

Veiledning til tolking av SAVD-resultater

18. mai 2021



G E N E M E

PROGRAM

1. Ulike typer resultatanalyser
 - Innledning
 - Eksempler
2. Prosedyre for usikre resultater

1. ULIKE TYPER RESULTATANALYSER

INNLEDNING

- Operatørfeil - det finnes ulike årsaker til slike feil.
Bakenforliggende årsaker er ofte vanskelige å identifisere.
- Første steg i all problemløsning er å sjekke protokollen og repetere prosedyren.
- Å sjekke protokollen og be en erfaren molekylærbiolog om å gå gjennom prøveplanen er et viktig tiltak.



2. ULIKE TYPER RESULTATANALYSER

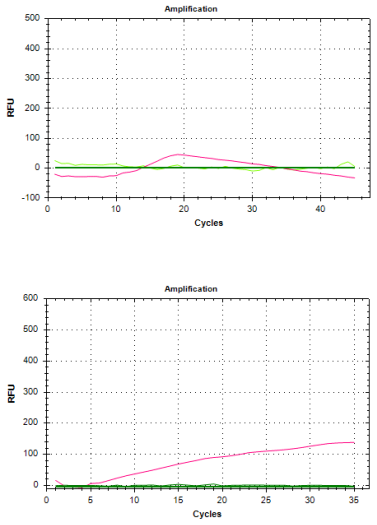
EKSEMPLER

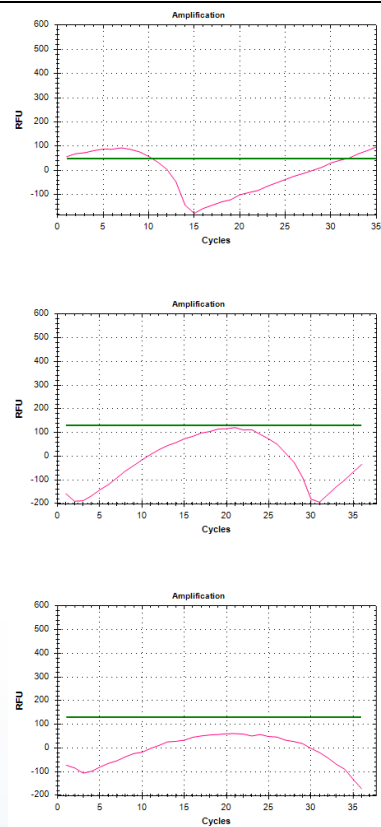
Nr.	Problem	Vedlegg (f.eks. bilder, diagrammer, skjermbilder)	Mulige årsaker	Løsninger	Vedlegg (f.eks. bilder, diagrammer, skjermbilder)
1	Signal i negativ kontroll (NK) eller negative prøver.		Forurensning av testbrønner og/eller kontrollbuffer ved positiv kontroll (PK) og/eller positiv prøve. Ikke sterile arbeidsforhold.	Bruk desinfeksjonsmidler for å fjerne forurensning fra arbeidsflater, stativer, pipetter og andre redskaper du bruker i arbeidet. Bruk medisinske hansker og steriliser dem før du håndterer testsettet. Bruk en UV-lampe for å sterilisere arbeidsområdet. Legg prøvene i riktig rekkefølge (1. NK, 2. Prøver, 3. PK). Lukk prøverørene straks etter at du har tilsatt blandingen.	

				Åpne SAVD-bufferne med prøvemateriale og PK nært opptil tidspunktet for bruk.	
			Spissene ble ikke byttet under tilsetning av NK, PK og prøver i testbrønnene.	Bruk ny spiss for hver ny prøve, NK og PK. Kast brukt spiss i egnet beholder for medisinsk avfall.	
			Forurensning av pipette.	Rengjør pipetten med desinfeksjonsmiddel og papirhåndkle, særlig skaftet. Plasser pipetten under UV-lys i 40 minutter. Bruk engangs filterspisser.	
2	Manglende eller dårlig signal og uvanlig form fra positiv kontroll (PK)		PK suspendert i feil buffer eller med feil fortynningsforhold.	Sjekk at PK ble tilberedt på riktig måte i samsvar med brukerhåndboken. Bruk et annet PK-rør fra samme settet.	
			De frysetørkede reagensene er ikke fullstendig oppløst.	Pass på at de frysetørkede reagensene i PK er fullstendig oppløst ved å pipettere løsningen forsiktig flere ganger. Bruk et annet PK-rør fra samme settet.	
5	Manglende signal fra RNA-prøver (kommersielt eller referanse-RNA-materiale)		Manglende forvarming eller feil temperatur for omvendt transkripsjon i termosykling-profilen.	Sjekk termosyklingprofilen og pass på at termosykling-profilen er i samsvar med brukerhåndboken.	

6	Ikke noe signal fra annet kommersielt syntetisk RNA-virusmateriale.		Det kommersielle produktet inneholdt bare RNA-virusfragment (gen) som testen ikke kunne gjenkjenne.	Pass på at det kommersielle virusmaterialet inneholder genmateriale som kan gjenkjennes av testen eller som inneholder hele virusgenomet.	
			For lav (eller høy) konsentrasjon av RNA-virus i kommersielt materiale.	Sjekk reaksjoner med en serie på 10 ganger fortynning av kommersielt virusmateriale for å velge den riktige fortynningen.	
7	Resultatet av testen samsvarer ikke med referansemetoden.		Feil referansemetode.	Pass på at referansemetoden for testen er i samsvar med brukerhåndboken.	
			Stort avvik i testtiden sammenliknet med RT-PCR-testen. Det er brukt en annen penseltype i referansemetoden for innsamling av prøvemateriale enn i testen. Det er brukt en annen metode for innsamling av prøvemateriale (dvs. en annen referansemetode) enn i SAVD-testen.	Bruk penseltypen som er anbefalt i brukerhåndboken. Utfør testene og med samme prøve innenfor kort tid.	
8	Får svakere signal fra samme prøve		Anbefalt lagringsforhold for prøve ikke overholdt.	Lagre prøvene i et kjøleskap eller en beholder med kjølere.	
			Nedbryting av virusmateriale i gammel prøve og langtidslagret prøve (aldring av prøve).	Ta i bruk prøvene og utfør testene så raskt som mulig.	

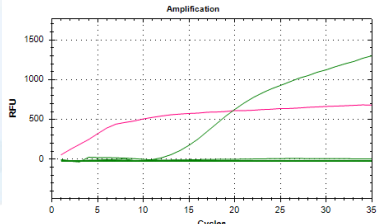
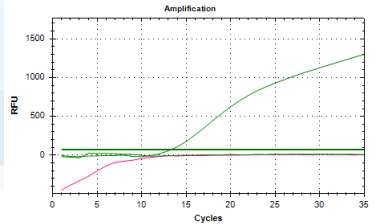
9	Intet signal fra en prøve fra en symptomatisk person		Prøve ikke tatt fra halsen (nasofarynks, nese osv.)	Bruk prøvetypen som er anbefalt i brukerhåndboken.	
			Forekomst av rensedmidler og resterende forbindelser fra kildemateriale eller kroppsvæsker. Høy konsentrasjon av inhibitorer fra prøven kan hemme reaksjonen.	Tilsett 10 ul av prøvefortynningen og 40 ul normaliseringsbuffer i prøverøret. Utvid reaksjonssyklusene til 45 omganger.	
			Feilaktig fortynnet prøve i normaliseringsbufferen.	Lag ny fortynning av prøven i normaliseringsbufferen.	
			Dårlig prøvekvalitet, for lite genmateriale i prøven.	Tilsett 50 ul av prøven direkte i SAVD-testbrønnen (uten fortynning i normaliseringsbufferen).	
10	Ufullstendig reproducerbarhet mellom prøveparalleller		Ct-verdiene i parallellene kan ha økende variasjon pga. upresis pipettering eller dårlig laboratorteknikk.	Vær oppmerksom ved pipettering og øv på teknikken.	
11	Gjentatte tester med samme prøve gir ulike resultater.		Feil rekkefølge for tilsetting av prøver, NK og PK i prøverørene.	Sørg for at du tilsetter prøver, PK og NK i riktig rekkefølge. Planlegg oppsettet for prøvene, PK og NK før testing. Hold arbeidsområdet rent. Fjern prøver og kit som du ikke trenger, fra arbeidsområdet.	
			Blanding av rekkefølgen for plassering av prøverørene i termosyklusen.	Planlegg oppsettet for prøvene, PK og NK før arbeidet begynner. Plasser prøverørene på bordet i samme rekkefølge som de	

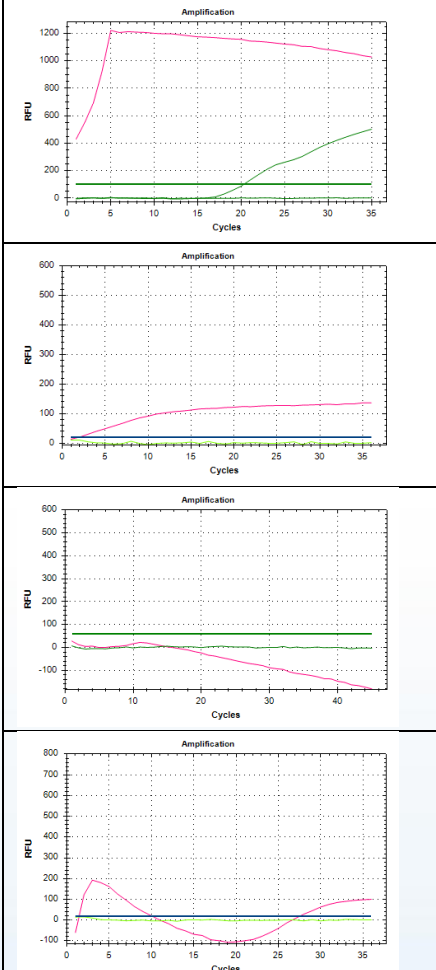
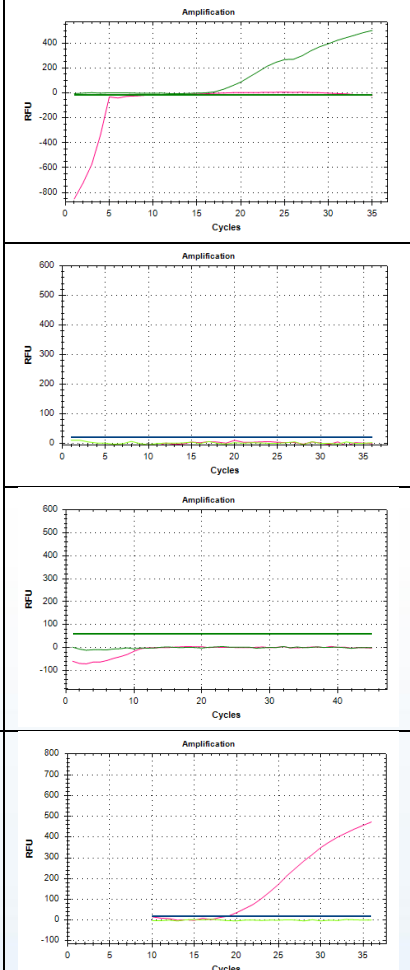
				vil bli satt inn i termosyklus-blokken.	
			Brønner for PK og NK ble ikke valgt og/eller prøverørerne var ikke merket som prøver i plateinnstillingene for termosykluseringen.	Sett opp termosyklus-platen i samsvar med prøvene, PK og NK slik de er plassert i termosyklus-blokken.	
12	Ingen signaler fra utførte tester. Uriktige og uvanlige forsterkningskurver fra utførte tester.		Utskifting/ombytting av kontrollbuffer og normaliseringsbuffer.	Den spesifiserte bruken av buffere skal ikke endres. Følg brukerhåndboken.	
			Blanding/ombytting av komponenter i forskjellige testsett.	Arbeid med ett sett om gangen eller sett som har samme LOT. Pass på å ikke blande sammen komponentene (NK, PK, buffere, prøverør, penseltype og prøvebuffer) mellom ulike sett.	
			Bruk av en annen buffer for å lagre prøven enn det som er anbefalt for testsettet.	Arbeid med ett sett om gangen eller sett som har samme LOT. Pass på å ikke blande sammen komponentene (NK, PK, buffere, prøverør, penseltype og prøvebuffer) mellom ulike sett.	
			Lagringsforholdene for komponentene i settet var ikke i samsvar med kravene.	Sjekk at lagringsforholdene for testsettkomponentene er i samsvar med kravene angitt på forpakningen.	
			Høy omgivelsestemperatur og/eller varme prøver og prøverør.	Arbeid med settet i en omgivelsestemperatur under 25°C, fortrinnsvis 20°C.	

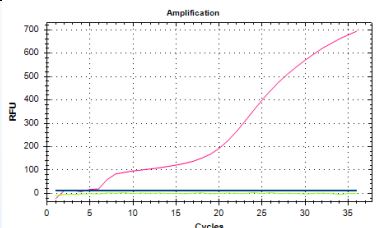
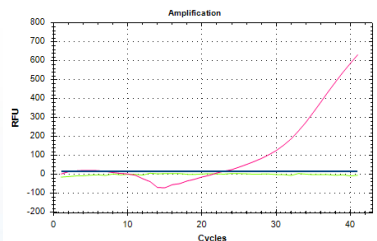
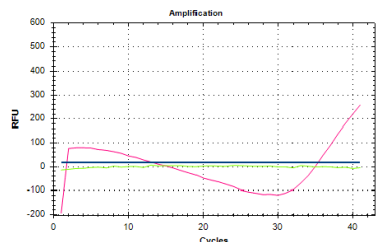
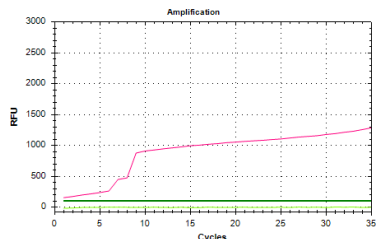


			Bruk kjøleblokker under arbeidet med prøverørene på bordet. Sjekk at lagringsforholdene for komponentene er i samsvar med kravene angitt på forpakningen.	
		Feil profilinnstilling for termosykleren.	Sjekk at profilinnstillingen for termosykleren er i samsvar med håndboken.	
		Valg av feil fargestoff i plateinnstillingene for termosykleren.	Sjekk at plateinnstillingen for termosykleren er i samsvar med håndboken.	
		Frysetørket reagens i prøverørene ble ikke fullstendig oppløst i bufferen.	Pipetter blandingen i PCR-røret minst fem ganger til den frysetørkede reagensen er helt oppløst i bufferen.	
		Ulikt væskevolum i prøverørene. For lite eller for mye væske i prøverørene.	Vær nøyaktig når du pipetterer blandingen i prøverørene.	
		Bobler i prøverøret.	Pipetter blandingen sakte opp i prøverøret. Ta ikke hele blandingen ut av prøverøret under blandingen. Ikke tving bobler fra spissen og inn i prøverøret med blandingen. Små bobler festet til prøverørsveggen vil forsvinne under prøvekjøringen.	

				Større bobler som dekker mesteparten av overflaten, vil ikke forsvinne. Du kan bruke sentrifuge for PCR-stripe for å fjerne bobler. Sentrifuger i minimum 10 sekunder.	
			Prøverør berørt med ubeskyttede hender er forurensset.	Bruk alltid medisinske hansker under arbeid med testsettet. Bruk av desinfiserende produkter basert på etanol anbefales for desinfisering av arbeidsområdet, utstyr og hansker. Ikke begynn arbeidet før all etanol er fordampet. Alt utstyr og hansker må være tørre.	
			Berøring av innsiden av lokket til prøverøret.	Unngå å berøre innsiden av prøverøret, både lokket og brønn delen.	
			Prøverørene hadde merke som forårsaket signal.	Pass på at lokket og veggene i rørene er gjennomsiktige. Ethvert merke kan forstyrre signalet som registreres av termosyklere.	
			Prøverørene kollapset under trykket fra termosyklens varmelukk.	Fyll alle brønnene i termosyklere jevnt med nye eller brukte rør.	
			Prøverørene var ikke helt lukket.	Pass på å lukke alle prøverørene fullstendig. Sjekk første gang etter tilsetning av blandingen i prøverøret og en andre gang etter å ha plassert prøverørene i	

				Termosykler-blokken. Overflaten på alle lukkede prøverør skal være flat.	
			Fordamping av blandingen under kjøring av PCR.	Pass på å lukke alle prøverørene fullstendig. Sjekk første gang etter tilsetning av blandingen i prøverøret og en andre gang etter at prøverørene er plassert i termosykler-blokken. Overflater på alle lukkede prøverør skal være flate.	
			Termosykler-blokken er ikke tilpasset 0,1 ml prøverør.	Bruk adapterblokk for 0,1 ml rør, eller bruk termosykler med blokk for 0,1 ml rør.	
			Rester av etanol som ikke er fordampet etter fjerning av forurensning i arbeidsområdet.	Ikke begynn arbeidet før etanolen er fordampet. Alle overflater, alt utstyr og hansker må være tørre.	
			Prøver, PK og prøverør utsatt for UV-lys.	Hvis du steriliserer arbeidsområdet med UV-lys, må du passe på å beskytte komponentene i testsettet og prøvene mot stråling. Du må ikke arbeide mens UV-lyset er på.	
13	Bio-Rads termosykler-program har problemer med signalbehandlingen.		Det er problemer med signalbehandlingen i programvaren for termosykleren.	I vindu med Bio-Rads rådatafil velger du "Settings" > "Baseline settings" på menylinjen.	

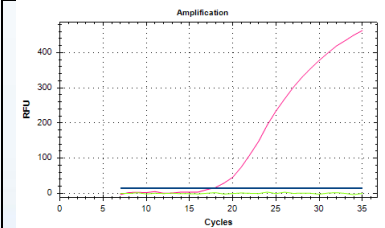
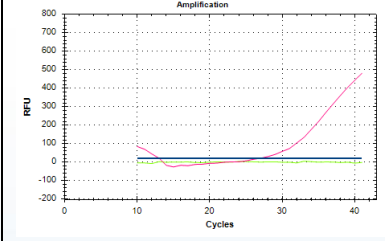
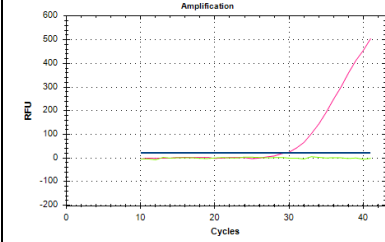
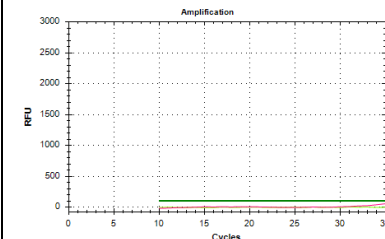
		 The four plots in this section illustrate different baseline and drift issues in RT-qPCR data: Top plot: Shows a high initial baseline (RFU ~1200) that slowly decreases over 35 cycles. A sample curve (green) starts at cycle 15 and rises to RFU ~500. Second plot: Shows a low baseline (RFU ~50) that slowly increases over 35 cycles. A sample curve (green) starts at cycle 15 and rises to RFU ~150. Third plot: Shows a baseline (RFU ~50) that slowly decreases over 45 cycles. A sample curve (green) starts at cycle 15 and rises to RFU ~100. Bottom plot: Shows a baseline (RFU ~50) that fluctuates, with a significant dip around cycle 20. A sample curve (green) starts at cycle 15 and rises to RFU ~100.	Høyt bakgrunnssignal fra negativ prøve og negativ kontroll.	Pass på at alternativene “Baseline Subtracted Curve Fit” og “Apply Fluorescence Drift. Correction” er på. I vindu med BioRads rådatafil velger du “Settings” > “Cycles to Analyze...” på menylinjen.	 The three plots in this section show the effect of baseline subtraction and drift correction: Top plot: Shows a baseline (RFU ~0) that slowly increases over 35 cycles. A sample curve (green) starts at cycle 15 and rises to RFU ~400. Middle plot: Shows a baseline (RFU ~0) that slowly decreases over 45 cycles. A sample curve (green) starts at cycle 15 and rises to RFU ~100. Bottom plot: Shows a baseline (RFU ~0) that fluctuates, with a significant dip around cycle 20. A sample curve (green) starts at cycle 15 and rises to RFU ~400.
--	--	---	--	---	--

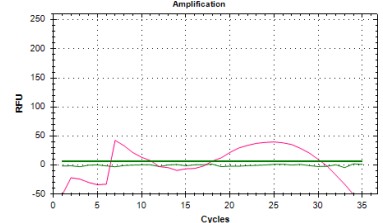
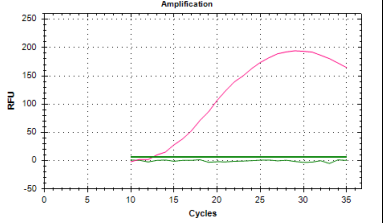
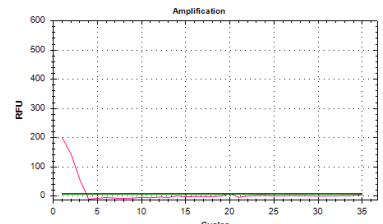
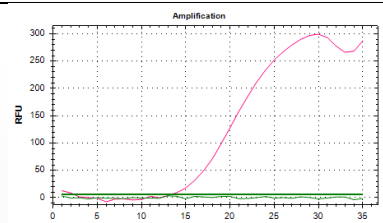


I det nye vinduet som vises, setter du inn syklusnummeret som analysen skal starte på. I denne syklusen tilbakestiller programvaren kurven til horisontal posisjon og korrigerer alle forsterkningsavmerkinger.

Vi anbefaler å starte med 10. syklus og bestemme om denne løser problemet, eller endre verdien noe. Vi anbefaler arbeid i området 1-15.

Andre verdien (maksimum) må ikke endres.



					
14	Kurven faller fra begynnelsen til null fluorescens i de neste trinnene - revehale.			Det er ikke nødvendig med noen tiltak så lenge Ct ikke er påvirket.	
15	Nedadgående eller krum fluorescenskurve.			Det er ikke nødvendig med noen tiltak så lenge Ct ikke er påvirket.	

3. PROSEDYRE FOR USIKRE RESULTATER

Er resultatet usikkert, anbefales det å gjøre følgende:

1. Gjenta kjøringen på samme prøve
2. Hvis den gjentatte kjøringen fremdeles ikke gir et klart resultat, anbefales det å ta en ny prøve – en ny prøvetaking og ny testkjøring.

3. SPØRSMÅL OG SVAR

Denne veiledningen er oversatt til norsk av NordicDx AS:

<https://nordicdx.no/kontakt/>

GeneMe Sp. z o.o. | Gdańsk, Poland | www.geneme.eu

Ul. Piotrkowska 41C, 80-180 Gdańsk | M: kontakt@geneme.eu | T: +48 517 169 126

