

	Јавна здравствена установа Болница „Свети Врачеви“ Бијељина Српске војске 53			МИ-10-034
Поступак припреме Real Time PCR реакције				
Страна 1 од 4	Издање:	Важи од:	Одобрио:	Копија број
	1	2021-05-11	др Санда Лазих руководилац Службе за микробиологију са паразитологијом	Е

Назив анализе	Поступак припреме Real Time PCR реакције
Врста узорка	Изолована нуклеинска киселина (РНК/ДНК)
Узимање и транспорт узорка	У складу са упутством УП-10-135: Узимање и транспорт узорака 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	Нуклеинску киселину (РНК или ДНК) изоловати према МИ-10-033: Поступак екстракције РНК из узорака назо/орофарингеланог бриса и упутствима произвођача. Прије спајања узорка са мастер миксом, извадити РНК тубице из замрзивача и цомогенизовати садржај ручно или на термомиксеру. Узорци са изолованом РНК се све вријеме током рада држе на леду.
Реагенси	Реакциони микс и ензим микс (зависно од врсте произвођача), молекуларна вода, стерилни наставци са филтером за микропипете, рукавице за једнократну употребу, без пудера, лед, стрипови и поклопци за стрипове.
Апарати	PCR кабинет (DNK/RNK UV-Cleaner box), микроцентрифуга, вортекс, аутоматске пипете, термомиксер, PCR апарат (Quant Studio 5)
Услови рада	Оптимални микроклиматски услови за рад у лабораторији, (22-25°C).
Опис анализе	Ради добијања што прецизнијег резултата (да би се избјегла контаминација и добијање лажно позитивних резултата или лажно негативних резултата) неопходно је придржавати се одређених мјера опреза: - Носити чист мантил и рукавице приликом припреме узорака за PCR амплификацију (који нису ношени током руковања амплификованим PCR производима или током припреме узорка); - Мијењати рукавице кад год постоји сумња да је дошло до контаминације; - Препоручују се одвојене лабораторијске просторије за извођење различитих етапа процедуре: а) Прва просторија: Припрема реагенса за тестирање; б) Друга просторија: Обрада узорака и контрола; с) Трећа просторија: Амплификација – извођење PCR реакције. - Сви материјали који се употребљавају у једној просторији треба да остану у њој и да се не премичу или користе у другим просторијама. Након извођења процедура теста, треба очистити и дезинфиковати радну површину и лабораторијски прибор. - Никад не уносити амплификоване PCR продукте у просторију за поставку PCR реакције. - Пажљиво отворати и затварати тубице са узорцима. Избјежавати прскање.

Болница Бијељина	Страна 2 од 4	Издање:	Важи од:	МИ-10-034
		1	2021-05-11	

- Реагенси и све компоненте неопходне за рад треба што је могуће више држати затворенима/поклопљенима.
- Сви наставци за пипете и тубе за центрифугу треба да буду без ДНаза и РНаза.

Поставка Real time PCR реакције – опште смјернице

1. Провјерити да ли су сви неопходни уређаји и опрема одговарајући, калибрисани и функционални прије почетка рада.
2. Деконтаминирати опрему и радни простор и припремити све неопходно за рад, да би се убрзао радни процес.
3. Укључити апарат за PCR и програмирати га унапријед (према препорукама произвођача кита и упутству за руковање апаратом (Quant Studio 5), да би се избјегло успоравање након припреме реакције.
4. Одмрзните све компоненте (осим уколико произвођач не нагласи другачије) и вортексовати благо, али темељно, ради обезбјеђивања равномјерне дистрибуције компоненти. Кратким центрифугирањем спустите течност на дно тубе.
5. Припремите плејт са мастер миксом:
 - Процијенити број реакција за тестирање, који обухвата негативну контролу, позитивну контролу и узорке који се тестирају. Препорука је да се припреми мастер микса за још 2 додатне реакције да би се компензовало за грешке у пипетирању.
 - Припремити стрипове за PCR од 8 тубица сходно процијењеном броју реакција.
 - Према упутству произвођача направити мастер микс и потом га разлити у стрипове који се све вријеме налазе на леду. Водити рачуна да нема мјехурића нити пјене у тубама приликом аликвотирања реакционог микса
6. Да би се спријечила контаминација егзогеном РНК, узорке треба додавати следећим редом: негативна контрола, узорци пацијената, позитивна контрола. Треба припремити посебне наставке за пипете са филтером за употребу при припреми реагенаса и додавање узорака
 - Уколико се као негативна контрола користи dH₂O, она се додаје одмах по разливању мастер микса, прије него што се пренесе у просторију за додавање узорака и позитивних контрола. У случају да се негативна контрола екстрахује паралелно са узорцима, тада се и она додаје у просторији за спајање узорака са мастер миксом.
7. Припремљен и разливен мастермикс (са негативном контролом, уколико се додаје dH₂O) који је све вријеме на леду, се пажљиво, кроз прозор, пренесе у собу за спајање са узорцима.
 - Узорци са изолованом РНК се све вријеме током рада држе на леду или на термомиксеру. У бунариће где је већ додат PCR мастер микс се додаје РНК, као и позитивна контрола, а количина је дефинисана оригиналним упутством произвођача.
 - Водити рачуна да се прецизно пипетирају узорци при додавању у тубе са PCR реакционим миксом, и избјегавати задржавање узорака на зиду тубе.
 - Тубе треба чврсто затворити одмах након додавања узорака.
8. Након додавања свих узорака, потребно је пажљиво затворити и обиљежити стрипове. Чврсто затворене тубице ставити у малу центрифугу на неколико секунди како би оборили узорке на дно тубице и

Болница Бијељина	Страна 3 од 4	Издање:	Важи од:	МИ-10-034
		1	2021-05-11	

	потом их на кулеру (хладни носач за тубице) однијети до PCR апарата, те их пажљиво ставити у апарат водећи рачуна да се избјегне свака потенцијална контаминација апарата. 9. Након тога покренути PCR реакцију. Поставке реакције (термални профил, читавање флуоресценције) претходно извршити према упутствима произвођача датог кита. 10. Радну површину и лабораторијски прибор треба редовно, након сваке употребе, чистити и дезинфиковати 75% алкохолом и УВ свјетлом. - По завршетку циклуса, не отварати реакционе тубе, да не би дошло до контаминације, и одбацити их у складу са локалним препорукама и прописима. За прецизније инструкције за поставку PCR реакције погледати оригинално упутство произвођача датог кита. Сва упутства се чувају у лабораторији у оригиналном и/или преведеном издању.
Трајање анализе	Дефинисано упутством УП-10-135: Узимање и транспорт узорака за микробиолошку дијагностику.
Тумачење резултата	Да би се добијени резултати сматрали валидним, неопходно је да прво буду задовољени следећи услови: 1. Негативна и позитивна контрола морају бити у опсегу дефинисаном од стране произвођача кита. 2. Сваки узорак пацијента мора да даје амплификациони сигнал интерне контроле, која може бити хуманог поријекла или вјештачки конструкт Уколико су ови услови задовољени, може се приступити тумачењу резултата. Тумачење резултата се врши према оригиналном упутству произвођача за дати кит.
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	Све процедуре радити у лабораторијском заштитном мантилу и са рукавицама без пудера. Припрема мастер микс-а се одвија унутар PCR кабинета (DNK/RNK UV-Cleaner box). PCR кабинет је потребно укључити 10 минута прије почетка рада (УВ лампу и ламинарни ток ваздуха), након што смо претходно 70% алкохолом дезинфиковали све радне површине, аутоматске пипете, вортекс, центрифугу. Након завршетка припреме мастер микс-а поново дезинфиковати 70% алкохолом све унутар коморе и подесити УВ лампу на 10 минута. Радно мјесто за спајање узорака и мастер микс-а је потребно прије и након рада дезинфиковати 70% алкохолом (радна површина, спинер, аутоматске пипете).
Деконтаминација	Аутоклавирање
Литература	Приручник Taq PCR Handbook, QIAGEN, oktobar 2010 Оригинално упутство произвођача PhoenixDx® 2019-nCoV Оригинално упутство произвођача PhoenixDx® SARS-CoV-2 Multiplex IVD Оригинално упутство произвођача Liferiver Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real Time Multiplex RT PCR kit Оригинално упутство произвођача BGI REAL-TIME FLUORESCENTNI

Болница Бијељина	Страна 4 од 4	Издање:	Важи од:	МИ-10-034
		1	2021-05-11	

	RT-PCR KIT ZA DETEKCIJU 2019-NCOV
Скраћенице	РНК – дезоксирибонуклеинска киселина, ДНК- дезоксирибонуклеинска киселина, PCR- ланчана реакција полимеразе
Љекар	Др Санда Лазић, др Ирена Сефер

