standard 1				$\bar{x} = 8.35 \sigma = 0.06$
▶ Standard 2				$\bar{x} = 10.51 \sigma = 0.06$
▶ Standard 3				$\bar{x} = 13.43 \sigma = 0.97$
▶ Standard 4				$\bar{x} = 14.14 \sigma = 1.03$
▶ Standard 5				$\bar{x} = 16.89 \sigma = 0.03$

Abb. 91: Probenergebnistabelle

Die Standardansicht für den Samples Selector (Probenselektor) ist in Läufe unterteilt, wobei der Laufname über der Liste der Proben angezeigt wird. Diese können über das kleine Dreieckssymbol ein- oder ausgeblendet werden.

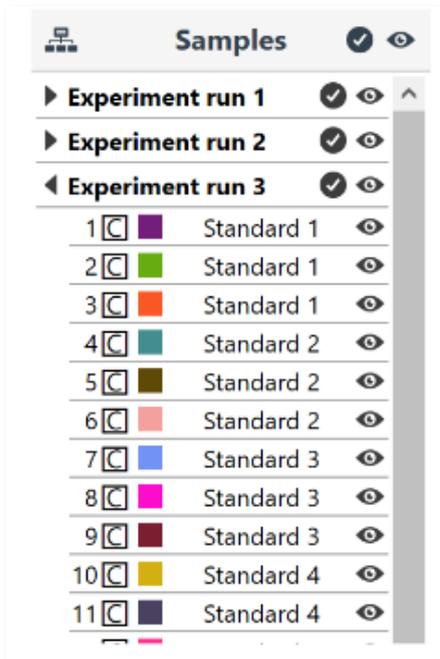


Abb. 92: Samples Selector (Probenselektor)

Über den Samples Selector (Probenselektor) können die Proben auch sortiert nach Assays, Sample Groups (Probengruppen), Sample Name (Probenname) oder None (keine) (well order (Well-Reihenfolge)) angezeigt werden. Die Gruppen können auch innerhalb des Samples Selectors (Probenselektors) über die Gruppierungsfunktion ein- oder ausgeblendet werden.

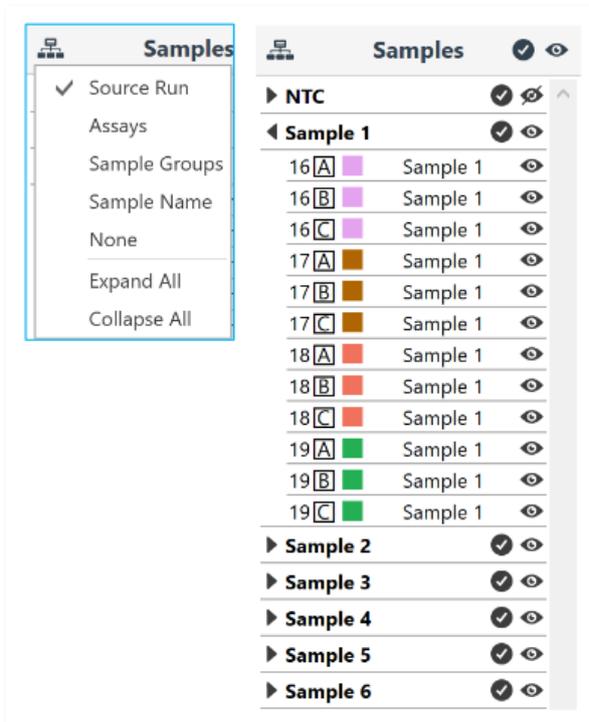
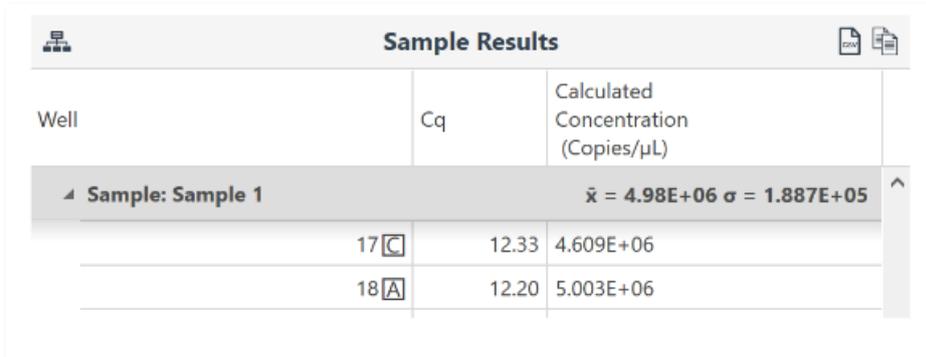


Abb. 93: Einstellung und Sortierung der Proben im Samples Selector (Probenselektor)

13.2 Einstellung von Konzentrationen für Projekte (über Analyseoption „Absolute Quantification“)

Die Einstellung der Einzelkonzentration vs. Kanalkonzentration wird aus dem ersten Importlauf übernommen. Wenn die Konzentrationseinheiten unterschiedlich sind, werden sie auf "mixed (gemischt)" umgestellt und der Anwender muss sie selbst auflösen.



Well	Cq	Calculated Concentration (Copies/μL)
Sample: Sample 1		$\bar{x} = 4.98E+06$ $\sigma = 1.887E+05$
17	12.33	4.609E+06
18	12.20	5.003E+06

Abb. 94: Einstellung der Konzentrationen

Projekte können in einem beliebigen Dateiverzeichnis gespeichert werden.

13.3 Amplitudenkorrektur für Cycling Analysen

Um Schwankungen der Signalamplitude bei positiven Proben zwischen Läufen und Instrumenten zu korrigieren, verwendet die Software einen Amplitudenkorrekturalgorithmus.

Um sicherzustellen, dass die Amplitudenkorrektur während der Cycling Analyse angewendet wird, müssen Sie sicherstellen, dass den verschiedenen Läufen die gleiche Probe hinzugefügt wird. Die Probe, genannt Amplitudenkorrektur, kann eine unbekannte, Standard- oder Positivkontrolle sein. Das ist jede Probe, die ein Signal mit einer beobachtbaren Amplitude erzeugt. NTC-, NRT- und Negativkontrollen sollten nicht verwendet werden. Stellen Sie sicher, dass zwischen den verschiedenen Läufen derselbe Name im Probeneditor verwendet wird. Es können mehrere Proben verwendet werden, aber Sie müssen sicherstellen, dass eine Verbindung zwischen jedem der verschiedenen Läufe besteht, die im Rahmen eines Projekts analysiert werden. Zum Beispiel: Probe 1 könnte zwischen den Läufen A und B verwendet werden, und Probe 95 könnte zwischen den Läufen B und C verwendet werden.

Die Amplitudenkorrektur funktioniert unter Verwendung des ersten Ableitungsmaximums, um einen Skalierungsfaktor zwischen den verschiedenen Läufen unter Verwendung der Amplitudenkorrekturproben zu bestimmen. Der Skalierungsfaktor wird dann auf alle Proben angewendet, um Amplitudenunterschiede zwischen Läufen oder Instrumenten zu korrigieren.

14 Berichte

Erstellen Sie einen Bericht für jeden Run (Lauf) mit der Schaltfläche **Reports + (Berichte +)** im **Run Navigator (Laufnavigator)**. Ein Standardbericht enthält Informationen zu **Run Properties (Laufeigenschaften)**, **Samples (Proben)**, **Run Profile (XYZ)** und den in **Analysis (Analyse)** angezeigten und ausgewerteten Fluoreszenzkanälen. Eine Vorschau des Berichts wird auf der rechten Fensterseite angezeigt. Einzelne Abschnitte können mit den nebenstehenden Haken jederzeit an- oder abgewählt werden.

14.1 Konfiguration des Berichts

Jeder Bericht ist in zwei Standardabschnitte unterteilt: **Run Properties (Laufeigenschaften)** und **Samples (Proben)**. Die verbleibenden Abschnitte hängen von der im Lauf ausgewählten **Analysis (Analyse)** ab. Sie können auswählen, welche Abschnitte im Bericht angezeigt werden sollen, indem Sie die Abschnitte in **Configuration (Konfiguration)** des Berichts aktivieren oder deaktivieren.

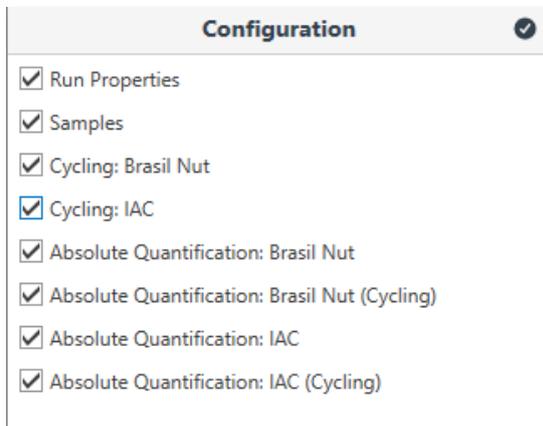


Abb. 95: Konfiguration des Berichts, einzelne Abschnitte können durch Häkchen an- oder abgewählt werden.

14.2 Vorschau des Berichts

Ein aus- /abgewählter Abschnitt wird in der **Preview (Vorschau)** des Berichts direkt angezeigt bzw. ausgeblendet. Nach jedem Abschnitt beginnt eine neue Seite. In der Kopfzeile jeder Seite wird der verwendete Dateiname angezeigt. In der Fußzeile sind, neben einer fortlaufenden Nummerierung, die verwendete Softwareversion sowie ein Zeitstempel (YYYY-MM-DD HH:MM:SS) enthalten.

RCY Report

Run Properties

Name	Experiment 1
File	[REDACTED]
Signature	Valid
Status	Completed
Operator	Admin

Notes

RIDA®GENE Bordetella #14288N PTC 20.4-27.0 Exp 2020/07

Started	26.03.2019 09:41:22
Completed	26.03.2019 10:42:35

Event Log

Time	Priority	User	Message
26.03.2019 09:41:22	Information	Admin	Run started via Bluetooth on "RIDA Cycycler-361" S/N M0000361 FW v2.24 S/W v1.0.0
26.03.2019 09:44:36	Information	Admin	Autogain completed for Green using Sample: 6, Detector gain: 1x, LED power: 391, Scale: 1.00
26.03.2019 09:44:38	Information	Admin	Autogain completed for Yellow using Sample: 35, Detector gain: 2x, LED power: 404, Scale: 0.98
26.03.2019 09:44:40	Information	Admin	Autogain completed for Orange using Sample: 6, Detector gain: 1x, LED power: 300, Scale: 1.50
26.03.2019 09:44:42	Information	Admin	Autogain completed for Red using Sample: 6, Detector gain: 1x, LED power: 187, Scale: 0.97
26.03.2019 10:42:34	Information	Admin	Run complete
26.03.2019 10:42:35	Information	Admin	Cycling "B. pertussis/B. holmesii" added Method changed from "LinRegPCR" to "Dynamic" Threshold Level changed from "0.10" to "0.80" Fluorescence Cutoff Enable changed from "True" to "False" Ignore Cycles Before changed from "0.00" to "5.00"

Abb. 96: Berichtsvorschau

14.2.1 Laufeigenschaften

Der Abschnitt **Run Properties (Laufeigenschaften)** enthält die folgenden Informationen:

Name	Der vom Benutzer gewählte Name des Laufs
File (Datei)	Der Verzeichnispfad in dem die Laufdatei abgespeichert wurde
Status	Valide oder invalide
Operator (Bediener)	Name der Person, die den Lauf durchgeführt hat. Anpassungen können unter Run Setup\Information vorgenommen werden.
Notes (Bemerkungen)	Informationen, die vom Benutzer unter Run Setup\Information eingetragen wurden.
Started (Gestartet)	Start des Laufs (YYYY-MM-DD HH:MM:SS)
Completed (Abgeschlossen)	Ende des Laufs (YYYY-MM-DD HH:MM:SS)
Event Log (Ereignisprotokoll)	Ein Bericht über Meldungen, die während des Laufs generiert wurden, z.B. Beginn des Laufs, Änderungen der Probenbezeichnungen oder Unterbrechungen der Verbindung zwischen RIDA®CYCLER und Computer.

14.2.2 Proben

Der **Samples editor (Probeneditor)** wird in der Berichtsvorschau dargestellt, einschließlich Well, **Name**, **Type (Typ)** der Proben, Standardkonzentrationen und **Assays (Tests)**. Unabhängig von der tatsächlichen Probenanzahl werden in diesem Abschnitt immer alle 48 Kavitäten aufgelistet.

14.2.3 Analyse

Die Analysen werden entsprechend der bereitgestellten Informationen dargestellt. Nur die zuvor ausgewählten Kanäle/Parameter werden angezeigt. Um mehrere Kanäle anzeigen zu lassen, öffnen Sie eine neue Analyse für die weiteren gewünschten Kanäle. Die Analyseparameter werden über dem Diagramm mit den Ergebnissen angezeigt, darunter folgt die Ergebnistabelle.

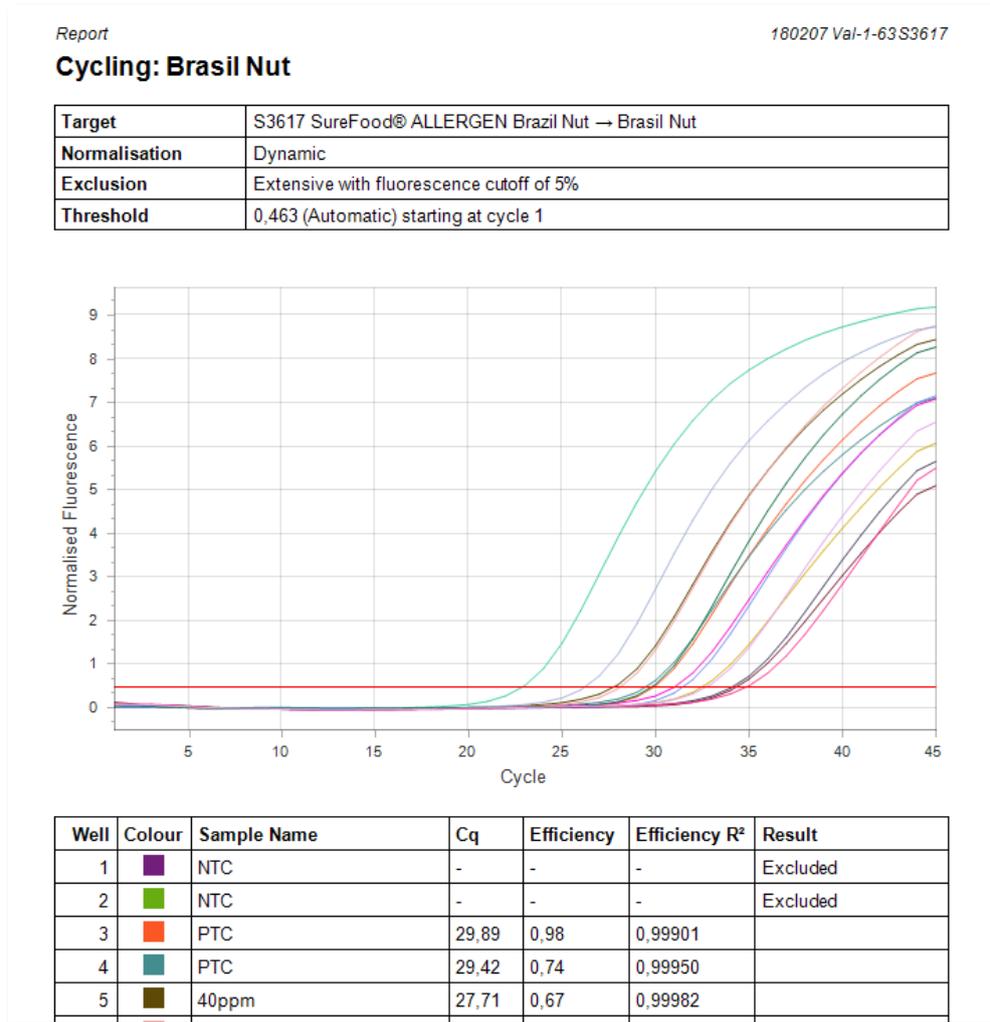


Abb. 97: Beispiel für einen Ergebnisbericht

14.3 Berichtsoptionen



Abb. 98: Menüleiste mit weiteren Berichtsoptionen

Search (Suchen)	Suchen Sie in der Berichtsvorschau ein Wort oder eine Zeichenfolge. Geben Sie den/die Suchbegriff(e) ein, um sie im Bericht zu finden. Die gefundenen Begriffe werden in der Vorschau blau hervorgehoben und können nacheinander mit der Enter-Taste betrachtet werden. Für diese Dokumentensuche gibt es noch zwei Optionen die über Settings, neben dem Eingabefeld, für die Suchanfrage ausgewählt werden können (Whole Words Only und Case Sensitive).
Print (Drucken)	Drucken Sie den Bericht mit benutzerdefinierten Einstellungen.
Quick Print (Schnelldruck)	Drucken Sie den Bericht mit Standard-Druckeinstellungen aus.
Page Setup (Seite einrichten)	Wählen Sie den Papiertyp und die Ausrichtung und passen Sie die Seitenränder an.
Page Selection (Seitenauswahl)	Navigieren Sie mit den Seitenauswahlschaltflächen durch die Seiten: First page (Erste Seite) , Previous page (Vorherige Seite) , Next page (Nächste Seite) und Last page (Letzte Seite) .
Zoom (Vergrößern/Verkleinern)	Verwenden Sie Vergrößern oder Verkleinern für die optimale Anzeige der Berichtsvorschau.
Export (Exportieren)	Exportieren Sie den Bericht in einem der verfügbaren Dateiformate, wie beispielsweise PDF, XLS und Textdatei. Nach Auswahl eines bestimmten Dateityps öffnet sich ein Fenster mit weiteren dateispezifischen Optionen.
Send (Senden)	Senden Sie einen Bericht per E-Mail in einem der verfügbaren Dateiformate. Ein Bericht, der im ausgewählten Dateiformat erstellt wurde, wird an eine E-Mail angehängt. Ihr Standard-E-Mail-Client wird verwendet, der sich automatisch öffnet (wenn verfügbar).
Watermark (Wasserzeichen)	Fügen Sie Ihrem Bericht ein Wasserzeichen hinzu. Das Wasserzeichen kann aus einem Text und oder einem Bild bestehen. Diese Option kann zum Einbetten von Text wie <i>Confidential (Vertraulich)</i> in den Bericht verwendet werden. Eine Liste mit Standardtexten wird bereitgestellt oder Sie können Ihren eigenen Text eingeben. Alternativ können Sie dem Bericht ein Bild hinzufügen, z.B. ein Firmenlogo. Die Ausrichtung und Position des Textes oder Bildes können konfiguriert werden, ebenso auf welchen Seiten das Wasserzeichen eingefügt werden soll.

15 Excel-Arbeitsmappe

Konvertieren Sie eine Laufdatei in eine Excel-Arbeitsmappe mit Arbeitsblättern für jeden Abschnitt. Führen Sie folgende Schritte aus, um eine Excel-Arbeitsmappe aus Ihrer Laufdatei zu erstellen:

Klicken Sie auf **Save As (Speichern unter). Wählen Sie dann **Excel Workbook (Excel-Arbeitsmappe) (*.xlsx)** aus den Optionen für **Save As Type (Speichern unter Typ)**.**

Nachdem die Excel-Arbeitsmappe erstellt wurde, öffnen Sie sie, um sich die Laufdatei anzeigen zu lassen.

Die Arbeitsmappe ist in folgende Arbeitsblätter unterteilt:

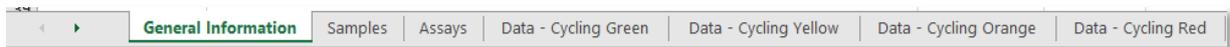


Abb. 99: Inhalte der Laufdatei, konvertiert in eine Excel-Arbeitsmappe

General Information (Allgemeine Informationen)	Enthält Informationen über die Softwareversion, den Speicherort der Datei, den Bediener, Start- und Endzeiten sowie die Laufprotokolle.
Samples (Proben)	Der Samples editor (Probeneditor) ist im Excel-Format wiedergegeben.
Assays (Tests)	Informationen über Chemietyp, untersuchte Parameter, Reporterfarbstoffe und Kanäle, die für jeden Parameter verwendet wurden.
Data Cycling (Cycling-Daten)	Die Rohdaten werden für jeden Kanal in einem separaten Arbeitsblatt bereitgestellt.
Analysis - Results (Analyse-Ergebnisse)	Die analysierten Ergebnisse werden im Tabellenformat, gemeinsam mit verschiedenen Diagrammen, je nach dem Typ der in der Laufdatei ausgewählten Analyse, angezeigt. Jede Analyse wird in einem separaten Arbeitsblatt bereitgestellt.
Analysis - Data (Analyse-Daten)	Es werden die verarbeiteten Daten für die Analyse bereitgestellt.

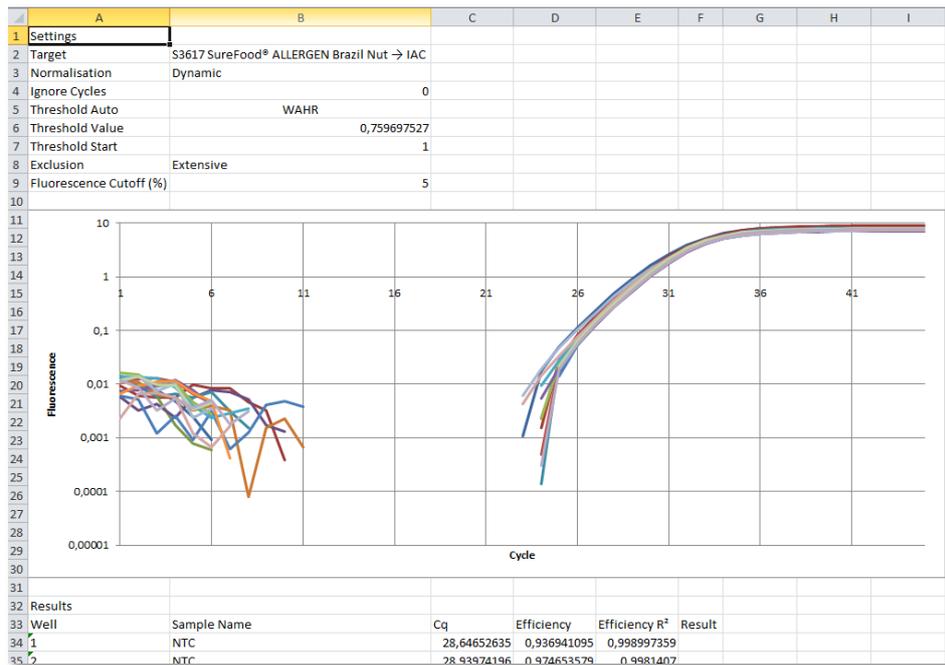


Abb. 100: Excel-Arbeitsmappe Cycling Results (Analyse Ergebnisse)

Hinweise und Anhang

Technische Daten, Umgebungsbedingungen

Abmessungen	B: 150 mm, L: 150 mm, H: 130 mm (265 mm bei geöffnetem Deckel)
Gewicht	2,1 kg
Wechselstromeingang	100 - 240 VAC, 50/60 Hz 4,0 A
Temperaturgenauigkeit	± 0,25 °C
Temperaturuniformität	± 0,05 °C
Aufheiz- und Abkühlraten	Heizen: 4 °C/s (schneller Modus)
	Kühlen: 3 °C/s (schneller Modus)
Temperatureingabebereich	35 - 99 °C (min. 40 °C beim Cycling)
Detektoren	Hochempfindliche Photodioden für jeden Kanal
Anregungsquellen	Hochenergie-LEDs für jeden Kanal
Kanäle	Grün Ex. 465 nm Em. 510 nm Filter
	Gelb Ex. 540 nm Em. 570 nm Filter
	Orange Ex. 585 nm Em. 618 nm Filter
	Rot Ex. 635 nm Em. 675 nm Filter
Erfassungszeit	1 s
Proben pro Gerät	48 Stück
Reaktionsvolumen	5 - 30 µL
Umgebungstemperatur	18 - 30 °C
Relative Luftfeuchtigkeit	20 - 80 %
	An einem kühlen, trockenen Ort, stehend lagern.

Informationen zur biologischen Sicherheit

Behandeln Sie biologisches Material sorgfältig und entsprechend den erforderlichen Sicherheitsvorschriften. Tragen Sie immer Schutzbrille, Handschuhe und Laborkittel. Der Anwender muss die erforderlichen Vorkehrungen treffen, um sicherzustellen, dass der Arbeitsbereich sicher ist und die Bediener des RIDA®CYCLER angemessen geschult und keinen gefährlichen Konzentrationen an Infektionserregern ausgesetzt sind.

Dekontamination des RIDA®CYCLER



Biologisches Risiko!

Die Reinigung und Dekontamination des Geräts ist als Vorsichtsmaßnahme erforderlich, wenn das Gerät und Zubehörteile zur Reparatur, Wartung oder Rücksendung an den Hersteller oder ein zertifiziertes Wartungsunternehmen übergeben werden sollen.

Die Oberflächen des RIDA®CYCLER, einschließlich der Kammer und der Röhrenklammer, können mit einer Natriumhypochlorit-Lösung (NaClO) dekontaminiert werden. Eine Lösung mit 1 gL^{-1} freiem Chlor ist für die Reinigung in einer allgemeinen Laborumgebung geeignet.

Die Verwendung stärkerer Lösungen (5 g/l) wird in Hochrisikobereichen empfohlen.

Reinigung der Rotor-Wells:

Die Rotor-Kavitäten des RIDA®CYCLER können mit einer Lösung von 70 - 90 % v/v Isopropanol und einer Interdentalbürste (Durchmesser 5 mm, minimalen Konusdurchmesser 1,9 mm) gereinigt werden. Die Reinigung der Kavitäten kann Probleme, wie fluoreszierende Verunreinigungen durch beispielsweise Markerstifte, beseitigen.

Eine Druckluftdose wird ebenfalls empfohlen (vorzugsweise geeignet für Kameraoptiken).

Durchführung

- Öffnen Sie den Deckel und entfernen Sie die Röhrenklammer.
- Befeuchten Sie die Interdentalbürste mit dem Isopropanol.
- Reinigen Sie die entsprechenden Kavitäten. Achten Sie auf eine gründliche Reinigung, um Verschmutzungen auf der Oberfläche der Rotor-Kavitäten zu entfernen.
- Lassen Sie die Kavitäten nach dem Bürsten vollständig trocknen.
- Optional können Sie Druckluft verwenden, um die Kavitäten von Staub zu reinigen.
- Wenn noch Spuren von Verunreinigungen vorhanden sind, wiederholen Sie den Vorgang noch einige Male.

Im Zweifelsfall wenden Sie sich bitte an Ihren lokalen Distributor oder direkt an die R-Biopharm AG, Darmstadt.

EG-Konformitätserklärung / CE-Zeichen

Das CE-Zeichen auf dem RIDA®CYCLER bestätigt, dass das Gerät allen anwendbaren Anforderungen der folgenden europäischen Richtlinien entspricht:

Niederspannungsrichtlinie (LVD) 2006/95/EG

Richtlinie über elektromagnetische Verträglichkeit (EMV) 2004/108/EG

Sowie den relevanten harmonisierten Normen

IEC 61010-1

IEC 61010-2-010

IEC 61010-2-081

ETSI EN 301 489-1 v1.9.2 (2011-09)

ETSI EN 301 489-17 v2.2.1 (2012-09)

EN 62311:2008

Bei nicht autorisierten Änderungen am Produkt erlischt diese Erklärung.

Symbole auf dem Typenschild

	<p>Zulassungszeichen</p> <p>Dieses Gerät entspricht den geltenden technischen ACMA-Normen für EMV.</p>
	<p>FCC-Konformitätserklärung</p> <p>Dieses Gerät entspricht Teil 15 der FCC-Regeln. Der Betrieb unterliegt den folgenden zwei Bedingungen: (1) Dieses Gerät darf keine schädlichen Störungen verursachen und (2) dieses Gerät muss den Empfang von Interferenzen tolerieren, einschließlich Interferenzen, die einen unerwünschten Betrieb verursachen können.</p> <p>Enthält FCCID: S7AIW03 Bluetooth®-Modul, das sich auf der Rückseite des Geräts im Gehäuse befindet.</p>
	<p>UL-Zulassung</p> <p>UL hat repräsentative Muster des Produkts getestet und festgestellt, dass es die UL-Anforderungen für Laborgeräte erfüllt.</p>
	<p>CE-Zeichen</p> <p>Das Gerät entspricht den grundlegenden Anforderungen und anderen relevanten Bestimmungen der Niederspannungsrichtlinie 2006/95/EG.</p>

Informationen zur Entsorgung

	<p>EU-Richtlinie für Elektro- und Elektronik-Altgeräte (WEEE).</p>
---	--

Die Entsorgung von Abfällen muss in Übereinstimmung mit allen nationalen, staatlichen und lokalen Gesundheits- und Sicherheitsvorschriften und -gesetzen erfolgen.

Produkte, die in EU-Ländern verkauft werden, müssen mit einer durchgestrichenen Mülltonne gekennzeichnet werden (oder in Einzelfällen muss dies auf der Verpackung vermerkt sein).

Die WEEE-Richtlinie legt fest, dass Kunden und Endverbraucher in EU-Ländern (EU) keine elektrischen oder elektronischen Geräte und kein elektrisches oder elektronisches Zubehör im Hausmüll entsorgen dürfen. Kontaktieren Sie innerhalb der EU Ihren lokalen Vertreter oder den Kundendienst Ihres Lieferanten, der Ihnen Informationen zur Entsorgung oder Sammlung von Altgeräten zur Verfügung stellen kann.

Anhang 1: Temperature Verification System (TVS)

Das TVS kann verwendet werden, um sicherzustellen, dass die Temperaturregelung des RIDA®CYCLER innerhalb der festgelegten Spezifikation arbeitet.



Abb. 101: Temperature Verification System



Warnhinweis!

Der TVS-Sensor ist sehr empfindlich und über ein sehr dünnes Kabel mit dem Gehäuse verbunden.

Bitte bedienen Sie das Gerät vorsichtig, um eine Beschädigung zu vermeiden. Halten Sie das Gerät nur an den Seiten fest.

Verifizierungsumgebung

Für optimale Ergebnisse ist es am besten, die Tests nicht in der Nähe von Luftstromquellen, z.B. Ventilatoren und Lüftungsöffnungen, durchzuführen. Die Umgebungstemperatur kann sich ebenfalls auf die Messung auswirken. Wir empfehlen, bei Standard-Laborbedingungen (22 - 28 °C) zu testen.

Installation der Hardware und Software

- Schließen Sie den zu verifizierenden RIDA®CYCLER an Ihren Computer an und schalten Sie ihn ein.
- Nehmen Sie das TVS aus dem Transportkoffer und schließen Sie es über USB an Ihren Computer an.
- Öffnen Sie die RIDA®CYCLER Software.
Die Software-Version muss mit dem TVS Gerät kompatibel sein.

Verifizierungsprozess

- Wenn der RIDA®CYCLER und das TVS an Ihren Computer angeschlossen sind, suchen Sie nach Geräten, indem Sie auf das Symbol „Kommunikation“ klicken.
- Wählen Sie das zu testende Gerät aus und wählen Sie im Dropdown-Menü die Option **Temperature Verification (Temperaturüberprüfung)**.
- Folgen Sie den Anweisungen des TVS-Assistenten.
- Lassen Sie während dieser Schritte das TVS neben Ihrem RIDA®CYCLER stehen.

Wenn Sie von der Software dazu aufgefordert werden, nehmen Sie den Sensor aus dem Schaumstoffschlitz und legen ihn in die Kavitäten 1 – 4, wobei die Lasche nach innen zeigt.

Lassen Sie alle anderen Kavitäten leer. Nachdem der Sensor mit der Röhrenklammer fixiert wurde, schließen Sie den Deckel und folgen den weiteren Anweisungen auf dem Bildschirm. Die Verifizierung kann bis zu 25 Minuten dauern.

Am Ende haben Sie die Möglichkeit, Ihren Verifizierungsbericht zu speichern oder auszudrucken.



mic Temperature Verification Report

Date Completed: 2 Dezember 2019
Instrument: M0001150
Verified By: TVS00020 (calibration valid until 13 September 2020)

Verification Results			
	mic Temp. (°C)	Actual Temp. (°C)	Measurement Error (Max±0,25°C)
Pt 60°C	60,01	60,02	-0,01
Pt 95°C	95,03	94,97	0,06

The verification data included in this document is traceable to a NATA certified reference.

This instrument has been verified to be working according to specification.

Name

Signature

Abb. 102: Verifizierungsbericht

Nehmen Sie den Sensor vorsichtig aus dem Gerät und legen Sie ihn in den Schaumstoffschlitz zurück.

Trennen Sie das TVS vom Computer und legen Sie es wieder in den Transportkoffer.

Anhang 2: Fehlermeldungen und Warnungen

Folgende Fehlermeldungen und Warnungen sind möglich:

“The selected assay is not compatible with the run”

(Das ausgewählte Assay ist nicht mit dem Lauf kompatibel.)

“The assay’s profile and current run’s profile do not match and cannot be automatically adjusted.”

(Das Profil des Tests und das aktuelle Laufprofil stimmen nicht überein und können nicht automatisch angepasst werden.)

Warnungen werden angezeigt, falls bei der Probenannotation nicht alle wichtigen Informationen angegeben wurden.

Anhang 3: Umgehungslösung für Toshiba Bluetooth®

Wenn Sie einen Toshiba-Computer verwenden und über Bluetooth® nicht mit dem RIDA®CYCLER kommunizieren können, sollte folgende Umgehungslösung das Problem beheben.

1. Geräte-Manager öffnen.

Setzen Sie den Mauszeiger in Windows® 8 auf die untere rechte Ecke des Bildschirms, bewegen Sie den Mauszeiger dann nach oben und klicken Sie auf Suchen.

Geben Sie Geräte-Manager in das Suchfeld ein und tippen oder klicken Sie auf Geräte-Manager.

Sie werden möglicherweise um ein Admin-Passwort oder um die Bestätigung Ihrer Auswahl gebeten.

Klicken Sie in Windows® 7 auf die Schaltfläche Windows-Start.

Wählen Sie die Systemsteuerung aus.

Klicken Sie auf die Überschrift „Hardware und Sound“.

Klicken Sie unter der Überschrift „Devices and Printers“ („Geräte und Drucker“) auf „Device Manager“ („Geräte-Manager“).

2. Öffnen Sie das Dialogfeld „Eigenschaften“ für Ihren Bluetooth®-Adapter.

Wählen Sie die Kopfzeile des Bluetooth-Bereichs aus; eine Anzahl untergeordneter Elemente wird angezeigt.

Wählen Sie in Windows® 8 das Bluetooth® VX Modul (wobei X für eine Versionsnummer steht) als Bluetooth®-Adapter aus.

Wählen Sie in Windows® 7 das Gerät „Bluetooth USB-Controller“ als Bluetooth®-Adapter aus.

Wenn dieses Gerät nicht vorhanden ist, verwenden Sie wahrscheinlich nicht die Toshiba Bluetooth®-Treiber. Sie sollten mit diesem Problemlösungsprozess nicht weiter fortfahren.

3. Rechtsklicken Sie auf den Bluetooth-Adapter und wählen Sie die Option „Treibersoftware aktualisieren“ aus.

4. Wählen Sie die Option „Browse my computer for drive software“ („Auf dem Computer nach Treibersoftware suchen“) aus.

5. Wählen Sie die Option „Let me pick from a list of device drivers on my computer“ („Aus einer Liste von Gerätetreibern auf dem Computer auswählen“) aus.

6. Wählen Sie die Option „Generic Bluetooth Adapter“ („Generischer Bluetooth-Adapter“) aus.

7. Klicken Sie auf Weiter. Windows® installiert den ausgewählten Treiber.

8. Windows® wird Sie möglicherweise auffordern, den Computer neu zu starten. Stellen Sie vor dem Neustart sicher, dass alle Ihre Daten in allen Ihren Anwendungen gespeichert sind.

9. Starten Sie die RIDA®CYCLER Software neu. Die Bluetooth®-Geräte sollten jetzt erkannt werden.

Anhang 4: CFR 21, Part 11

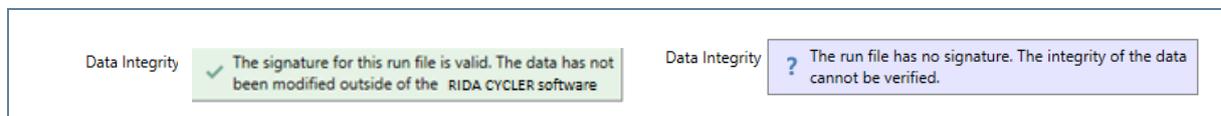
Der Code of Federal Regulations Title 21 Part 11 (21CFR11) der US-amerikanischen Arzneimittelagentur Food and Drug Administration deckt die Vorschriften für elektronische Aufzeichnungen und elektronische Signaturen ab, um zu gewährleisten, dass diese vertrauenswürdig, zuverlässig und gleichwertig zu Papieraufzeichnungen sind. Wir haben eine Reihe von Funktionen in unsere Software implementiert, die einige der Anforderungen von 21CFR11 Abschnitt 11.10 für geschlossene Systeme abdecken. Die verwendeten Verfahren sind nachstehend aufgeführt und beschrieben. Die Gründe für nicht abgedeckte Anforderungen, werden ebenfalls nachstehend ausgeführt.

21CFR11 (Abschnitt 11.10) lautet:

„Personen die geschlossene Systeme benutzen, um elektronische Aufzeichnungen zu erzeugen, zu verändern, zu pflegen oder zu übertragen, sollen Verfahren und Kontrollen anwenden, die so ausgelegt sind, die Echtheit, die Integrität und wo notwendig die Vertraulichkeit elektronischer Aufzeichnungen zu gewährleisten und sicherstellen, dass der Unterzeichner die unterschriebene Aufzeichnung nicht als nicht authentisch kennzeichnen kann. Solche Verfahren und Kontrollen sollen Folgendes beinhalten“:

„(a) Validierung von Systemen zur Sicherstellung der Richtigkeit, Zuverlässigkeit, der konsistenten beabsichtigten Leistung sowie der Fähigkeit, ungültige oder veränderte Aufzeichnungen zu erkennen“.

Die Software enthält Laufdateisignaturen, welche die Gültigkeit der Aufzeichnungen sicherstellen. Jede Manipulation der Laufdatei durch externe Software zerstört die Signatur und führt zu einer Meldung der Software. Die Datenintegrität finden Sie auf der Informationsseite der Laufdatei.



„(b) Die Fähigkeit, richtige und vollständige Kopien von Aufzeichnungen in menschlich lesbarer und elektronischer Form zu erzeugen, welche für die Inspektion, Nachprüfung und Kopie durch die Behörde geeignet sind“.

Diese Kontrolle wird durch die Erstellung von PDF-Berichten (siehe Berichte für weitere Informationen) erreicht.

„(e) Benutzung von sicheren Computer-erzeugten, zeitgestempelten Prüfpfaden, um unabhängig das Datum und die Zeit von Bedienerereignissen aufzuzeichnen und von Aktionen, die elektronische Aufzeichnungen erzeugen, verändern oder löschen. Änderungen von Aufzeichnungen sollten nicht die Ergebnisse vorheriger aufgezeichneter Information verdecken. Diese Prüfpfad-Dokumentation soll wenigstens so lange aufbewahrt werden wie die entsprechende elektronische Aufzeichnung und soll der Behörde für die Nachprüfung und das Kopieren zur Verfügung stehen“.

Folgendes wird protokolliert und auf der Seite Messages (Meldungen) der Software und im Abschnitt Event log (Ereignisprotokoll) des Berichts oder Excel®-Berichts angezeigt, wenn der Lauf gespeichert wird oder wenn ein Bericht umgestellt wird auf:

- Änderungen an allen Analyseparametern seit der Protokollaktualisierung für Analysen, die vor der letzten Protokollaktualisierung erstellt wurden
- Änderungen aus Standardparameterwerten für Analysen, die seit der letzten Protokollaktualisierung erstellt wurde
- Löschen von Analysen
- Änderungen bei der Probenauswahl der Analyse

Im Panel Messages (Meldungen) wird pro Analyse ein einzelner Eintrag angezeigt, der die Änderungen zusammenfasst. Der Zeitstempel des Eintrags ist der Zeitpunkt von *Run Save* (*Laufspeicherung*) und nicht der der Änderung des Analyseparameters.

Über die übrigen Verfahren haben wir keine Kontrolle, insbesondere, da sich einige von ihnen auf das gesamte Standardverfahren für einen Test- und/oder Qualitätsmanagementprozess beziehen, nicht nur auf die Software. Dazu gehören:

„(c) Schutz der Aufzeichnungen, um richtigen und betriebsbereiten Zugriff auf sie während der Aufbewahrungsfrist der Dokumente zu gewährleisten“.

Wird vom Dokumentenmanagementsystem des Unternehmens geleistet (siehe Hinweis unten).

„(d) Beschränkung des Systemzugriffs auf berechtigte Personen“.

Wird vom Dokumentenmanagementsystem des Unternehmens geleistet (siehe Hinweis unten).

„(f) Verwendung von Verfahrensprüfungen des Systems, um die zugelassene Reihenfolge von Schritten und Ereignissen zu erzwingen, wo notwendig“.

Dies ist eine Betriebsanforderung des Unternehmens.

„(g) Verwendung von Zugangsprüfungen, um sicherzustellen, dass nur berechtigte Benutzer das System benutzen können, ein Dokument elektronisch unterschreiben können, Zugang zum Ein-/Ausgabegerät des Betriebs- oder Computersystems haben, eine Aufzeichnung verändern oder die vorliegende Tätigkeit durchführen können“.

Wird vom Dokumentenmanagementsystem des Unternehmens geleistet (siehe Hinweis unten).

„(h) Verwendung von Gerätetests (z.B. Terminal), um, falls notwendig, die Gültigkeit der Dateneingabequelle oder eines Befehls zu ermitteln“.

Dies ist eine Betriebsanforderung des Unternehmens.

„(i) Festlegung, dass Personen, die elektronische Aufzeichnungs- /Signatursysteme entwickeln, pflegen oder nutzen, die richtige Ausbildung, Schulung und Erfahrung besitzen um die ihnen zugewiesenen Aufgaben durchzuführen“.

Dies ist eine Betriebsanforderung des Unternehmens.

„(j) Die Einführung und Einhaltung schriftlich festgelegter Richtlinien, die Einzelpersonen für Aktionen die mit ihren elektronischen Signaturen ausgelöst wurden, haftbar und verantwortlich machen, um Fälschungen von Aufzeichnungen und Signaturen zu verhindern“.

Dies ist eine Betriebsanforderung des Unternehmens.

„(k) Verwendung geeigneter Kontrollen der Systemdokumentation, einschließlich:

(1) Angemessene Kontrollen über Verbreitung von, Zugang zu und Benutzung von Dokumentation für Systembetrieb und -pflege.

(2) Versions- und Änderungskontrollverfahren, um einen Prüfpfad zu pflegen, der die zeitliche Entwicklung und Änderungen der Systemdokumentation beschreibt”.

Dies ist eine Betriebsanforderung des Unternehmens.

Die Dateiverwaltung liegt beim Endbenutzer. Er muss die geeigneten Berechtigungen und den Dateispeicher so konfigurieren, dass sie diese Anforderungen erfüllen. Windows ermöglicht Ihnen separate Berechtigungen zum Erstellen von Dateien oder zum Schreiben und Löschen von Daten. Es unterscheidet jedoch nicht zwischen dem Schreiben einer Datei und dem Überschreiben einer Datei, sodass Sie nicht daran gehindert werden, eine Datei beim Speichern mit einer anderen zu überschreiben.

Wir empfehlen, ein geeignetes Qualitätsmanagement-Softwaresystem für Unternehmen wie MasterControl™ (MasterControl Inc., Utah, USA) zu verwenden, um alle 21CFR11-Anforderungen zu erfüllen.

Anhang 5: Fluoreszenzfarbstoff-Tabelle

Farbstoff	Anregung	Emission	Kanal	Anwendung
BEBO	468	492		Interkalierend
LC Green®	455	495		HRM Farbstoff
SYTO® 9	483	503		HRM Farbstoff
FAM™ (optimal)	494	515		Konjugierte Markierung
SYBR® Green I	494	521		Interkalierend
RiboGreen®	500	520		RNA-Markierung
PicoGreen®	502	523		dsDNA-Markierung
Eva Green®	503	527		HRM Farbstoff
TET™	521	536	suboptimal	Konjugierte Markierung
CAL Fluor® Gold 540	522	541	suboptimal	Konjugierte Markierung
JOE™	520	548	suboptimal	Konjugierte Markierung
VIC®	538	554		Konjugierte Markierung
HEX™	535	555		Konjugierte Markierung
CAL Fluor Orange 560 (optimal)	540	561		Konjugierte Markierung
Quasar® 570	548	566		Konjugierte Markierung
Cy™3	550	570		Konjugierte Markierung
NED™	546	575		Konjugierte Markierung
TAMRA™	555	576		Konjugierte Markierung
CAL Fluor® Red 590	565	588	x	Konjugierte Markierung
ROX™	573	602		Konjugierte Markierung
Texas Red®	583	603		Konjugierte Markierung
CAL Fluor® Red 610 (optimal)	590	610		Konjugierte Markierung
LC® Red 640	620	635	suboptimal	Konjugierte Markierung
Quasar® 670 (optimal)	647	667		Konjugierte Markierung
Cy™ 5	651	674		Konjugierte Markierung
Cy™ 5.5	675	694		Konjugierte Markierung
Quasar® 705	690	705	x	Konjugierte Markierung

Anerkennung von eingetragenen Marken

Adobe® und *Reader*® sind eingetragene Marken von Adobe Systems Incorporated, San Jose CA USA.

Bluetooth® ist eine eingetragene Marke der Bluetooth SIG, Kirkland WA USA.

CAL Fluor®, Quasar® und BHQ® sind eingetragene Marken von Biosearch Technologies, Petaluma CA USA.

Eclipse® ist eine eingetragene Marke von Epoch Biosciences Inc., Bothwell WA USA.

Eva Green® ist eine eingetragene Marke von Biotium, Hayward CA USA.

Hex™, NED™, ROX™, Cy™, FAM™, TET™, TAMRA™ und JOE™ sind Marken und VIC® ist eine eingetragene Marke von Applied Biosystems, Foster City CA USA.

LC Green® ist eine eingetragene Marke von Idaho Technology Inc., Salt Lake City UT USA.

LC® ist eine eingetragene Marke der Roche Holding AG, Basel Schweiz.

LUX® Sonden, Texas Red®, SYTO®, SYBR®, PicoGreen® und RiboGreen® sind eingetragene Marken von Life Technologies, Carlsbad CA USA.

Windows® ist eine eingetragene Marke der Microsoft Corporation, Redmond WA USA.

Literatur

1. *Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., and Wittwer, C.T.* (2009) The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.*, 55: 611 – 622.
2. *Livak, K.J. and Schmittgen, T.D.* (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4): 402 – 8.
3. *Ramakers, C., Ruijter, J.M., Lekanne Deprez, R.H., and Moorman, A.F.M.* (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*, 339: 62 – 66.
4. *Ruijter, J.M., Ramakers, C., Hoogaars, W.M.H., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M.J.B., and Moorman, A.F.M.* (2009) Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.*, 37: e45.
5. *World Health Organization.* Laboratory Biosafety Manual – 3rd ed. Geneva: World Health Organization; 2004.

Abkürzungen

CI	Konfidenzintervall (Confidence interval)
Cq	Quantifizierungszyklus (Quantification cycle)
CV	Variationskoeffizient (Coefficient of variation)
EC	Extraktionskontrolle (Extraction control)
IAC	Interne Amplifikationskontrolle (Internal amplification control)
LoD	Nachweisgrenze (Limit of detection)
NTC	No Template Control
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)
PTC	Positive Template Control
qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR
RIN	RNA-Integritätsnummer (RNA Integrity Number)
RT-qPCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SD	Standardabweichung (Standard deviation)
W-o-L	Linearitätsfenster (Window of linearity)

Glossar

Analytische Genauigkeit	Der Unterschied zwischen den experimentell gemessenen und tatsächlichen Konzentrationen.
Analytische Wiederholbarkeit:	Genauigkeit des Tests innerhalb derselben Proben, die wiederholt in demselben Test gemessen wurden. Wird auch als Intra-Assay-Varianz bezeichnet und als SD für die Cq-Varianz oder CV der Kopienanzahl/ Konzentrationsvarianz ausgedrückt.
Analytische Reproduzierbarkeit	Die Variation der Ergebnisse zwischen Läufen oder verschiedenen Labors. Wird auch als Inter-Assay-Varianz bezeichnet und als SD oder CV der Kopienanzahl oder -konzentration ausgedrückt. Da die Cq-Werte in der Regel zwischen Läufen variieren, ist die Angabe von Inter-Run-Variationen nicht geeignet.
Analytische Empfindlichkeit	Die Mindestanzahl von Kopien in einer Probe, die mit einem Test genau gemessen werden kann.
Analytische Spezifität	Der Test weist nur die spezifische Zielsequenz statt eines anderen, unspezifischen Ziels nach. Die Verwendung von NTC hilft bei der Bestimmung der analytischen Spezifität.
Hydrolyse-Sonden	Kurze Oligonukleotide mit einem Fluoreszenz-Reporter-Farbstoff am 5'-Ende und einem Quencher-Molekül am 3'-Ende. Wenn die Sonde intakt ist, führt die räumliche Nähe des Reporter-Farbstoffs zum Quencher dazu, dass nur eine geringe Fluoreszenz nachgewiesen wird. Während der Elongation wird die Sonde durch die Exonukleaseaktivität der Polymerase abgebaut, wodurch der Reporter-Farbstoff vom Quencher freigesetzt wird.
Nachweisgrenze (LoD)	Die LoD ist die minimale Konzentration, die mit hinreichender Sicherheit (typischerweise 95 % Wahrscheinlichkeit) nachgewiesen werden kann.
Linearer dynamischer Bereich	Ist die höchste bis niedrigste quantifizierbare Kopienzahl, die mittels einer Standardkurve bestimmt wird.
Magnetische Induktion	Wird ein Leiter wie beispielsweise Metall einem Magnetfeld ausgesetzt, wird in diesem Leiter ein kreisförmiger elektrischer Strom, auch bekannt als Wirbelstrom, induziert. Aufgrund seines elektrischen Widerstands wird der Leiter hierbei heiß. Im RIDA®CYCLER ist der Rotor der Leiter, der bei Exposition gegenüber einem Magnetfeld heiß wird.



Bio Molecular Systems Pty Ltd

Unit 5-3 Northward Street,
Upper Coomera QLD 4209
Australien

Telefon: +61 (02) 93321694

E-Mail: support@biomolecularsystems.com

www.biomolecularsystems.com