

MagNA Pure 96 DNA and Viral SV Kit - Medisinsk mikrobiologi, SSK

Side 1 av 7

Dokumentplassering:

II.MSK.MedMik.2.C.4.b-1

Godkjent dato:

23.02.2023

Gyldig til:

23.02.2025

Dato endret:

09.09.2024

Revisjon:

8.04

Medisinsk serviceklinikk/Avd. for medisinsk mikrobiologi SSK/Pasienter/brukere/Inf.imm_enhet/Molekylærbiologi


DISTRIBUSJONSliste: EK, PCR lab 2., fæceslab (kun forpreparering av fæces).

ENDRINGER FRA FORRIGE VERSJON: ingen vesentlige endringer.

<i>Hensikt</i>	Metoden benyttes til å isolere DNA/RNA fra mikrober
<i>Omfang</i>	Personell sertifisert for arbeid på PCR-lab
<i>Bakgrunn</i>	Se Utstysveileder - MagNA Pure 96 - Medisinsk mikrobiologi, SSK
<i>Akkreditert?</i>	Se den enkelte metodeprosedyre
<i>Analyseprinsipp</i>	Se Utstysveileder - MagNA Pure 96 - Medisinsk mikrobiologi, SSK
<i>Ytelse</i>	Ikke aktuelt. Metodens ytelse blir jevnlig vurdert ved testing av ekstraherte SLP-prøver.
<i>Sikkerhet</i>	Det er særskilt håndtering av avfall. Se Avfallshåndtering, oppbevaring og tømning - Medisinsk mikrobiologi, SSK
<i>Prøvemateriale/ lokalisasjon</i>	Metoden brukes til å ekstrahere DNA/RNA fra luftveisprøver/puss/vesikkelprøver , luftveisprøver på rør uten tilsetning , genitalprøver , spinalvæske , fæces til virus PCR og for fæces til C.difficile PCR . I tillegg brukes den til ekstraksjon av <i>Borrelia</i> DNA fra leddvæske , spinalvæske og vevsbiopsier, dermatofytt DNA fra negl, hud og hår og EDTA-blod til flåttbåren diagnostikk. NB! Vann (saltvann?) eller TE-buffer kan ikke brukes som prøvematriks. Ulike typer prøvemateriale krever ulik type forpreparering før ekstraksjon. Se under prøvepreparering.
<i>Undersøkelser</i>	Ikke aktuelt
<i>Forsendelse</i>	Forsendelse av laboratorieprøver til SSHF, Laboratorievirksomheten SSHF
<i>Oppbevaring og prøvepreparering</i>	Oppbevaring av prøver. Se Sanntids PCR - Generell metodeprosedyre - Medisinsk mikrobiologi, SSK λ-IC benyttes til prøver til panDerm og Borrelia PCR. MS2-IC kan benyttes til andre prøver. Det tilsettes 20 µl pr prøve. Manuell tilsetning av prøvemateriale: Tilsett 200 µl av prøvematerialet i egen posisjon (brønn) i prøvebrettet ("Processing cartridge") som allerede inneholder IC, i LAF-benk. I FLOW Solution, PSH som 'standalone': Vortex prøven og fjern kork og pensel fra transportrøret, i LAF-benk. Rack med åpne rør transporteres til PSH. Det gjøres ved å bruke passasje over laboratoriebenken og under hyller slik at rackene kan sendes rett fra benk på den ene siden av rommet til benk på den andre siden. PSH pipetterer 200 µl prøvemateriale i egen posisjon (brønn) i prøvebrettet ("Processing cartridge"). NB! Bruk hansker og smittefrakk!
<i>Forpreparering Leddvæske:</i>	Preparering av prøver til Borrelia-PCR/og andre aktuelle PCR analyser:


Dokument ID: D32819

Utarbeidet av: Cand. scient Hanne Quarsten	Fagansvarlig: Molekylærbiolog Mona Hellenes	Godkjent av: Avdelingssjef Sissel Francke	Verifisert av: 16.02.2023 - Kvalitetskoordinator Hilde Strand Børresen
--	---	--	--

		MagNA Pure 96 DNA and Viral SV Kit - Medisinsk mikrobiologi, SSK			Side: 2 Av: 7
Dokumentplassering: II.MSK.MedMik.2.C.4.b-1	Utarbeidet av: Cand. scient Hanne Quarsten	Fagansvarlig: Molekylærbiolog Mona Hellenes	Godkjent dato: 23.02.2023	Godkjent av: Avdelingssjef Sissel Francke	Revisjon: 8.04


Medisinsk serviceklinikk/Avd. for medisinsk mikrobiologi SSK/Pasienter/brukere/Inf.imm_enhet/Molekylærbiologi

<p><i>Spinalvæske –</i></p> <p><i>Protokoll for alle spinalvæsker</i></p> <p><i>Vev:</i></p> <p><i>Gjelder biopsier til ulike PCR analyser</i></p> <p><i>Pensler:</i></p> <p><i>Spinalvæske:</i></p> <p><i>Ekspektorat og lignende:</i></p>	<ol style="list-style-type: none"> Inntil 1 ml leddvæske i et 2.0 ml flatbunnet mikrorør sentrifugeres ved 13 000 rpm i 30 minutter. Ca. 700 µl av supernatanten fjernes og kastes. Tilsett en kule før homogenisering og ødeleggelse av celler i TissueLyser. Kjør 50 hz i minimum 2 minutt. Sentrifuger lett tilslutt. Så lenge BoMi-prosjektet (Ansvarlig: Kristine K. Berg) pågår så skal alle spinalvæsker prepareres som for Borrelia PCR (se under) uavhengig om de kun skal undersøkes for virale analyser eller ikke. <p>Det bør prepareres så mye spinalvæske som mulig. Helst ca. 1 ml og gjerne mer. Spinalvæsken overføres til et 2.0 ml flatbunnet mikrorør som sentrifugeres ved 13 000 rpm i 10 minutter (kan sentrifugeres lenger om det er hensiktsmessig). Bruk to rør om nødvendig. Eventuelle bakterier som er til stede i prøven vil nå være samlet i pelleten i bunnen av røret.</p> <p>Sug av spinalvæske til det er pellet (trenger ikke være synlig) og 200 µl væske igjen i røret. Bland prøven godt (pipettering evt. whirlmixing) slik at en eventuelt pellet løser seg opp. Om spinalvæsket volumet er så stort at samme prøve må spinnes i to rør, så suges det ned til 100 µl i hvert av de to rørene.</p> <p>Prøvematerialene blandes først hver for seg for å få med eventuelle pelletter, deretter samles materialet fra begge rørene i ett. Overflødig spinalvæske overføres til orginalrør og fryses i tilfelle behov for supplementerende undersøkelser.</p> Opptil 25 mg vev kuttes opp i småbiter. Ta først ut biopsien som skal kuttes og spinn ned væsken biopsien har ligget i (2 min 13 000 eller 5 min ved 2.5-5 000 rpm). Fjern all væske og tilsett ca. 300 µl PBS-buffer (lages av substrat) og bland opp eventuell pellet. Dette kan blandes med materiale fra den oppkuttete biopsien. <p>Alt materialet overføres samlet til et 2 ml flatbunnet mikrorør. Det bør være ca 300 µl væsket volum som tilsettes en kule før homogenisering og ødeleggelse av celler i TissueLyser. Kjør 50 hz i minimum 30 minutt. Sentrifuger lett til slutt.</p> <p>NB! Denne metoden kan også benyttes for å preparere vev til andre analyser.</p> <p>Preparering av annet prøvemateriale:</p> <p>Sigma transwab: Om det mottas pensler med materiale uten transportmedium: pipetter 350 µl PBS i røret. Vortex og vent 5 minutter før prøven pipetteres, skriv inn en fritekst i Miclis.</p> <p>Manuell tilsetting av prøvemateriale: Vortex prøven og pipetter 200 µl prøve direkte i Mp-96-brettet.</p> <p>Mukoide prøver må forbehandles i TissueLyser. Evt. etter sputolysin behandling.</p>
---	--

		MagNa Pure 96 DNA and Viral SV Kit - Medisinsk mikrobiologi, SSK			Side: 3 Av: 7
Dokumentplassering: II.MSK.MedMik.2.C.4.b-1	Utarbeidet av: Cand. scient Hanne Quarsten	Fagansvarlig: Molekylærbiolog Mona Hellenes	Godkjent dato: 23.02.2023	Godkjent av: Avdelingssjef Sissel Francke	Revisjon: 8.04


Medisinsk serviceklinikk/Avd. for medisinsk mikrobiologi SSK/Pasienter/brukere/Inf.imm_enhet/Molekylærbiologi

<p><i>Dermatofytter:</i></p>	<p>300 µl MagNa Pure DNA Tissue Lysis buffer og 20 µl 20 mg/ml proteinase K tilsettes hvert rør. Gjør dette før prøvematerialet tas inn i benk for å unngå forurensing av stamløsningene med støvfragmenter fra prøvematerialet. Tilsett prøvemateriale (negl, hud eller hår) og fordøy materialet over natt i 56 °C. Pass på at kun et rør er åpent av gangen om flere prøver prepareres samtidig. Store fragmenter kan deles evt. skrapes for at materialet skal dekkes av væske eller så kan buffermengden dobles. Er det store mengder materialet er det ikke nødvendig å preparere alt.</p> <p>Neste dag blandes prøven godt og spinnes ned (2 min./13 000 rpm) og 200 µl prøvemateriale overføres til MP96-prosessering Brett med λ-IC.</p>
<p><i>Fæcesprøver til virus PCR:</i></p>	<p>Fæcesprøver forprepareres på "smittelab" før virussupernatanten leveres PCR lab klar til ekstraksjon og det legges <u>kopi av rekvisisjonen i prøvemottak for PCR.</u></p> <ol style="list-style-type: none"> Suspendér ca. 0,5 ml fæces i 5 ml PBS (1:10). Sentrifuger ved 4000 x g i 5 min. Filtrér supernatanten gjennom et 0,22 µl filter til et sterilt Sarstedt rør med lokk. <p>Den ferdigpreparerte prøven legges på benk eller fryses ved < – 18 °C.</p>
<p><i>Fæces til C. difficile PCR:</i></p>	<p>Fæces til <i>C.difficile</i> PCR, forprepareres på "smittelab". Flaske med ASL buffer står i hylle på smittelab (i romtemperatur). PCR lab har lager og ansvar for å bestille nytt.</p> <p><u>Fæces uten tilsetning:</u></p> <ol style="list-style-type: none"> Tilsett 1,5 ml Buffer ASL til et 10 ml Sarstedtrør. Tilsett 180-220 mg (ca 200 µl, erte-stor) fæces til ASL-bufferen. Vortex til prøven er godt blandet i ASL-bufferen. Røret settes i -20°C frys på gangen (PCR lab) i boksen merket "Cdiff PCR". <p><u>Fæces på transportmedium:</u></p> <p>Rikelig prøve på transportmedium kan forsøkes.</p> <ol style="list-style-type: none"> Vortex til prøven er godt blandet. Sentrifuger i 3 minutter ved 2810 rpm (program 1), se om det er nok fæcespellet tilstede, hell av supernatant. Mengde fæces bør være det samme som under punkt 2 over. Ved betydelig mindre mengde må prøven avvises. Tilsett 1,5 ml Buffer ASL til pelleten. Vortex til prøven er godt blandet i ASL-bufferen. Røret settes i -20°C frys på gangen (PCR lab) i boksen merket "Cdiff PCR". <p>Videre arbeid utføres på PCR lab (felles for prøve uten tilsetning og swab):</p> <ol style="list-style-type: none"> Kok (100°C) prøven i 10 min og spinn deretter prøven 2 min 13 000 rpm. Manuel tilsetting av prøvemateriale:

 SØRLANDET SYKEHUS		MagNA Pure 96 DNA and Viral SV Kit - Medisinsk mikrobiologi, SSK			Side: 4 Av: 7
Dokumentplassering: II.MSK.MedMik.2.C.4.b-1	Utarbeidet av: Cand. scient Hanne Quarsten	Fagansvarlig: Molekylærbiolog Mona Hellenes	Godkjent dato: 23.02.2023	Godkjent av: Avdelingssjef Sissel Francke	Revisjon: 8.04


Medisinsk serviceklinikk/Avd. for medisinsk mikrobiologi SSK/Pasienter/brukere/Inf.imm_enhet/Molekylærbiologi

<i>Fullblod til utvidet flåttbåren PCR:</i>	200µl av supernatanten tilsettes i prøvebrettet. I FLOW Solution; overfør supernatanten til et FLOW rør.		
	Røret med EDTA-fullblod (uten gel) forbehandles slik:		
	1) <u>Blod</u> :		
	<ul style="list-style-type: none"> Bland EDTA-blodet (vend røret 5-6 ganger) og ta ut 200 µl blod til ekstraksjon på MP-96. Husk λ-IC. Vent til pellet/plasmaprøven er ferdig forbehandlet. 		
	2) <u>Plasma</u> :		
	<ul style="list-style-type: none"> Ta resten av prøven fra pkt 1) og sentrifugeres på 1200 rcf i 12 min (Heraeus Labofuge 400 CT-lab). Sug av plasma forsiktig helt ned til de røde blodlegemene. Plasma overføres til et flatbunnet rør (PCR lab). Plasma sentrifugeres på maks hastighet med Biofuge pico eller Biofuge primo (13 000 rpm) med i 2 min. Sug av ned til ca. 200 µl plasma. Husk MS2 IC Prøvene fra pkt 1.) og pkt 2.) er nå klar for ekstraksjon i MP-96. Sett prøven rett i MP-96 brettet etter eventuelt PSH. Husk registrer prøvene i MP-oppsettet om det kjøres full FLOW på andre prøver. 		
<i>Utstyr, kalibrering, backup</i>	2,0 og 1,5 ml mikrorør	Kuledispenser	Stålkuler Qiagen, Kat.nr 69989
	Sentrifuge	Pipetter, filterspisser	Tissue Lyzer Qiagen, SN 23.1001/05006
	Whirlmixer	Diverse plastrekvisita	
	Utstysveileder - MagNA Pure 96 - Medisinsk mikrobiologi, SSK		
<i>Interferens/kryss-reaksjoner og andre feilkilder</i>	Forurensing med DNaser og/eller RNaser vil ødelegge nukleinsyren. Instrumentet har ingen system for væskedeteksjon. Ved manuell pipettering er det risiko for prøveforbytting.		
<i>Reagenser, medier, substrater</i>	PBS (Buffer nr. 079 fra substrat)		
	ASL buffer (Qiagen) Mat.No 1014755		
	Proteinase K, Mat. No 1122470		
	MagNa Pure DNA Tissue Lysis buffer (Roche; cat. no 06 640 702 001)		
	Lambda DNA, Cat. nr. 80-5000-02		
	MS2 DNA, Cat. nr. 30-9398-01		
	Reagenser fra MagNA Pure 96 DNA and Viral SV, Kat.nr 06 543 588 001 (Roche Diagnostics).		
	Tray 1:	Container 1	Wash Buffer I
		Container 2	Wash Buffer I
		Container 3	Lysis/Binding Buffer
Tray 2:	Container 1	Tom	
	Container 2	Proteinase K	
	Container 3	Elution Buffer	
	Container 4	Wash Buffer III	

 SØRLANDET SYKEHUS		MagNA Pure 96 DNA and Viral SV Kit - Medisinsk mikrobiologi, SSK			Side: 5 Av: 7
Dokumentplassering: II.MSK.MedMik.2.C.4.b-1	Utarbeidet av: Cand. scient Hanne Quarsten	Fagansvarlig: Molekylærbiolog Mona Hellenes	Godkjent dato: 23.02.2023	Godkjent av: Avdelingssjef Sissel Francke	Revisjon: 8.04

Medisinsk serviceklinikk/Avd. for medisinsk mikrobiologi SSK/Pasienter/brukere/Inf.imm_enhet/Molekylærbiologi


	Bottle 1: Magnetic Glass Particles (MGP) MagNA Pure 96 System Fluid (External) Holdbarhet: Tray 1 og Tray 2 hører sammen. Tray 1 og Tray 2 og MGP oppbevares ved 2 – 8 °C etter at det er tatt i bruk Viktig! Reagensene må romtempereres minst 1 time før bruk. Tray 1 og Tray 2: <ul style="list-style-type: none"> • kan lagres i opptil 32 timer i instrumentet. • kan brukes til 8 kjøring i instrumentet. • er holdbar i 28 dager fra det tas i bruk. Instrumentet gir tilbakemelding når kittet er brukt for mange ganger eller i for lang tid. Tray 1 og Tray 2 folieres hver gang etter bruk med MagNA Pure 96 Sealing Foil.
Kontrollmateriale Kontroller: Intern kontroll (IC):	Kan tilsettes manuelt eller av MagNA Pure 96. Manuell tilsetning: Tilsett 20 µl Lambda DNA eller MS2 DNA (til 200 µl prøvemateriale). Automatisk tilsetning i MagNA Pure 96: Lambda DNA og MS2 DNA fylles på flasker som medfølger instrumentet. Flasken(e) plasseres i angitt posisjon i "bottle rack" Instrumentet pipetterer 20 µl IC til hver isolering (brønn). I FLOW Solution: Lambda DNA og MS2 DNA fylles på FLOW rør og plasseres i pipetteringsinstrument (PSH) når maskinen ber om det. Instrumentet pipetterer 20 µl IC til hver isolering (brønn). Prøven må ha rekvirert PCR undersøkelse i MICLIS. Ved bruk av PSH som 'standalone': Lambda DNA eller MS2 DNA fylles på rør og plasseres i pipetteringsinstrument (PSH) når maskinen ber om det. Instrumentet pipetterer 20 µl IC til hver isolering (brønn).
Positiv ekstraksjons-kontroll:	200 µl Bp løsning i siste posisjon. Se Sanntids PCR - Generell metodeprosedyre - Medisinsk mikrobiologi, SSK I FLOW Solution: Et Sigma Transportrør med Bp løsning med prøvenummer; 995192, blir plassert blant pasientprøvene. PSH pipetterer 200 µl til isolering.
Utførelse	Utenom FLOW Solution: Innlegging av prøvedata: Velg "Enter Order" eller "Orders" under folderen "Workplace". Trykk "Load" og velg ("Open") "DNA/RNA ekstraksjon2020". <ul style="list-style-type: none"> • MagNA Pure Kit Name: <ul style="list-style-type: none"> ○ DNA/Viral NA SV 2.0. • Protocol: <ul style="list-style-type: none"> ○ Pathogen Universal 200 4.0.

 SØRLANDET SYKEHUS		MagNA Pure 96 DNA and Viral SV Kit - Medisinsk mikrobiologi, SSK			Side: 6 Av: 7
Dokumentplassering: II.MSK.MedMik.2.C.4.b-1	Utarbeidet av: Cand. scient Hanne Quarsten	Fagansvarlig: Molekylærbiolog Mona Hellenes	Godkjent dato: 23.02.2023	Godkjent av: Avdelingssjef Sissel Francke	Revisjon: 8.04

Medisinsk serviceklinikk/Avd. for medisinsk mikrobiologi SSK/Pasienter/brukere/Inf.imm_enhet/Molekylærbiologi

	<ul style="list-style-type: none"> • Sample: 200 µl. • Elution: 100 µl. • Target Plate. <ul style="list-style-type: none"> ○ MP96 Output Plate. • Velg "Internal Control" dersom IC skal tilsettes automatisk. <p>Legg inn prøveidentitet ved hjelp av tastatur. Fila lagres ved å trykke på knapp øverst til høyre i bildet. Fila lagres i følgende format: Åå.mm.dd initialer. Når fila er lagret aktiveres >> knappen nede til høyre. Trykk på denne og fyll instrumentet med reagenser og plastrekvisita som er angitt i "Stage". Trykk til slutt på Start ikonet.</p> <p>Etter kjøring lagres resultatene automatisk. Alle prøvenumrene skal registreres, enten i instrumentet eller på papir som arkiveres i egen perm.</p> <p>I FLOW Solution: Se Utstysrveileder - FLOW Solution - Medisinsk mikrobiologi, SSK https://kvalitet.sshf.no/docs/pub/DOK47264.pdf. Ved bruk av PSH som 'standalone': Se Utstysrveileder-PSH standalone-Medisinsk mikrobiologi, SSK</p>
<i>Sporbarhet av kjøringen</i>	Filen med opplysninger om kjøringen lagres elektronisk med dato og signatur (utenom FLOW Solution). I FLOW Solution blir opplysninger lagret automatisk. Blir det tilsatt ekstra prøver må opplysninger lagres uten å endre navnet av filen. Back up utføres månedlig. Se Sanntids PCR - Generell metodeprosedyre - Medisinsk mikrobiologi, SSK
<i>Avlesning</i>	Ikke aktuelt
<i>Resultatberegning</i>	Ikke aktuelt
<i>Evaluering av resultat/Vurdering av kontroller</i>	Se Sanntids PCR - Generell metodeprosedyre - Medisinsk mikrobiologi, SSK
<i>Usikkerhet</i>	Om ikke prøver skulle være rekvirert og dermed ikke prosessert så vil IC bli negativ og prøven vil ikke svares ut. Feilpipettering er lite aktuelt ved bruk av Flow, men det er noe risiko for operatørfeil ved manuell pipettering. Feil/feilpipettering av MP96-instrumentet skal vises ved avvikende resultat for IC og BP-kontroll.
<i>Svarrutiner</i>	Ikke aktuelt
<i>Varsling</i>	Ikke aktuelt
<i>Avfallshåndtering</i>	Avfallshåndtering, oppbevaring og tømming - Medisinsk mikrobiologi, SSK Dersom det kreves annet enn generelle avfallsrutiner skal dette nevnes.
<i>Validering/dokumentasjon/referanser</i>	MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit, siste versjon . MagNA Pure 96 System, brukermanual, siste versjon .

Kryssreferanser

 SØRLANDET SYKEHUS	MagNA Pure 96 DNA and Viral SV Kit - Medisinsk mikrobiologi, SSK				Side: 7 Av: 7
Dokumentplassering: II.MSK.MedMik.2.C.4.b-1	Utarbeidet av: Cand. scient Hanne Quarsten	Fagansvarlig: Molekylærbiolog Mona Hellenes	Godkjent dato: 23.02.2023	Godkjent av: Avdelingsjef Sissel Francke	Revisjon: 8.04

Medisinsk serviceklinikk/Avd. for medisinsk mikrobiologi SSK/Pasienter/brukere/Inf.imm_enhet/Molekylærbiologi

[II.MSK.FEL.LAB
FEL.7-4](#)

[Forsendelse av laborieprøver til SSHF, Laborativirksomheten SSHF](#)

[II.MSK.MedMik.2.C.4.a-
11](#)

[Sanntids PCR - Generell metodeprosedyre - Medisinsk mikrobiologi, SSK](#)

[II.MSK.MedMik.2.C.4.c-
3](#)

[Utstysrveileder - MagNA Pure 96 - Medisinsk mikrobiologi, SSK](#)

[II.MSK.MedMik.2.C.4.c-
5](#)

[Utstysrveileder - FLOW Solution - Medisinsk mikrobiologi, SSK](#)

[II.MSK.MedMik.2.C.4.c-
6](#)

[Utstysrveileder-PSH standalone-Medisinsk mikrobiologi, SSK](#)

[II.MSK.MedMik.9-1](#)

[Avfallshåndtering, oppbevaring og tømning - Medisinsk mikrobiologi, SSK](#)

Eksterne referanser