

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от 20.02.09 № 1337-Пр/09

УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального
государственного учреждения науки
«Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия
человека



В.И.Покровский

«04» _____ 2008г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению комплекта реагентов
для выделения РНК/ДНК из клинического материала

«РИБО-сорб»

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ.

Комплект реагентов выпускается в 2 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «РИБО-сорб» вариант 50.

Форма 2 включает комплект реагентов «РИБО-сорб» вариант 100.

СОСТАВ.

Комплект реагентов «РИБО-сорб» вариант 50 или вариант 100 – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала **включает:**

Реактив	Описание	Вариант 50		Вариант 100	
		Объем (мл)	Кол-во	Объем (мл)	Кол-во
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость*	22,5	1 флакон	45	1 флакон
Раствор для отмывки 1	Прозрачная бесцветная жидкость*	20	1 флакон	40	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон	100	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон	40	1 флакон
Сорбент	Суспензия белого цвета	1,25	1 пробирка	1,25	2 пробирки
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	5 пробирок	0,5	10 пробирок

Комплект реагентов вариант 50 рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли.

Комплект реагентов вариант 100 рассчитан на выделение РНК/ДНК из 100 проб, включая контроли.

НАЗНАЧЕНИЕ.

Комплект реагентов «РИБО-сорб» предназначен для выделения РНК/ДНК из клинического материала.

Формы комплектации 1 и 2 предназначены для выделения РНК/ДНК из клинического материала.

ВЗЯТИЕ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА. ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ.

Перед началом работы следует ознакомиться с

* При хранении лизирующего раствора и раствора для отмывки 1 при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», подготовленными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

1. Необходимо строго соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы здравоохранения СССР», Москва, 1981 г.
2. Работать только в одноразовых перчатках, использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с аэрозольным барьером. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ РНК/ДНК ИЗ ПРОБ.

(с указанием фирм-производителей / поставщиков):

1. Ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип А).
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
3. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
4. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс об/мин (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия).
5. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
6. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
7. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки на 1,5 мл (например, «Ахуген», США).
8. Штативы для микропробирок на 1,5 мл (например,

«ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Ахуген», США).

9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Ахуген», США).
10. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл (например, «Ахуген», США).
11. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
12. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
13. Емкость с дезинфицирующим раствором.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

(проводится в **ЗОНЕ 1** – помещении для обработки проб).

Объем пробы, необходимый для выделения РНК/ДНК, – 0,1 мл.

ВНИМАНИЕ! Для работы с РНК необходимо использовать только одноразовые пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free».

Порядок работы.

1. **Лизирующий раствор и раствор для отмывки 1** (если они хранились при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре от 60 до 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок (включая отрицательный и положительный контроли выделения). Внести в каждую пробирку **5 мкл ВКО** (если он предусмотрен для анализа данного возбудителя инфекции). Затем по **450 мкл лизирующего раствора**. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с **лизирующим раствором и ВКО** (если используется) внести по **100 мкл пробы**, используя наконечники с аэрозольным барьером. В пробирку отрицательного контроля (ОК) выделения внести **100 мкл ОКО**. В пробирку положительного контроля (ПК) выделения внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО** (если он предусмотрен для анализа).
4. Плотнo закрытые пробы тщательно перемешать на вортeксе и центрифугировать в течение 5 с при 5 тыс об/мин на

- микроцентрифуге для удаления капель со внутренней поверхности крышки пробирки.
5. Тщательно ресуспендировать **сорбент** на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по **25 мкл** ресуспендированного **сорбента**. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 1 мин, еще раз перемешать и оставить на 5 мин.
 6. Процентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс об/мин в течение 30 с на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
 7. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 1**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, процентрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
 8. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе. Процентрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
 9. Повторить отмывку **раствором для отмывки 3**, следуя п. 8.
 10. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 4**. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе, процентрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.
 11. Поместить пробирки в термостат при температуре 60 °С на 12-15 мин для подсушивания сорбента. При этом крышки пробирок должны быть открыты.
 12. В пробирки добавить по **50 мкл РНК-буфера**, используя наконечник с аэрозольным барьером, свободный от РНКаз. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 60 °С на 2-3 мин. Перемешать на вортексе и процентрифугировать пробирки на максимальных оборотах микроцентрифуги (12-13 тыс об/мин) в течение 1 мин. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК.

Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР-амплификации.

Реакцию обратной транскрипции следует проводить сразу после получения РНК/ДНК-пробы. Отбирать раствор РНК/ДНК для реакции нужно очень осторожно, **не захватывая сорбент**. Если сорбент взмутился, необходимо осадить его на центрифуге.

Очищенная РНК может храниться до 4 ч при температуре от 2 до 8 °С. Для длительного хранения препарата, необходимо, не захватывая сорбент, перенести надосадочную жидкость в стерильную пробирку и хранить при температуре не выше минус 68 °С в течение года.

ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ.

1. Обеззараживание биоматериала и реагентов следует проводить, помещая одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники), колбы-ловушки вакуумных отсасывателей на 20-24 ч в специальные контейнеры, содержащие дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т.

СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.

Срок годности. 9 мес. Комплект реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Транспортирование. Комплект реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут.

Хранение. Комплект реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С.

Условия отпуска. Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество комплекта реагентов «РИБО-сорб» направлять в адрес ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора (119002, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41, тел. (495) 241-39-22, факс (495) 241-92-38), в адрес предприятия-изготовителя – ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а, тел. (495) 305-54-24, факс (495) 305-54-23, e-mail: obtk@pcr.ru) и в адрес официального дилера – компанию ООО «ИнтерЛабСервис» (тел. (495) 925-05-54, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru).

Руководитель производства
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова