

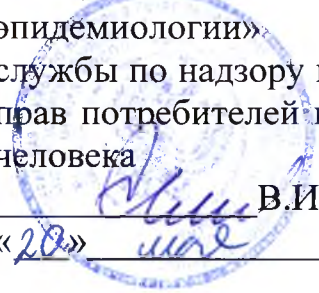
УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ № _____

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
«20» _____ 2008 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению комплекта реагентов
для выделения РНК из клинического материала

«РИБО-золь-А»

102

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ.

Комплект реагентов выпускается в 2 формах комплектации:

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

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

СОСТАВ.

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

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Вариант 50</i>		<i>Вариант 100</i>	
		<i>Объём (мл)</i>	<i>Кол-во</i>	<i>Объём (мл)</i>	<i>Кол-во</i>
Рибозоль	Прозрачная бесцветная жидкость	37,5	1 флакон	75	1 флакон
Раствор В	Прозрачная бесцветная жидкость	10	1 флакон	20	1 флакон
Раствор С	Прозрачная бесцветная жидкость	22,5	1 флакон	45	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон	100	1 флакон
РНК-элюент	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	5 пробирок	0,5	10 пробирок

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

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

ВНИМАНИЕ! В работе необходимо использовать контрольные образцы – ОКО, ВКО, ПКО – для тех инфекционных агентов, РНК которых необходимо выявить.

НАЗНАЧЕНИЕ.

Комплект реагентов «РИБО-золь-А» предназначен для выделения тотальной РНК из клинического материала для последующего анализа методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции.

ВЗЯТИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА. ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ.

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Забор, транспортировка и хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», подготовленными ФГУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора, Москва, 2007 г.

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК из проб объемом 100 мкл.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

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.

Работать только в одноразовых перчатках, использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для 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 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. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс g (например, «Elmi», Латвия, «Hettish», Германия).
4. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
5. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
6. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
7. Одноразовые полипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл (например, «Axygen», США).
8. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 и до 1000 мкл (например, «Axygen», США).
9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл (например, «Axygen», США).
10. Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Axygen», 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.

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

Александр

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

1. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл с завинчивающимися или плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный и положительный контроли выделения). Внести в каждую пробирку по **10 мкл ВКО** (если он предусмотрен для анализа данного возбудителя инфекции). Затем по **750 мкл Рибозоля**. Промаркировать пробирки.
2. В пробирки, содержащие рибозоль и ВКО (если используется), добавить по **100 мкл предобработанного исследуемого образца**, используя наконечник 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 они предусмотрены для анализа данного возбудителя инфекции). Плотно закрутить (закрыть) крышки, перемешать на вортексе.
3. Поместить пробирки в термостат на 5 мин при температуре 60 °С. Перемешать на вортексе и центрифугировать их в течение 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге.
4. Добавить в пробирки по **110 мкл раствора В**, перемешать на вортексе в течение 1 мин и инкубировать в течение 5 мин в холодильнике при температуре от 2 до 8 °С.
5. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение 10 мин при 13 тыс об/мин. Осторожно, не встряхивая, вынуть пробирки из микроцентрифуги. Содержимое пробирок должно разделиться на две фазы: нижнюю и верхнюю.
6. **Раствор С** тщательно перемешать. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл с завинчивающимися или плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный и положительный контроли выделения). Внести в каждую пробирку по **450 мкл раствора С**. Промаркировать пробирки.
7. **Не задевая промежуточной фазы, перенести 450 мкл верхней (водной) фазы** в пробирку, содержащую **450 мкл раствора С**, используя отдельные наконечники с аэрозольным барьером. Все исследуемые образцы (включая отрицательный (**ОК**) и положительный (**ПК**) контроли выделения) перемешать на вортексе и инкубировать в течение 20 мин в холодильнике при температуре не выше минус 16 °С.
8. Центрифугировать пробирки 10 мин при 13 тыс об/мин на микроцентрифуге. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
9. Добавить в пробирки по **1000 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыв крышки, **перемешать переворачиванием**, центрифугировать в течение 10 мин при 13 тыс об/мин. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы. Полностью удалить

надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.

10. Поместить пробирки в термостат на 5 мин при температуре 60 °С для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты). Осадок, содержащий очищенную РНК, можно хранить в течение 1 нед при температуре не выше минус 16 °С.

11. Добавить в пробирки по **20-50 мкл РНК-элюента**. Перемешать на вортексе в течение 2-3 мин. РНК-пробы готовы к постановке ОТ-ПЦР.

Очищенная РНК может храниться до 4 ч при температуре от 2 до 8 °С и до 1 года при температуре не выше минус 68 °С.

ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ.

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

СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.

Срок годности. 6 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. При получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплект реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С, кроме РНК-элюента. РНК-элюент хранить при температуре не выше минус 16 °С.

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

Рекламации на качество комплекта реагентов «**РИБО-золь-А**» 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) 305-39-39, факс (495) 305-54-23, e-mail: obtk@pcr.ru) и в адрес официального дилера – компанию ООО «ИнтерЛабСервис» (тел. (495) 925-0554, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru).

Директор ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии»

Роспотребнадзора

Руководитель Государственных испытаний

Зав. лабораторией вирусных кишечных инфекций

и молекулярной биологии ФГУН ГИСК им.Тарасевича Роспотребнадзора

В.И. Покровский

Г.М.Игнатьев

«УТВЕРЖДАЮ»

Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации

_____ Г.Г. Онищенко

«_____» _____ 2008 г.

№ _____

ИНСТРУКЦИЯ

по применению комплекта реагентов
для выделения РНК из клинического материала

«РИБО-золь-А»

«СОГЛАСОВАНО»

Директор ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича

Роспотребнадзора

Н.В.Медуницын

«20» *мар* 2008 г.

