



Nous offrons deux types de solutions pour le contrôle des incubateurs à sec et des thermocycleurs point final et qPCR.

## I. Un service de validation sur site



Ce service est accrédité Cofrac pour tous les paramètres en temps et en température.

L'outil de mesure est une batterie de sondes thermiques de type thermistance NTC couplées à un boîtier d'acquisition et d'un logiciel d'analyse des données. Elles capturent 4 mesures de température par seconde.

La chaîne de mesure est étalonnée annuellement par un laboratoire accrédité ISO 17025 en multipoints (30°C/60°C/90°C/95°C). Les sondes sont adaptées à la géométrie des instruments à contrôler. La disposition des capteurs se fait en fonction du format du bloc et donnée dans le logiciel d'acquisition.

Lorsque nous sommes amenés à utiliser les sondes filaires nous utilisons l'huile minérale pour améliorer le transfert thermique, le volume dépend de la volumétrie des puits (5µl pour un 384 puits et 20µl pour un 500µl).

Nous mesurons à l'intérieur des puits afin de s'affranchir des biais de mesures qui peuvent être constitués par la présence d'un consommable ou d'un liquide. La méthode est dynamique pour reproduire un cycle d'amplification réel. Ainsi nous avons plusieurs protocoles standards pour nos clients accrédités soit ISO 17025 soit ISO 15189. Ainsi le client a le choix entre plusieurs protocoles pour se rapprocher au maximum de ce qu'il fait dans le laboratoire. Voici un exemple du protocole:

Préchauffage:

Step 1: 30.0 °C for 60 s  
Step 2: 95.0 °C for 60 s  
Step 3: 30.0 °C for 60 s  
Protocole STANDARD:

Step 1: 30.0 °C for 60 s  
Step 2: 95.0 °C for 180 s  
Step 3: 30.0 °C for 120 s  
Step 4: 90.0 °C for 180 s  
Step 5: 50.0 °C for 180 s



Step 6: 70.0 °C for 180 s  
Step 7: 60.0 °C for 180 s  
Step 8: 30.0 °C for 60 s

L'outil est étalonné annuellement, il ne peut pas être vendu.

Nous pouvons intervenir par exemple 1 fois par an ou plus selon la fréquence d'utilisation de l'appareil.

Le service se solde par la délivrance d'un rapport métrologique et l'interprétation et l'analyse des résultats et leur influence sur la PCR avec toutes les explications utiles. Un constat de vérification et la conclusion sur la conformité peut vous être fourni (si vous êtes capables de nous fournir vos EMT) avec la conclusion de la nécessité de réparer votre appareil.

Nous pouvons contrôler les protocoles que vous utilisez dans votre laboratoire et, suite à certaines normes comme celle en santé animale (NF47600) ou en agro-alimentaire (V-03112), nous procédons au contrôle de 3 cycles consécutifs ou plus, (maxi jusqu'à 12 cycles).

## II. Un outil d'auto test des performances de votre thermocycleur



Le DRIFTCON : cet outil est une batterie de sondes assemblées dans un bloc adapté à votre thermocycleur, couplé à un logiciel d'acquisition de données et vous délivre un rapport de test pour la validation de conformité avec les normes constructeur. Il ne constitue en aucun cas une certification mais une validation des performances de votre appareil.

Nos bases de données vous donnent une comparaison des performances par rapport aux instruments du même modèle. Nous proposons lors

du réétalonnage de votre chaîne de mesure soit un ré-étalonnage mono point soit un ré-étalonnage multipoints (30°C/60°C/90°C/95°C). Ce réétalonnage doit se faire tous les deux ans ou toutes les 250 mesures.

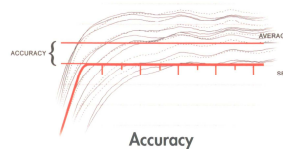
## III. Les deux services



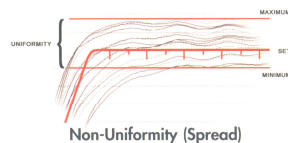
L'incertitude totale du matériel de mesure est de  $0.13^{\circ}\text{C}$  pour les systèmes fermés et  $0.04^{\circ}$  pour les systèmes contrôlables uniquement ouverts.

La meilleure incertitude totale de mesure : est de  $0.21^{\circ}\text{C}$  et c'est une incertitude cumulée

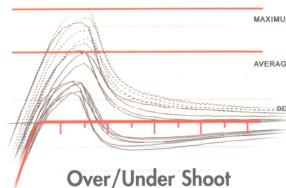
- **La précision en température** (c'est la moyenne des températures prises par l'ensemble des sondes à une température donnée).



- **L'uniformité en température** donnée à 5s/10s/15s/30s selon la durée du plateau (L'uniformité est la différence entre la zone la plus chaude et la zone la plus froide et permet de savoir si vos échantillons sont traités de la même manière sur l'ensemble du bloc).



- **Les overshoots** sont des dépassements de la température de consigne.

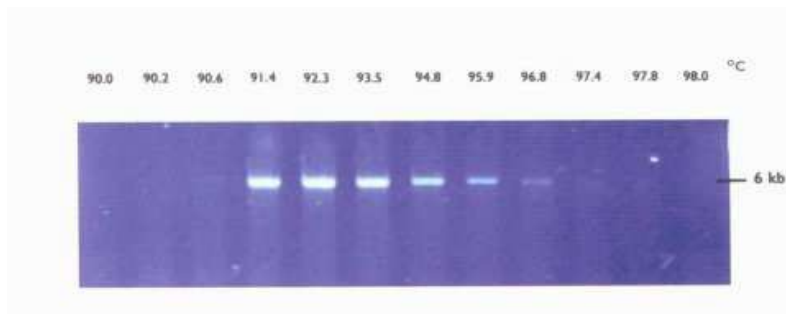


- **Les undershoots** sont des abaissements de température par rapport à la température de consigne.
- **Durée de maintien du plateau en secondes.** La référence de temps est donnée par l'horloge de l'ordinateur d'acquisition. Les débuts de plateau sont déterminés lorsque la moyenne des capteurs entre dans un offset de  $1^{\circ}\text{C}$  par rapport à la température de consigne.
- **Vitesse des montées et de descentes en température**



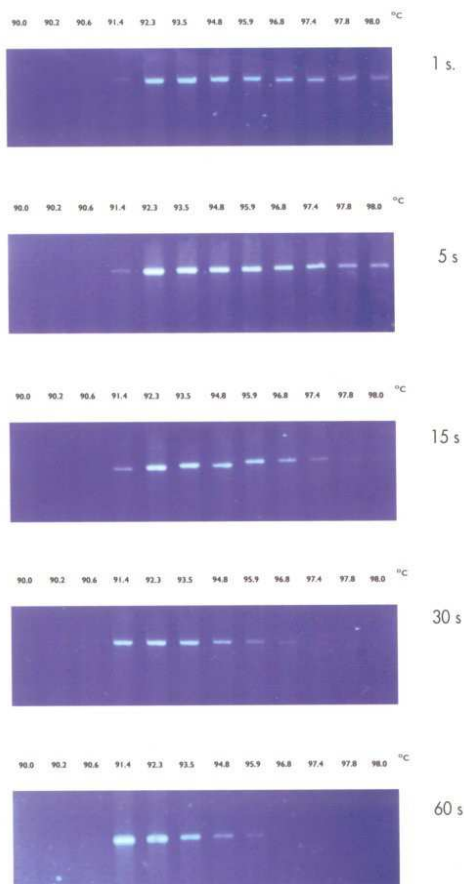
La résolution du système est de **1/100<sup>ème</sup>**. L'ensemble du système de validation est ré-étalonné par une société certifié RVA l'équivalent en France COFRAC **ISO 17025**

#### IV. Effets de la température sur la dénaturation



Influence de la dénaturation sur la baisse d'activité enzymatique provoquée par l'inactivation

thermique.

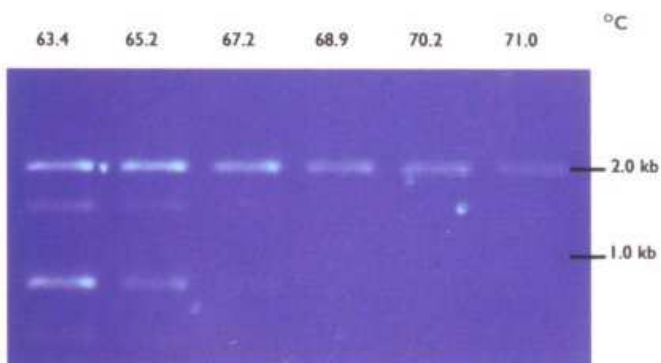


Influence de la température de dénaturation sur la baisse d'activité enzymatique et la baisse de rendement de la réaction, dans la durée, l'enzyme est inactivé par une trop haute température de dénaturation. Notez que la température de dénaturation ne doit pas excéder 94°C, préférentiellement 93°C pendant un maximum d'une minute (hybridation 60°C; 60s, dénaturation 1 à 60s, éléngation durée et température constante, 5 unités de Taq polymérase)



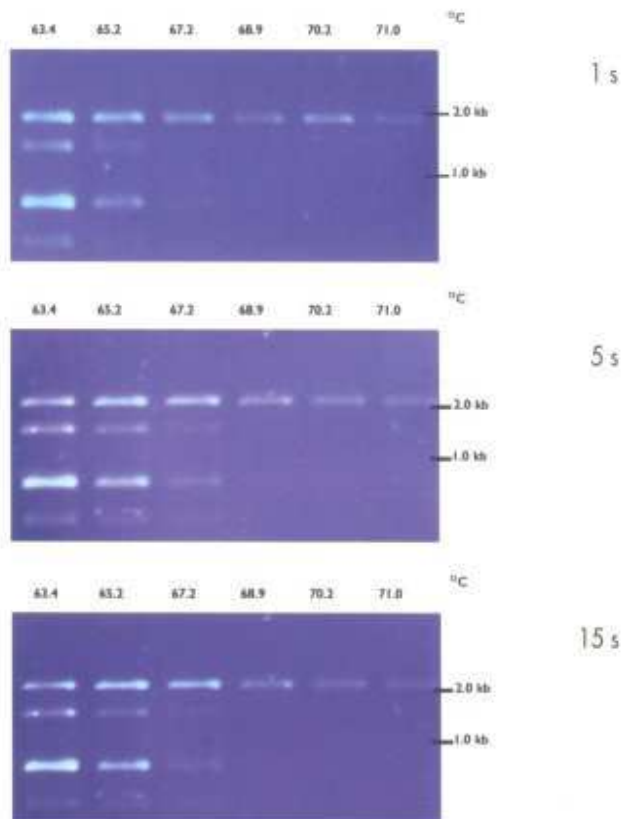


## V. Effets de la température sur la phase d'hybridation des amorces



Influence de la température d'hybridation sur les résultats (dénaturation 93°C; 15s, hybridation 15s, 5 unités de Taq polymérase)

Influence de la durée sur la température d'hybridation, protocole : dénaturation 93°C; 15s, hybridation 1 à 15 s, 5 unités de Taq polymérase, élongation à température et durée constante.



Apodis Technologie  
Mise à jour mai 2017



Métrieologie thermique PCR et qPCR



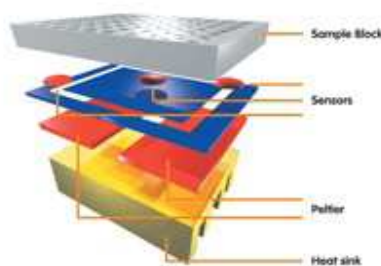


## VI. Pourquoi les thermocycleurs ne sont pas toujours précis et uniformes

Un thermocycleur est plus compliqué que les utilisateurs ne l'imaginent. On peut donc le diviser schématiquement en deux parties :

- Une partie programmation, régulation de puissance et mesure
- Une partie bloc réactionnel

Le bloc lui-même est un assemblage de différentes parties : le bloc, les capteurs, les modules Peltier, les éléments chauffants, les joints ..., toutes ces couches sont empilées les unes sur les autres



et forment une construction sandwich.

Des pièces ou des couches sont utilisées pour compenser les différences de dilatation et les expansions causées par la large gamme de température.

### **Le bloc**

Le bloc peut avoir des surfaces défectueuses ou des différences de surfaçage dues à l'usinage. Il peut y avoir des différences d'angle de contact avec les tubes provoquant des défauts d'uniformité et de précision.

### **Les capteurs de température**

Il y a différents types de capteurs utilisés dans les cyclers (thermocouples, RTD, thermistors etc... ). Ils présentent tous des imprécisions différentes. Les capteurs mal positionnés peuvent casser, ils peuvent avoir un mauvais angle de contact, ils peuvent être sensibles à une condensation de liquides.

### **Les éléments Peltier**

Chaque module Peltier consiste en 50 à 100 modules individuels qui génèrent de la chaleur ou du froid. Ils ne génèrent pas tous la même quantité de chaleur; Cela peut conduire à des spots chauds ou froids dans un module quelquefois des sections complètes sont défectueuses, le cycler n'est pas capable de reconnaître se type de problème. Des hauteurs de modules Peltier différentes peuvent occasionner des mauvais contacts thermiques et des différences de dilatation.

### **Les éléments chauffants**

Les éléments chauffants peuvent ne pas chauffer uniformément, le contact de l'élément avec le bloc n'est quelquefois pas uniforme. Les éléments chauffants aussi bien que les modules Peltier et les



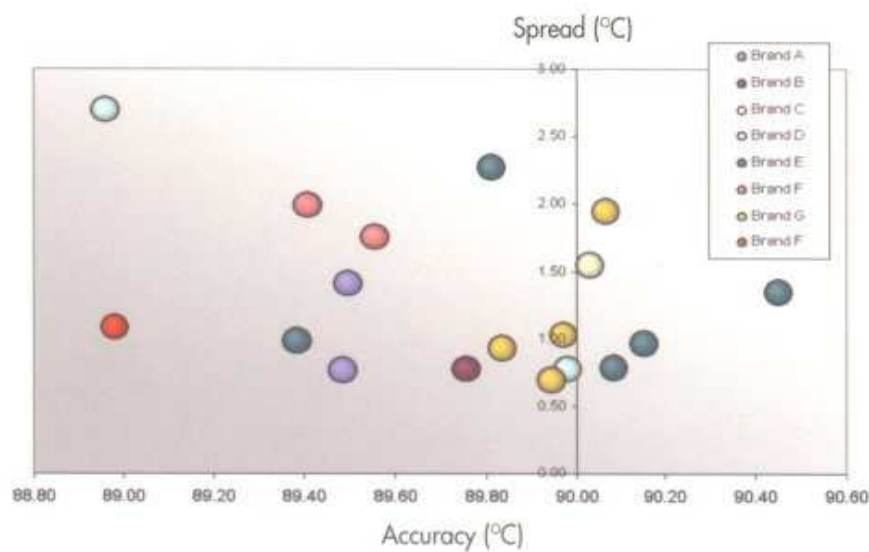
capteurs sont sensibles à la présence de liquide (condensation pendant la phase de refroidissement)





## VII. Diminution des performances dans le temps

Les composants comme les éléments chauffants, les éléments Peltier, les capteurs, les pièces mécaniques sont sensibles à l'usure. Cette usure n'est pas toujours uniforme et similaire pour tous les composants.



Résultats de valeurs moyennes de mesures multiples sur différentes marques de Cyclers, chaque point représente une marque ou un modèle de Cycler.

Nous proposons des solutions pour la majorité des instruments de PCR point final et de qPCR

Nous traitons tous les formats de blocs, de 24 à 384 puits; en PCR quantitative nous traitons les appareils fermés comme : Applied 7300; 7500; 7900; StepOnePlus; SetpOne; Stratagene MX3000P; MX3005P; Roche LightCycler capillaire; Bio-Rad CFX 96 ; LC480 , Rotorgene .....