

	Јавна здравствена установа Болница „Свети Врачеви“ Бијељина Српске војске 53			МИ-10-033
Поступак екстракције РНК из узорака назо/орофарингеланог бриса				
Страна 1 од 2	Издање:	Важи од:	Одобрио:	Копија број
	1	2021-05-11	др Санда Лазих руководилац Службе за микробиологију са паразитологијом	Е

Назив анализе	Поступак екстракције РНК из узорака назо/орофарингеланог бриса
Врста узорка	Назофарингеални брис, орофарингеални брис
Узимање и транспорт узорка	У складу са упутством УП-10-135: Узимање и транспорт узорка за микробиолошку дијагностику.
Пријем и протокол	У складу са упутством УП-10-008: Пријем пацијената, захтјева и руковање узорцима у Служби за микробиологију са паразитологијом.
Обрада узорка	При раду се обавезно користе једнократне рукавице без пудера, које се често мијењају, поготово ако дође до просипања течности или кад год постоји сумња на контаминацију. Обавезно је ношење мантила који је намијењен само за простор за изолацију нуклеинских киселина. Непосредно прије екстракције узорке извади из фрижидера и темперирати на собној температури. Ставити нитрилне рукавице без пудера, очистити биосигурносни кабинет, припремити пипете, наставке са филтером за пипете, контејнере за медицински отпад, епрувете. Узорак прије изолације вортексирати, пажљиво отворити, уз мјере личне заштите и у биосигурносном кабинету, одбацити брис циједећи га од зидове посуде, те пипетирати око 1.5ml у епрувету за чување узорка на -80°C, а потом следити инструкције произвођача екстракционог кита. Ове се епрувете се могу чувати годину дана на -80°C.
Реагенси и материјал	70% етанол, реагенси за екстракцију, стерилни наставци за пипете са филтером, микроцентрифуршке епрувете, стерилне пинцете, стаклене чаше
Апарати	BSC, центрифуге, вортекс, аутоматски екстрактор, пипетори, фрижидер, замрзивач
Услови рада	Оптимални микроклиматски услови за рад у лабораторији, (22-25°C).
Опис анализе	Зависно од врсте произвођача и начина екстракције (мануелна или аутоматска), разликују се и протоколи екстракције. Сваки екстракциони протокол/упутство се чува у електронској форми у Регистратору протокола у оригиналном и/или преведеном издању. Скраћене верзије и изводи из наведених упутстава се по потреби каче на видно мјесто у просторији за екстракцију. Након аликвотирања узорка у адекватно обиљежене микроцентрифуршке епрувете, приступа се поступку екстракције према протоколу. Кораци у поступку екстракције су: 1. лизирање ћелијских елемената, 2. преципитација ослобођених молекула нуклеинских киселина, најчешће алкохолом, 3. испирање и пречишћавање, 4. елуција РНК. Након последњег корака, тј елуције РНК, изолована РНК се пребацује у микроцентрифуршке епрувете од 1.5ml и, уколико ће се одмах приступити

Болница Бијељина	Страна 2 од 2	Издање:	Важи од:	МИ-10-033
		1	2021-05-11	

	постављању Real time PCR реакције, чува се у фрижидеру до момента спајања узорка са мастер миксом, а у супротном се одлаже у замрзивач на -20°C до постављања PCR реакције. Послије рада очистити биосигурносни кабинет 70% алкохолом, потом варикином, те дестилованом водом и укључити УВ лампу. Спремити реагенсе и прибор до следеће употребе.
Трајање анализе	Дефинисано упутствима произвођача и бројем узорака.
Издавање налаза	Начин издавања налаза је дефинисан упутством УП-10-133: Израда и дистрибуција извјештаја о резултатима испитивања у Служби за микробиологију са паразитологијом.
Биосигурносне мјере рада	Екстракција се обавља у биосигурносном кабинету класе II у простору за изолацију нуклеинских киселина. Прије уласка у инфективни блок неопходно је обући сву прописану личну заштитну опрему, као што је дефинисано упутством УП-10-156: Биосигурност у PCR лабораторији. Материјал и опрему намијењене за обраду за рад у просторији за екстракцију користити искључиво у том простору и за описане процедуре и не смије се преносити из једног радног подручја у други. По престанку рада врши се чишћење и дезинфекција биосигурносног кабинета адекватним дезинфицијенсима, након чега се укључи УВ лампа, затим се приступа чишћењу лабораторије и кориштене опреме.
Деконтаминација	Аутоклавирање
Литература	Основе молекуларне вирусологије, Т. Јовановић, М. Ћупић, М. Станојевић, А. Кнежевић, И. Лазаревић, Универзитету Београду, Медицински факултет, 2006. год. Упутство произвођача QIAamp® Viral RNA Mini, QIAGEN Упутство произвођача NucleoSpin® RNA Virus- Viral RNA isolation
Скраћенице	BSC – биосигурносни кабинет, RNK – рибонуклеинска киселина
Љекар	Др Санда Лазић, др Ирена Сефер