

		<b>Medisinsk serviceklinikk</b>		<b>Prosedyre</b>
<b>Sanntids PCR - Generell metodeprosedyre - Medisinsk mikrobiologi, SSK</b>				Side 1 av 10
Dokumentplassering: <b>II.MSK.MedMik.2.C.4.a-11</b>	Godkjent dato: <b>25.04.2023</b>	Gyldig til: <b>25.04.2025</b>	Dato endret: <b>21.08.2024</b>	Revisjon: <b>16.06</b>

Medisinsk serviceklinikk/Avd. for medisinsk mikrobiologi SSK/Pasienter/brukere/Inf.imm\_enhet/Molekylærbiologi


DISTRIBUSJONSliste: EK

ENDRINGER FRA FORRIGE VERSJON: Fjernet bruk av MedLabQC til overvåking av kontroller. La inn bruk av Takyon blue.

<b>Hensikt/IVDR</b>	<p>Prosedyre har overordnet informasjon for alle PCR-analyser som utføres ved Enhet for infeksjonsimmunologi/PCR, Avdeling for medisinsk mikrobiologi, Sørlandet sykehus HF, Kristiansand, unntatt analyser som blir analysert på Cobas 4800.</p> <p>Egenproduserte metoder (merket in-house) skal samsvare med IVD-regulativet (EU 2017/746, artikkel 5 (5)). Metodene er kvalitative og kan kun benyttes i egen avdeling.  <a href="#">IVDR: Samsvar med generelle krav i EU 2017/746 (IVDR), Artikkel 5.5 (overgangsordning) for molekylære analyser, Medisinsk mikrobiologi, SSK</a></p> <p>PCR-oppsett for påvisning av DNA/RNA med egenprodusert IVD -utstyr (In house unntaket) som bruker Taqman enzymet; LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes;</p> <p><a href="#">Sanntids PCR - MRSA - (IVDR ref M04-IH) - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>  <a href="#">Sanntids PCR - M. genitalium- In house (IVDR ref M11-IH). - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>  <a href="#">Sanntids PCR - EHEC - In house (IVDR ref M12-IH) - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>  <a href="#">Sanntids PCR- Clostridioides difficile toksin A/B - In-house (IVDR ref M13-IH)- Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>  <a href="#">Sanntids PCR - Borrelia burgdorferi gruppen- In house (IVDR ref M15-IH)- Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>  <a href="#">Sanntids PCR - Pneumocystis jiroveci - In house (IVDR ref M20-IH) - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>  <a href="#">Sanntids PCR - Påvisning og artsbestemmelse av dermatofytter- In house (IVDR ref M14-IH)- Medisinsk mikrobiologi SSK</a>  <a href="#">Sanntids PCR - Utvidet flåttbåren PCR diagnostikk- In house- Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>  <a href="#">Sanntids PCR - Herpes Simplex Virus- In house (IVDR ref M10-IH) - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>  <a href="#">Sanntids PCR - Varicella Zoster Virus- In house (IVDR ref M09-IH) - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>  <a href="#">Sanntids PCR - blaCIT og blaDHA - in house - Medisinsk mikrobiologi SSK</a>  <a href="#">Sanntids PCR- MS2 DNA kontroll- In-house- Medisinsk mikrobiologi, SSK</a></p> <p>PCR-oppsett for påvisning av DNA med egenprodusert IVD -utstyr (In house unntaket) som bruker Taqman enzymet; Takyon no rox probe Mastermix:</p> <p><a href="#">Sanntids PCR - B. pertussis- In house (IVDR ref M03-IH) - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>  <a href="#">Sanntids PCR - C. pneumoniae- In house (IVDR ref M02-IH) - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>  <a href="#">Sanntids PCR - M. pneumoniae- In house (IVDR ref M01-IH) - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a></p> <p>PCR-oppsett for påvisning av RNA med egenprodusert IVD -utstyr (In house unntaket). 1-step PCR som bruker qScript Virus 1-step ToughMix:</p> <p><a href="#">Sanntids dupleks PCR - Influenza A/B- In house (IVDR ref M07-IH) - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>  <a href="#">Sanntids PCR - Humant metapneumovirus - In house (IVDR ref M08-IH) - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>  <a href="#">Sanntids PCR - Respiratorisk syncytialt virus (RSV A og B) - In house (IVDR ref M06-IH) - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>  <a href="#">Sanntids PCR - Parainfluenzavirus - In house (IVDR ref M05-IH) - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>  <a href="#">Sanntids PCR- Covid-19/MS2 - dupleks-In house (IVDR ref M16-IH)- Medisinsk mikrobiologi, SSK</a></p> <p>Når det gjelder analyser for påvisning av RNA med 2-step PCR skal c-DNA oppsett pipetteres etter skjema: <a href="#">cDNA syntese - Revers transkripsjon - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>          Ellers så følger PCR-oppsettet LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes.</p>
---------------------	---


DokumentID:D13619

Utarbeidet av: <b>Forsker og fagansvarlig          Hanne Quarsten</b>	Fagansvarlig: <b>Overlege Ståle Tofteland</b>	Godkjent av: <b>Avdelingssjef Sissel Francke</b>	Verifisert av: <b>24.04.2023 - Guro Furset Jensen, lege,          25.04.2023 - Kvalitetskoordinator Hilde          Strand Børresen</b>
--	--	---	---

		<b>Sanntids PCR - Generell metodeprosedyre - Medisinsk mikrobiologi, SSK</b>			<b>Side: 2</b> <b>Av: 10</b>
Dokumentplassering: II.MSK.MedMik.2.C.4.a-11	Utarbeidet av: Forsker og fagansvarlig Hanne Quarsten	Fagansvarlig: Overlege Ståle Tøfteland	Godkjent dato: 25.04.2023	Godkjent av: Avdelingssjef Sissel Francke	Revisjon: 16.06


Medisinsk serviceklinikk/Avd. for medisinsk mikrobiologi SSK/Pasienter/brukere/Inf.imm\_enhet/Molekylærbiologi

	<p>2-step PCR utføres for en analyse som kun benyttes til konfirmasjon av funn med annen metode:</p> <p><a href="#">Sanntids PCR- Enterovirus PCR -In-house, Medisinsk mikrobiologi, SSK</a></p> <p>Tilsvarende informasjon for kommersielle-PCR analyser finnes i analysens egen prosedyre.</p> <p><a href="#">Sanntids PCR - Neisseria gonorrhoeae (NG)-kommersielt- Medisinsk mikrobiologi SSK</a>  <a href="#">Sanntids PCR - Adenovirus - ModularDx kit- Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>  <a href="#">Sanntids PCR - Enterovirus - Kommersielt (Geneproof) - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>  <a href="#">Sanntids PCR - Legionella spp -kommersielt LightMix (IVDR ref M21-IH)- Medisinsk mikrobiologi SSK</a></p>	
<i>Omfang</i>	Gjelder for personalet opplært i utførelse av PCR-analyser.	
<i>Bakgrunn</i>	Real-time PCR analyser er vidt utbredt i medisinsk mikrobiologisk laboratorier for påvisning av mikrober/virus og resistensgener i kliniske prøver og isolater. Teknikken krever spesifikk kunnskap, utstyr og prosedyrer for å oppnå pålitelige resultater.	
<i>Akkreditert?</i>	Se prosedyre for hver enkelt analyse.	
<i>Analyseprinsipp</i>	Se prosedyre for hver enkelt analyse.	
<i>Ytelse</i>	Se prosedyre for hver enkelt analyse.	
<i>Sikkerhet</i>	<p>Se <a href="#">Bruk og inndeling ved PCR-laboratorium, Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>.</p> <p>Nye reagenser skal registreres i ECOonline og risikovurderes. Arbeidet kan dokumenteres i ECOonline og/eller i verifiserings/valideringsrapporten. Reagenser som tidligere er tatt i bruk er registrert/risikovalidert i dokumentet (evt ECOonline); <a href="#">Risikoanalyse av kjemiske farer i laboratoriet relatert til PCR analyser - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a></p> <p>For risiko for biologisk smitte og fare ved bruk av PCR analysereagenser. Se: <a href="#">Risikoanalyse av muligheten for biologisk smitte i laboratoriearbeid relatert til PCR analyser - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a></p>	
<i>Prøvemateriale/ lokalisasjon</i> <i>Koder for:</i>	Henviser til Laborariehåndboka SSHF. Se også <a href="#">Tilbud til inneliggende pasienter for prøver til PCR - Medisinsk mikrobiologi, SSHF</a>	
<i>Undersøkelser</i>	Ikke aktuelt	
<i>Forsendelse</i>	<p>Informasjon for rekvirenter angående oppbevaring, forsendelse og holdbarhet er oppgitt i laborariehåndboken.</p> <p>Se også <a href="#">Forsendelse av laboratorieprøver til SSHF, Laboratievirksomheten SSHF</a></p>	
<i>Oppbevaring og prøvepreparering</i>	<p>Penselprøver og prøver til dermatofytt-PCR oppbevares på benk før analyse.</p> <p>Ekspektorat, blodprøver spinalvæske og annet prøvemateriale på sterile beholdere oppbevares i kjøleskap ved overnatt/evnt over helg. Prøver til Borrelia-PCR: Biopsier og spinalvæsker oppbevares i -70°C og leddvæske i -20°C.</p> <p>Prøvepreparering:  <a href="#">MagNA Pure 96 DNA and Viral SV Kit - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a></p>	
<i>Utstyr, kalibrering, backup</i>	MagNA Pure 96	LightCycler kapillærrørholder
	Pipeteringsinstrument PSH, PSU	LightCycler- kapillærrørsentrifuge
	LightCycler 2.0, 480 + CobasZ	LightCycler kjøleblokk

 SØRLANDET SYKEHUS	<b>Sanntids PCR - Generell metodeprosedyre - Medisinsk mikrobiologi, SSK</b>				Side: 3
					Av: 10
Dokumentplassering: II.MSK.MedMik.2.C.4.a-11	Utarbeidet av: Forsker og fagansvarlig Hanne Quarsten	Fagansvarlig: Overlege Ståle Tofteland	Godkjent dato: 25.04.2023	Godkjent av: Avdelingssjef Sissel Francke	Revisjon: 16.06


Medisinsk serviceklinikk/Avd. for medisinsk mikrobiologi SSK/Pasienter/brukere/Inf.imm\_enhet/Molekylærbiologi

	Diverse sentrifuger	LightCycler capping tool
	Whirlmixer	Filterspisser til PCR
	Diverse pipetter	Eppendorf rør 1,5 ml
	Varmebløkk	FLOW rør 2 ml
	Tissue Lyzer	Diverse Pcr-brett
	Backup: Backup av rådata fra PCR og ekstraksjonsinstrumentene utføres månedlig av fagbioingeniør. Filene lagres i mappen "Back up" under avdeling for Medisinsk Mikrobiologi på fellesserveren "O". Førings for utført "Backup" gjøres på skjemaet <a href="#">Loggark - backup.Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>	
<i>Interferens/kryss-reaksjoner og andre feilkilder</i>	Se prosedyre for hver enkelt analyse.	
<i>Reagenser, medier, substrater</i>	LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes (Cat. nr. 12 239 272 001, Roche Diagnostic), -20°C 1a - LightCycler-FastStart Enzyme 1b - LightCycler-FastStart Reaction Mix Hybridization Probes 2 - MgCl <sub>2</sub> (25 mM) stock solution 3 - H <sub>2</sub> O  Takyon no rox probe Mastermix (UF-NPMT-C0701, Eurogentec), i -70°C før bruk og deretter i -20°C.  qScript Virus 1-step ToughMix (Cat.nr. 95131-02K, Quantabio), i -70°C før bruk og deretter i -20°C.  Uracil-N-Glycosylase– UNG (Cat .nr. RT-0610-15, Eurogentec), -20°C  qScript, Revers Transkriptase, (Cat. nr. 95047-500, Quanta), -20°C (kun for cDNA syntese for in-house Enterovirus PCR)  Takyon™ BLUE Additive (UF-BLUE-ADD, Eurogentec), -20°C  Lot. nr. og holdbarhet føres i Access ark; Kitversjoner-PCR; som ligger under mappen O:\Medisinsk serviceklinikk\Avd for med.mikrobio. SSK\Kssystem\GRUPPE_4  Rengjøringsmidler: DNA Away og RNase Away (Cat. 7010 og 7005, Molecular BioProducts), Romtemperatur.  Primer og probe til inhouse-pcr: <a href="#">Sanntids PCR - Primer og probesekvenser PCR, Medisinsk mikrobiologi SSK</a> Lot. nr. og holdbarhet føres i Excel ark, Primer, probemiks, lot nr; ligger under mappen O:\Medisinsk serviceklinikk\Avd for med.mikrobio. SSK\PCR	

		<b>Sanntids PCR - Generell metodeprosedyre - Medisinsk mikrobiologi, SSK</b>			<b>Side: 4</b> <b>Av: 10</b>
Dokumentplassering: II.MSK.MedMik.2.C.4.a-11	Utarbeidet av: Forsker og fagansvarlig Hanne Quarsten	Fagansvarlig: Overlege Ståle Tofteland	Godkjent dato: 25.04.2023	Godkjent av: Avdelingssjef Sissel Francke	Revisjon: 16.06


Medisinsk serviceklinikk/Avd. for medisinsk mikrobiologi SSK/Pasienter/brukere/Inf.imm\_enhet/Molekylærbiologi

<i>Bestilling og mottak av varer til PCR</i>	Fagbioingeniør er ansvarlig for bestillinger og mottak av reagenser og PCR rekvisita. PCR personalet er ansvarlig for å varsle fagbioingeniør når ny bestilling av reagenser eller rekvisita er nødvendig. For primere og prober brukes <a href="#">Skjema - Varsel om bestilling av primer og probe</a> . Bestillingen må effektueres minimum 1 mnd. før løsningen tar slutt. Fagbioingeniør er ansvarlig for at bestillingen blir gjennomført. Se for øvrig <a href="#">Bestilling, mottak, oppbevaring og ibruktakelse av varer, Medisinsk mikrobiologi SSK</a>
<i>Prøvemottak/innlappning</i>	Er beskrevet i: <a href="#">Mottak av prøver til PCR, Medisinsk mikrobiologi, SSK</a> . Standardkommentarer for manglende indikasjon for analysering, feilbruk av transportmedium, rekvisisjoner og lignende: <a href="#">Oversikt over fritekster for PCR analysene - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>
<i>Sendep prøver</i>	<a href="#">Sendep prøver, Avdeling for medisinsk mikrobiologi SSHF</a>
<i>Kontrollmateriale</i>	Positive PCR kontroller: Se <a href="#">Sanntids PCR - Oversikt over PCR kontroller, Medisinsk mikrobiologi SSK</a>
<i>Interne kvalitetskontroller</i>	<p><u>Positive og negative oppsettskontroller for amplifikasjon/deteksjon:</u>  Som <u>positiv oppsettskontroll</u> for amplifikasjonene benyttes i hovedsak stammer fra anerkjente leverandører som for eksempel ATCC, Vircell eller lignende. Se <a href="#">Sanntids PCR - Oversikt over PCR kontroller, Medisinsk mikrobiologi SSK</a>. Hvis stammer ikke kan skaffes fra nevnte leverandører brukes kjente positive prøver fra anerkjente SLP leverandører. Kontrollene fortynnes og porsjoneres. Se <a href="#">Etablering og bruk av positiv kontroll, molekylærbiologi - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>  I <u>negativ oppsettskontroll</u> (videre kalt <u>negativ kontroll</u>) brukes nukleasefritt vann.</p> <p><u>Intern hemmerkontroll (Lambda eller MS2 DNA):</u>  Hvert prøvemateriale blir kontrollert for hemmeraktivitet ved undersøkelse av Lambda DNA eller MS2 DNA. Det blir tilsatt lambda eller MS2 DNA til hver prøve før ekstraksjon.</p> <p>Følgende analyser påviser hemmerkontroller:  MS2 DNA  Borrelia sp. (16S rRna) – Lambda DNA  Pan Derm – Lambda DNA  SARS-COV2/MS2  Osp/Neo/MS2 (inngår i utvidet flåttbåren diagnostikk)</p> <p><u>Positiv ekstraksjonskontroll:</u>  Stamme ATCC 8467, <i>Bordetella pertussis</i>, benyttes som positiv ekstraksjonskontroll. Det er en bakterie med cellevegg som fungerer som en indikator for en vellykket lyserings- og ekstraksjonsprosess. Tilsett BSA til 7%, til et nytt fortynnet rør med <i>Bordetella pertussis</i> (ATCC 8467), før bruk som positiv ekstraksjonskontroll.  Unntak: Lysering ved kokemetode av kolonier fra skål.</p> <p><u>Alle kontrollene er underlagt overvåking i Miclis Instrument.</u>  Unntak Lysering ved kokemetode.</p>
<i>Ekstern kvalitetskontroll</i>	Årlig deltakelse i planlagte kommersielle SLP programmer for samtlige analyser. Se oversikt for <a href="#">EKV - datoer for utsendelse, Medisinsk mikrobiologi SSHF</a>

		<b>Sanntids PCR - Generell metodeprosedyre - Medisinsk mikrobiologi, SSK</b>			Side: 5 Av: 10
Dokumentplassering: II.MSK.MedMik.2.C.4.a-11	Utarbeidet av: Forsker og fagansvarlig Hanne Quarsten	Fagansvarlig: Overlege Ståle Tofteland	Godkjent dato: 25.04.2023	Godkjent av: Avdelingssjef Sissel Francke	Revisjon: 16.06


Medisinsk serviceklinikk/Avd. for medisinsk mikrobiologi SSK/Pasienter/brukere/Inf.imm\_enhet/Molekylærbiologi

<b>Spørbarhet</b>	<p><u>Manuel pipettering:</u>          Operatøren som har lagd PCR miksen, tilsatt eluat og kontrollert, signerer på merkelapp som påføres <a href="#">pipetteringskartet</a> eller tilsvarende (arbeidsliste). Dersom flere operatører er involvert i utførelsen må samtlige signere og ev. beskrive hvem som har gjort hva. Eks: JHL/HAQ.          Merkelapp:          Operatøren          protokoll og          filnavnet.</p> <div style="border: 1px solid black; border-radius: 10px; padding: 5px; display: inline-block;">         Dato: _____ Sign: _____          Primermiks: _____          Tilsetting, eluat: _____       </div> <p>som registrerer prøvedata, velger PCR starter kjøringen signerer etter datoen i Eks: 301013 JHL.</p> <p><u>FLOW Solution:</u>          Operatører signerer på <a href="#">Loggark - Signaturliste FLOW Solution - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>.</p> <p>Operatøren som utfører teknisk validering av rådata signerer i Miclis Instrument når Ct-verdiene til kontrollene registreres.          Operatøren som legger inn resultatene i Miclis signerer på resultatlisten.          Operatøren som kontrollerer signerer på resultatlisten.</p>
<b>Utførelse Flow-løsning</b>	<p>Ved bruk av automatisk pipettering; FLOW. Se under og i <a href="#">Utstysveileder - FLOW Solution - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>  <u>Analyser som kan automatisk pipetteres i FLOW Solution:</u> <i>C. pneumoniae</i>, <i>M. pneumoniae</i>, <i>B. pertussis</i>, influensavirus A/B, respiratorisk syncytialt virus (RSV A og B), Sars-Cov2, humant metapneumovirus, parainfluenzavirus, Herpes simplex virus I/II (duplikat) og Varicella zoster virus (duplikat) og påvisning av intern hemmer/amplifikasjonskontroll.</p>
<b>RNA/DNA ekstraksjon</b>	<p><u>Utføres på prøveprepareringsrom:</u>  <u>Nukleinsyre isolering:</u> Se de enkelte analyseprosedyrene og metode for: <a href="#">MagNA Pure 96 DNA and Viral SV Kit - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a></p>
<b>Tilblanding av primere og prober</b>	<p><u>Preparering av primere og probe:</u>          Primere og prober mottas vanligvis frysetørret fra produsent:          Se <a href="#">Tilblanding av primer og probe, Medisinsk mikrobiologi SSK</a></p>
<b>Tillaging av primer/probemiks</b>	<p><u>Preparering av primermiks:</u>          Se <a href="#">Fremstilling av egenproduserte PCR-analysereagens - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>          Lot nr. på kitet som tas i bruk føres i Excel arket, Primer, probemiks, lot nr.</p>
<b>PCR- analyse</b>	<p>PCR analyser for alle agens kan utføres manuelt etter prosedyre.</p> <p>Spinalvæske og leddvæske settes opp i duplikat i PCR oppsettene, unntatt for Enterovirus-PCR.</p> <p>Ta ut aktuelle <u>lister</u> i Miclis. Enkeltvis eller i grupper:          EN: Enterovirus          1A: Adenovirus.</p>

		<b>Sanntids PCR - Generell metodeprosedyre - Medisinsk mikrobiologi, SSK</b>			<b>Side: 6</b> <b>Av: 10</b>
Dokumentplassering: II.MSK.MedMik.2.C.4.a-11	Utarbeidet av: Forsker og fagansvarlig Hanne Quarsten	Fagansvarlig: Overlege Ståle Tøfteland	Godkjent dato: 25.04.2023	Godkjent av: Avdelingssjef Sissel Francke	Revisjon: 16.06


Medisinsk serviceklinikk/Avd. for medisinsk mikrobiologi SSK/Pasienter/brukere/Inf.imm\_enhet/Molekylærbiologi

<p><i>Preparering av standard PCR-oppsett</i></p>	<p>AP: Clostridioides difficile toksin A/B, EHEC, Pneumocystis jirovecii, Neisseria gonorrhoeae, MRSA, ESBLM-C bla<sub>CIT</sub>/ bla<sub>DHA</sub>.</p> <p>2A: Flåttbårne bakterier.</p> <p>LV: Legionella</p> <p><u>Preparering av standard PCR-miks utføres i plastkabinett på PCR rom.</u></p> <p>Fra fryser tas det ut enzym. Enzymløsningene tines like før bruk.</p> <p>I tilfelle det brukes; Light Cycler FastStart DNA Master Hybridization Probes;</p> <p>Ta opp rør merket 1a og 1b fra Light Cycler FastStart DNA Master Hybridization Probes kit (Cat. nr. 12 239 272 001, Roche Diagnostic). Sentrifuger begge rør i ca. 15 sekunder i bordsentrifuge. Pipetter 60 µl fra rør 1b over i rør 1a. Pipetter opp og ned 10 ganger. Rør skal IKKE vortex-mikses. Sentrifuger rør i ca. 15 sekunder. Enzym Mix er klar til bruk.</p> <p>Fra kjøleskap/fryser tas det ut et rør med PCR-analysereagens ("Primermiks") som er en blanding av primere, probe og nukleasefritt vann.</p> <p>Beregn antall analyser som skal utføres. Lag <a href="#">pipetteringskart</a> ved behov.</p> <p>Husk positiv kontroll, og negativ kontroll (nukleasefritt vann).</p> <p>Lag en PCR-miks ut i fra hvor mange brønner/kapillærrør som er med i oppsettet. Bruk et tomt Eppendorfrør. Følg pipetterings-tabeller for egenproduserte DNA-baserte analyser. Enzymet, som blir tilsatt, blandes med pipetten. IKKE bland på whirlmixer!</p> <p>Sentrifuger i ca. 10 sekunder.</p> <p>Fordel 15 µl PCR-miks per brønn/kapillærrør. Unntak for MRSA (se egen prosedyre).</p>
<p><i>Pipetteringstabell</i></p> <p><i>Gjelder ikke for Adenovirus, MRSA og kommersielle kit</i></p>	<p>LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes :<a href="#">Pipetteringsskjema LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes , Medisinsk mikrobiologi, SSK</a></p> <p>Takyon no rox probe Mastermix:<a href="#">Pipetteringsskjema Takyon No Rox MasterMix, Medisinsk mikrobiologi SSK</a></p> <p>qScript Virus 1-step ToughMix: <a href="#">Pipetteringsskjema qScript Virus 1-step ToughMix , Medisinsk mikrobiologi, SSK.</a></p>
<p><i>Utførelse forts.</i></p>	<p>Gjelder <u>manuell pipettering</u>: Ta med PCR plate/kjøleblokk ut av plastkabinett til arbeidsbenk ved siden av. Fra hvert rør av det ferdig preparerte prøvemateriale og positiv kontroller tas det ut 5 µl eluat (10 µl for <i>M. genitalium</i> eluat, 2 µl av MRSA-eluat) som tilsettes brønnene/kapillærene. Deretter tilsettes 5 (evt10 eller 2) µl nukleasefritt vann til negativ kontroll. Vann tas fra rør merket "3" i kjøleskap på PCR rom.</p> <p>Sluttvolumet vil da være 20 µl (25 µl for <i>M. genitalium</i> PCR). PCR platen/kapillærrørene forsegles med film eller kork og sentrifugeres.</p> <p>Kapillærrørene plasseres i LightCycler-prøving og trykkes forsiktig ned med en finger før de sentrifugeres i kapillærrørssentrifugen. PCR platen/kapillærrørene settes i PCR-instrumentene.</p> <p>Se "Veileder – LightCycler" for oppstart og generell betjening.</p>

 SØRLANDET SYKEHUS	<b>Sanntids PCR - Generell metodeprosedyre - Medisinsk mikrobiologi, SSK</b>				Side: 7 Av: 10
	Dokumentplassering: II.MSK.MedMik.2.C.4.a-11	Utarbeidet av: Forsker og fagansvarlig Hanne Quarsten	Fagansvarlig: Overlege Ståle Tøfteland	Godkjent dato: 25.04.2023	Godkjent av: Avdelingssjef Sissel Francke

Medisinsk serviceklinikk/Avd. for medisinsk mikrobiologi SSK/Pasienter/brukere/Inf.imm\_enhet/Molekylærbiologi

<i>PCR-mikser til Flow-løsning</i>	<p>Se <a href="#">Oversikt over PCR analyser og hvilke PCR instrument som kan benyttes</a></p> <p><b>FLOW Solution:</b>          Lag mengde PCR-miks ut i fra opplysninger fra PSU.          Preparering av PCR-miks: Se pipetteringstabeller over.          Tilsatt enzymet og bland med pipetten. IKKE bland på whirlmixer!          Sentrifuger miksen i ca. 10 sekunder og sett inn i PSU.</p> <p>På forhand blir det tilsatt Takyon™ BLUE Additive til FastStart Enzyme som blir preparert som beskrevet i <a href="#">Preparering av standard PCR-miks utføres i plastkabinett</a>, over.          Til 7 ferdig blandete rør tilsettes det 7,5 µl Takyon™ BLUE Additive.          Det blir tilsatt 25 µl Takyon™ BLUE Additive til 7,5 ml Takyon no rox probe Mastermix.</p> <p><b>Generelt:</b>          Plater med PCR miks må ikke oppbevares lenger enn en time (4°C/rt) før tilsetting av prøver (eluat).          Plater med PCR miks og prøve (eluat) må ikke oppbevares lenger enn en halv time (4°C) før amplifikasjon.</p>
<i>Håndtering av PCR-instrumenter</i>	<p>Håndtering av PCR instrumenter:          For LightCycler 2.0: Se <a href="#">utstysveileder for LightCycler 2.0</a>.          For LightCycler 480: Se <a href="#">utstysveileder for LightCycler 480</a>.</p>
<i>PCR-program</i>	<p><a href="#">PCR-program, Medisinsk mikrobiologi, SSK</a></p>
<i>Makroer til Flow</i>	<p>Makro (til FLOW Solution på LightCycler 480I/II):          Taqman1: PCR programmet er det samme som LightCycler 480: TaqMan Standard.          Macro HSV VZV: PCR programmet er det samme som LightCycler 480: HSV_VZV.          Macro cc piv 1-4 toughmix: PCR programmet er det samme som LightCycler 480: Virus 1-Step Tough Mix.</p>
<i>Avlesning</i>	<p>Ikke relevant.</p>
<i>Resultatberegning</i>	<p>Ikke relevant.</p>
<i>Evaluering av resultat/Vurdering av kontroller</i>	<p>Vurdering av hvilken kanal som skal avleses for de ulike analyser:  <a href="#">Oversikt over fargefilter/kanaler på sanntids PCR instrumentene</a>.</p> <p><b>Evaluering av resultat</b>  <b>Positivt resultat:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Betydelig (eksponentiell) økning av fluorescenssignalet i forhold til negative kontroll.</li> <li>Signal skal være over Ct 10. Ct &lt; 10 må anses som falsk resultat, som for eksempel kan være forårsaket av inntørking av væske i brønnen eller liknende. Prøven må derfor undersøkes på nytt. Det forventes ikke at slike funn kan repeteres.</li> <li>Signalet må være Ct ≤ 38. Hvis signalet er Ct &gt; 38 må prøven repeteres i duplikat. Kommer signalet opp i begge eller en av duplikatprøvene i andre kjøring (også Ct &gt; 38) blir svaret positivt. Unntak Borrelia PCR, se <a href="#">Sanntids PCR - Svartutiner for hver enkelt prosedyre - Medisinsk mikrobiologi SSK</a>.</li> </ul> <p>Kjøres prøvene i duplikat i første kjøring (Eks FLOW HSV og VZV) og det blir +/- resultat så kjøres prøven om i duplikat. Ved en eller to positive resultater i andre kjøring så blir svaret positivt.</p>

 SØRLANDET SYKEHUS	<b>Sanntids PCR - Generell metodeprosedyre - Medisinsk mikrobiologi, SSK</b>				<b>Side: 8</b> <b>Av: 10</b>
Dokumentplassering: II.MSK.MedMik.2.C.4.a-11	Utarbeidet av: Forsker og fagansvarlig Hanne Quarsten	Fagansvarlig: Overlege Ståle Tofteland	Godkjent dato: 25.04.2023	Godkjent av: Avdelingssjef Sissel Francke	Revisjon: 16.06

Medisinsk serviceklinikk/Avd. for medisinsk mikrobiologi SSK/Pasienter/brukere/Inf.imm\_enhet/Molekylærbiologi

- Alle negative kontroller må være godkjent.

Negativt resultat:

- Ingen (eksponentiell) økning av fluorescenssignalet i forhold til negativ kontroll eller hvis signalet kommer etter Ct > 38, og prøven er repetert i duplikat og signalet kommer ikke opp i begge duplikat prøvene.
- Positiv oppsettskontroll for amplifikasjon/deteksjon er positiv og innenfor grenseverdiene (Westgaards regler).
- Intern hemmerkontroll og positive ekstraksjonskontroll må være positiv og innenfor grenseverdiene.

Ikke avlesbar, ny prøve anbefales:

Intern hemmerkontrollen er negativ eller utenfor grenseverdiene også etter gjentatt kjøring.

Dersom det kjøres PCR på et prøvemateriale som analysen ikke er validert for, skal det settes inn fritekst til funn slik at svaret gis ut med forbehold.

Se: [Oversikt over fritekster for PCR analysene - Medisinsk mikrobiologi, SSK](#)

Vurdering av kontroller:

Positiv oppsettskontroll for amplifikasjon/deteksjon: Skal vise positivt resultat. Ct verdien noteres i programmet Miclis Instrument for overvåking.

Se [Bruk av Mlx Instrument for interne kontroller, Medisinsk mikrobiologi SSK](#)

Regler for godkjenning av oppsett:

Aksjonsgrense:

Oppsettet godkjennes ikke dersom Ct verdien faller utenfor 3 standardavvik. Avvik skrives eller dokumenteres i kontrollprogrammet.

Oppsettet godkjennes ikke dersom Ct verdien faller mellom 2 og 3 standardavvik tre gjentatte ganger. Avvik skrives eller dokumenteres i kontrollprogrammet.

Vurder tillaging av ny lot. med positiv kontroll.

Alarmgrense:

Dersom Ct verdien faller mellom 2 og 3 standardavvik to gjentatte ganger byttes positiv kontroll (samme lot.).

Negativ kontroll: skal vise negativt resultat.


Intern hemmerkontroll (Lambda eller MS2 DNA): skal vise positivt resultat, og ved ett forsinket positivt resultat bør det evalueres om prøven kan godkjennes. Dette vurderes ved sammenlikning med signalet på andre prøver. Avvik på mer enn 3Ct fra normalfordeling til andre prøver er ikke godkjent.

Dersom resultatet av intern hemmerkontroll DNA er negativt eller forsinket utover nevnte krav skal prøven ekstraheres og analyseres på nytt.

Unntak: Målgen viser positivt resultat.

Positiv ekstraksjonskontroll: Skal vise positivt resultat. Ct verdien noteres i Miclis Instrument for overvåking. Samme regler for godkjenning og aksjonsgrenser enn ved positiv oppsettskontroll for amplifikasjon/deteksjon, nevnt over.



		<b>Sanntids PCR - Generell metodeprosedyre - Medisinsk mikrobiologi, SSK</b>			<b>Side: 9</b> <b>Av: 10</b>
Dokumentplassering: II.MSK.MedMik.2.C.4.a-11	Utarbeidet av: Forsker og fagansvarlig Hanne Quarsten	Fagansvarlig: Overlege Ståle Tøfteland	Godkjent dato: 25.04.2023	Godkjent av: Avdelingssjef Sissel Francke	Revisjon: 16.06


Medisinsk serviceklinikk/Avd. for medisinsk mikrobiologi SSK/Pasienter/brukere/Inf.imm\_enhet/Molekylærbiologi

	<p>Dersom resultatet av ekstraksjonskontroll ikke blir godkjent skal prøven ekstraheres og analyseres på nytt.  <b>Unntak:</b> Målgen viser positivt resultat.</p>
<i>Usikkerhet</i>	Se <a href="#">Generelt usikkerhetsbidrag, sanntids PCR - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>
<i>Miclis</i>	<p>Se <a href="#">Utsvaring og autovalidering av prøvesvar i Miclis MLX, Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>.</p> <p>I tillegg til normal svrapporering tillates det direkte telefonsvar for enkelte hastepøver i spesielle situasjoner. Utføres vanligvis av legespesialister/leger i spesialisering. Se <a href="#">Dokumentasjon av utgivelse av telefonsvar - Medisinsk mikrobiologi SSK</a></p>
<i>Svartutiner</i>	Se <a href="#">Sanntids PCR - Svartutiner for hver enkelt prosedyre - Medisinsk mikrobiologi SSK</a>
<i>Feilkilder</i>	<p>Forurensing under isolering eller oppsettet kan forekomme. Hemmere i prøvematerialet. Prøvemateriale som inneholder fluorescein eller lignende (øyeprøver). Dersom PCR miks tilsatt eluat står for lenge før analysering kan falske positive resultater oppstå. Fordamping av PCR miks som skyldes dårlig forsegling kan gi unormale kurver.</p>
<i>Varsling</i>	Se prosedyre for hver enkelt analyse.
<i>Avfallshåndtering</i>	<p>Kapillærrør og PCR-brettene som skal kastes kan inneholde millioner av DNA kopier. Kapillærrørene eller brettene legges i en pose som knyttes før den havner i smitteavfallskassen. Filmen eller lokkene på platene må ikke fjernes etter amplifisering. <a href="#">Avfallshåndtering, oppbevaring og tømning - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a></p>
<i>Godkjenning for utførelse av metoden</i>	<p>Krav i kompetanseportalen må være oppfylt.</p> <p>Operatørene som skal utføre denne metoden selvstendig må kjenne til de delene av prosedyren som medfører smittefare og ha innarbeidet et sikkert smittevern under utførelsen.</p> <p>Operatørene må også kunne håndtere arbeid med små volumer.</p>
<i>Validering/ dokumentasjon/ referanser</i>	<ol style="list-style-type: none"> <li>LightCycler Operator´s Manual. Roche Molecular Biochemicals. LightCycler 1.2, 2.0, 480, 480II. <a href="#">Gyldige brukerveiledninger og utstyrsansvarlige ved Avd. for medisinsk mikrobiologi, SSK</a>.</li> <li>LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probe Instruction Protocol. <a href="#">Siste versjon</a>.</li> <li>Takyon no rox probe Mastermix Instruction Protocol. <a href="#">Siste versjon</a>.</li> <li>qScript Virus 1-step ToughMix Instruction Protocol. <a href="#">Siste versjon</a>.</li> </ol>

## Kryssreferanser

[II.MSK.FEL.LAB FEL.LAB DATA.2-2](#)  
[II.MSK.FEL.LAB FEL.MMIK FEL.6-3](#)  
[II.MSK.FEL.LAB FEL.MMIK FEL.7-3](#)  
[II.MSK.MedMik.2.A-1](#)  
[II.MSK.MedMik.2.A-3](#)  
[II.MSK.MedMik.2.A-5](#)  
[II.MSK.MedMik.2.B-12](#)

[Utsvaring og autovalidering av prøvesvar i Miclis MLX, Medisinsk mikrobiologi, SSK](#)  
[Sammenlignende laboratorieprøving - datoer for utsendelse, Medisinsk mikrobiologi, SSHF](#)  
[Dokumentasjon av utgivelse av telefonsvar - Medisinsk mikrobiologi, SSK](#)  
[Oppbevaring av prøver før forsendelse - Medisinsk mikrobiologi SSHF](#)  
[Tilbud til inneliggende pasienter for prøver til PCR - Medisinsk mikrobiologi, SSHF](#)  
[Prøvetakningsutstyr - oppslag, Medisinsk mikrobiologi SSK](#)  
[Brukerveiledning - MedLabQC, program for registrering av kit-uavhengige kontroller ved Avdeling for medisinsk mikrobiologi](#)

 <b>SØRLANDET SYKEHUS</b>	<b>Sanntids PCR - Generell metodeprosedyre - Medisinsk mikrobiologi, SSK</b>				<b>Side: 10</b> <b>Av: 10</b>
Dokumentplassering: II.MSK.MedMik.2.C.4.a-11	Utarbeidet av: Forsker og fagansvarlig Hanne Quarsten	Fagansvarlig: Overlege Ståle Tofteland	Godkjent dato: 25.04.2023	Godkjent av: Avdelingssjef Sissel Francke	Revisjon: 16.06

Medisinsk serviceklinikk/Avd. for medisinsk mikrobiologi SSK/Pasienter/brukere/Inf.imm\_enhet/Molekylærbiologi

<a href="#">II.MSK.MedMik.2.B-14</a>	<a href="#">Gyldige brukerveiledninger ved Avd. for medisinsk mikrobiologi, SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D-1</a>	<a href="#">Mottak av prøver til infeksjonsimm. enhet - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7-1</a>	<a href="#">Utstysrveileder - LightCycler 1.2 og 2.0</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7-3</a>	<a href="#">Loggark - MagNA Pure, QIAcube og backup.</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7-4</a>	<a href="#">Utstysrveileder - iCycler, Medisinsk mikrobiologi SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7-6</a>	<a href="#">Loggark for QIAamp kolonner, Medisinsk mikrobiologi SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7-7</a>	<a href="#">Utstysrveileder - LightCycler 480 - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7.a-1</a>	<a href="#">Sanntids dupleks PCR - MRSA - In house - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7.a-2</a>	<a href="#">Sanntids PCR - Herpes Simplex Virus- In house - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7.a-3</a>	<a href="#">Sanntids PCR - Varicella Zoster Virus- In house - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7.a-4</a>	<a href="#">Sanntids PCR - B. pertussis- In house - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7.a-5</a>	<a href="#">Sanntids PCR - C. pneumoniae- In house - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7.a-6</a>	<a href="#">Sanntids PCR - M. pneumoniae- In house - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7.a-7</a>	<a href="#">Sanntids PCR - Enterovirus - In house - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7.a-8</a>	<a href="#">Sanntids dupleks PCR - Influenza A/B - In house - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7.a-9</a>	<a href="#">Sanntids PCR - Humant metapneumovirus - In house - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7.a-11</a>	<a href="#">Sanntids PCR - Adenovirus - In house - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7.a-13</a>	<a href="#">Sanntids PCR - Respiratorisk syncytialt virus (RSV A og B) - In house - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7.a-14</a>	<a href="#">Sanntids PCR - Parainfluenzavirus - In house - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7.a-15</a>	<a href="#">Sanntids PCR - Norovirus GI/GII - In house, Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7.a-16</a>	<a href="#">Sanntids PCR - M. genitalium- In house - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7.a-17</a>	<a href="#">Sanntids PCR - EHEC - In house - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7.a-19</a>	<a href="#">Sanntids PCR- Clostridium difficile toksin A/B - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7.a-20</a>	<a href="#">Sanntids PCR - Borrelia burgdorferi gruppen- In house - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7.a-21</a>	<a href="#">Sanntids PCR - Pneumocystis jiroveci - In house - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7.a-23</a>	<a href="#">Sanntids PCR - Neisseria gonorrhoeae (NG)-kommersielt- Medisinsk mikrobiologi SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7.a-33</a>	<a href="#">Sanntids PCR - Svartutiner for hver enkelt prosedyre - Medisinsk mikrobiologi SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7.c-1</a>	<a href="#">Isolering - QIAamp DNA Mini Kit - QIAcube - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7.c-3</a>	<a href="#">MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7.c-4</a>	<a href="#">Isolering - QIAamp DNA Stool Mini Kit - QIAcube- Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7.c-5</a>	<a href="#">MagNA Pure 96 DNA and Viral SV Kit - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7.d-1</a>	<a href="#">Tilblanding av primer og probe, Medisinsk mikrobiologi SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7.d-2</a>	<a href="#">cDNA syntese - Revers transkripsjon - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7.d-3</a>	<a href="#">Preparering av PCR analyserreagens (primermiks) - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7.d-4</a>	<a href="#">Etablering og bruk av positiv kontroll, molekylærbiologi - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7.d-7</a>	<a href="#">Sanntids PCR - Analyseoversikt med forventet svartid, Medisinsk mikrobiologi SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7.d-8</a>	<a href="#">Sanntids PCR - Oversikt over PCR kontroller, Medisinsk mikrobiologi SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7.d-10</a>	<a href="#">Skjema - Varsel om bestilling av primer og probe</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7.d-11</a>	<a href="#">Oversikt over frittekster for PCR analysene - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7.d-12</a>	<a href="#">Oversikt over fargefilter/kanaler på sanntids PCR instrumentene</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7.d-13</a>	<a href="#">Pipetteringskart PCR</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7.d-14</a>	<a href="#">Signaturliste for PCR-prøver</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7.d-19</a>	<a href="#">Skjema - MagNA Pure 96, Dokumentasjon av ukentlig vedlikehold</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7.d-20</a>	<a href="#">Bruk og inndeling ved PCR-laboratorium, Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.2.D.7.d-28</a>	<a href="#">Loggark - Signaturliste PCR-miks FLOW Solution - Medisinsk mikrobiologi, SSK.</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.7.A-1</a>	<a href="#">Bestilling, mottak og oppbevaring av varer, Medisinsk mikrobiologi SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.10.A.2.a-1</a>	<a href="#">Risikoanalyse av kjemiske farer i laboratoriet relatert til PCR analyser - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.10.A.2.a-2</a>	<a href="#">Risikoanalyse av muligheten for biologisk smitte i laboratoriearbeid relatert til PCR analyser - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.10.A.2.a-3</a>	<a href="#">Generelt usikkerhetsbidrag, sanntids PCR - Medisinsk mikrobiologi, SSK</a>
<a href="#">II.MSK.MedMik.10.B.2-1</a>	<a href="#">Mal for metodevalidering/-verifisering - Medisinsk mikrobiologi SSHF</a>