

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «Альгимед Техно»



Лютынский В.В.

«24» сентября 2023 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для оценки состояния
эпителия шейки матки и степени тяжести
цервикальной дисплазии «NOVAprep miR-
CERVIX» по ТУ 21.20.23-005-57564538-2022, в
вариантах исполнения

ВНИМАНИЕ!

Изучите инструкцию перед
началом работы



ООО «Альгимед Техно»
123007, Российская Федерация,
г. Москва, ул. 1-я Магистральная,
дом 18, строение 1, этаж 2,
комната № 25

techno@algimed.com

+7 910 428 43 45

МИ	– медицинское изделие
ВПЧ	– вирус папилломы человека
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	– рибонуклеиновая кислота
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РШМ	– рак шейки матки
НК	– нуклеиновые кислоты
ОТ	– обратная транскрипция
ЭК	– эндогенный контроль
ВКО	– внутренний контрольный образец

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов предназначен для оценки степени тяжести цервикальной дисплазии путем полуколичественного анализа шести маркерных молекул микроРНК в материале цервикального мазка женщин от 20 до 50 лет методом обратной транскрипции и последующей полимеразной цепной реакции в рамках вспомогательной диагностики.

Описание

Медицинское изделие (МИ) позволяет проводить полуколичественный анализ концентраций шести молекул малых регуляторных РНК (микроРНК): hsa-miR-21-5p (MIMAT0000076); hsa-miR-29b-3p (MIMAT0000100); hsa-miR-145-5p (MIMAT0000437); hsa-miR-451a-5p (MIMAT0001631); hsa-miR-1246-5p (MIMAT0005898); hsa-miR-1290-3p (MIMAT0005880) в материале мазка цервикального эпителия.

МИ позволяет проводить оценку степени тяжести дисплазии эпителия цервикального канала.

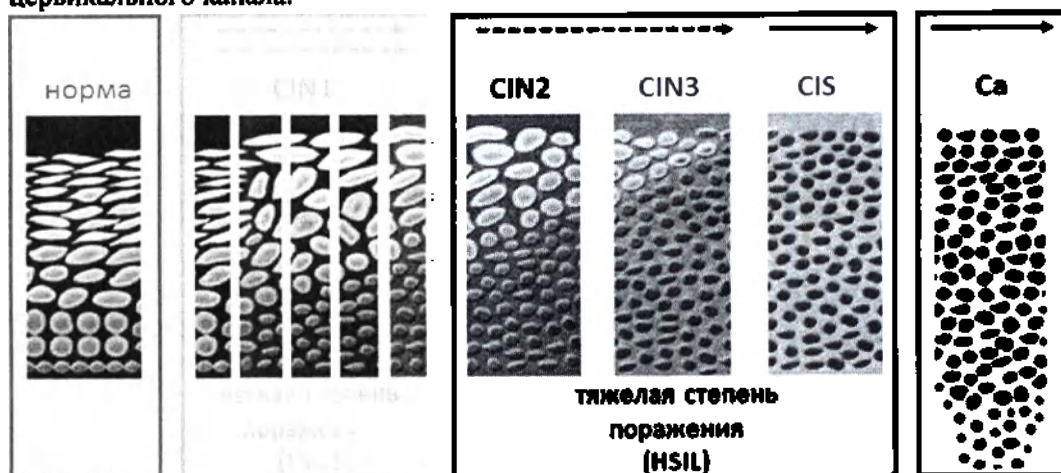


Рисунок 1. Принцип дифференциальной диагностики с помощью набора NOVAprep miR-CERVIX

Набор реагентов NOVAprep miR-CERVIX может быть использован самостоятельно или в сочетании с традиционными методами диагностики (стандартная/жидкостная цитология, ВПЧ-тест). Набор реагентов NOVAprep miR-CERVIX предполагает анализ биологических образцов (клеток цервикального эпителия), полученных в рамках гинекологического обследования с помощью стандартной цервикальной щетки (Cytobrush) или щетки, используемой с целью получения материала для жидкостной цитологии.

Набор реагентов NOVAprep miR-CERVIX позволяет проводить оценку степени диспластических изменений цервикального эпителия по шкале значений от 0 до 1, что обеспечивает возможность его использования для решения ряда клинических задач:

- Первичный скрининг диспластических (предраковых) изменений цервикального эпителия – выявление состояний, требующих уточняющей диагностики, наблюдения и/или лечения. Специфичность анализа – 80%, чувствительность 80%.

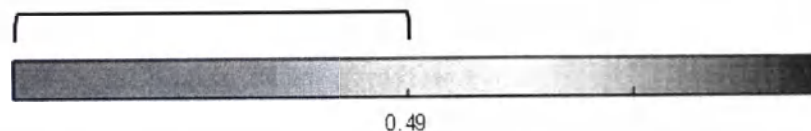


Рисунок 2. Принцип применения набора NOVAprep miR-CERVIX для скрининга цервикальных дисплазий

- Динамическое наблюдение пациенток с дисплазией цервикального эпителия легкой степени тяжести (CIN1 / LSIL) и оценка эффективности проводимого консервативного лечения.

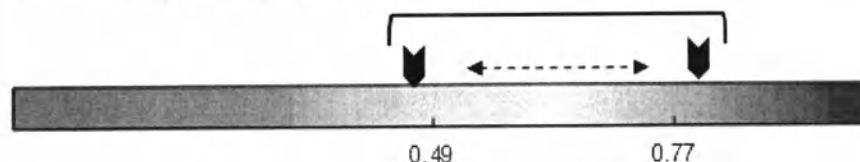


Рисунок 3. Принцип применения набора NOVAprep miR-CERVIX для динамического контроля

- Диагностика дисплазии тяжелой степени и выбор тактики лечения (консервативное vs оперативное). Специфичность анализа 98%, чувствительность – 70%.



Рисунок 4. Принцип применения набора NOVAprep miR-CERVIX для диагностики цервикальных дисплазий тяжелой степени

Диагностическая ценность результатов, полученных с помощью набора, валидирована на европейской популяции СНГ (северо-западный округ РФ, Республика Беларусь).

Краткое описание

МикроРНК (микроРНК) – это короткие молекулы РНК, регулирующие экспрессию генов на пост-транскрипционном уровне. Для клеток разных тканей характерен специфический набор (профиль) молекул микроРНК. Изменение профиля микроРНК наблюдается при развитии различных заболеваний. Поверхность цервикального канала выстлана многослойным плоским эпителием. Нарушение структуры и полиморфизм клеток эпителия обозначается термином «дисплазия». Дисплазия цервикального эпителия может прогрессировать, приводя к злокачественной трансформации отдельных клеток и развитию рака шейки матки. Прогрессия патологических изменений цервикального эпителия от дисплазии легкой степени (LSIL) до дисплазии тяжелой степени (HSIL) могут приводить к развитию внутри-эпителиальной карциномы (CIS) и инвазивного рака шейки матки. Этот процесс сопровождается характерными и прогрессирующими изменениями профиля



ООО «Альгимед Техно»
123007, Российская Федерация,
г. Москва, ул. 1-я Магистральная,
дом 18, строение 1, этаж 2,
комната № 25

techno@algimed.com

+7 910 428 43 45

ALGIMED TECHNO

экспрессии молекул микроРНК в клетках эпителия. Изменения отдельных молекул имеют известный характер, степень этих изменений коррелирует со степенью дисплазии цервикального эпителия, а их оценка имеет диагностический потенциал. Более того, профиль экспрессии молекул микроРНК в клетках цервикального эпителия при обратимом состоянии легкой степени дисплазии имеет прогностическое значение. Набор реагентов «NOVAPrep miR-CERVIX» позволяет провести оценку относительных изменений концентрации шести молекул микроРНК в материале цервикального мазка методом обратной транскрипции и последующей ПЦР. Алгоритм анализа результатов позволяет провести оценку степени тяжести цервикальной дисплазии и представить результат в виде численного критерия NOVAPrep miR-CERVIX, значение которого меняется в диапазоне от 0 до 1.

2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ. ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

Область применения

Амбулаторная гинекология. МИ может применяться для выявления предраковых патологий и рака шейки матки у женщин от 20 до 50 лет; для оценки / мониторинга состояния цервикального эпителия в случае длительной бессимптомной инфекции ВПЧ; для оценки эффективности консервативных методов лечения дисплазии легкой степени (LSIL) и для диагностики дисплазии тяжелой степени, предполагающей активную (оперативную) лечебную тактику.

Пользователи

Лаборатории клинической диагностики (самостоятельные организации или в составе стационаров, поликлиник), обслуживающие медицинские учреждения гинекологического профиля: женские консультации, отделения гинекологии в составе многопрофильных медицинских учреждений.

К пользованию набором допускаются лица с соответствующей профессиональной подготовкой - медицинские специалисты и биологи.

3. ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Регулярный скрининг, диагностика и мониторинг рака шейки матки (далее по тексту - РШМ) у здоровых женщин от 20 до 50 лет; позитивный результат ВПЧ-теста без видимых изменений цервикального эпителия; легкая дисплазия цервикального эпителия на фоне/после проведения консервативного лечения, уточняющая диагностика дисплазии тяжелой степени в рамках определения тактики лечения.

4. ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Беременность, ранний послеродовой период, измененная анатомия цервикального канала в результате ранее проведенных операций, острые и хронические воспалительные заболевания органов женской репродуктивной системы неспецифической этиологии (оофорит, эндометрит, эндоцервицит, цистит,

Альгимед Техно»

Российская Федерация,
кв.а, ул. 1-я Магистральная,
3, строение 1, этаж 2,
эта № 25

info@algimed.com

10 428 43 45

вагинит), венерические заболевания, применение лечебных или контрацептивных вагинальных суппозиториев.

Предупреждения и меры предосторожности

При работе с биологическим материалом (образцами цервикального эпителия) необходимо соблюдение мер безопасности, соответствующих работе с потенциально инфицированным материалом.

5. СОСТАВ И КОМПЛЕКТНОСТЬ

Состав набора может варьироваться в зависимости от вариантов исполнения набора, указанных в Главе 5. Выбор комплектации определяется планируемым количеством исследований и используемым методом пробоподготовки (выделения нуклеиновых кислот). Состав наборов реагентов представлен в таблице 1А.

Таблица 1А. Состав наборов реагентов NOVAprep miR-CERVIX

Наименование и вариант исполнения	Компоненты, комплектующие
Набор реагентов для оценки состояния эпителия шейки матки и степени тяжести цервикальной дисплазии «NOVAprep miR-CERVIX» по ТУ 21.20.23-005-5756438-2022, вариантах исполнения: I. Вариант исполнения 1 (на 12 образцов)	Комплект 1 1.1 Пробирка (2 мл) – 12 шт. 1.2 Транспортная среда (16 мл) – 1 флакон Комплект 2 2.1 Магнитный сорбент (150 мкл) – 1 пробирка 2.2 Буфер лизирующий (5,5 мл) – 1 флакон 2.3 Буфер промывочный № 1 (10 мл) – 1 флакон 2.4 Буфер промывочный № 2 (10 мл) – 1 флакон 2.5 Буфер элюирующий (1,5 мл) – 1 флакон Комплект 3 3.1 Планшет для ОТ (96 x 14 мкл) – 1 шт. 3.2 Планшет для ПЦР (96 x 16 мкл) – 1 шт. 3.4 Плёнки для заклеивания планшетов – 2 шт. 4 Инструкция по применению 5 Паспорт качества
Набор реагентов для оценки состояния эпителия шейки матки и степени тяжести цервикальной дисплазии «NOVAprep miR-CERVIX» по ТУ 21.20.23-005-5756438-2022, вариантах исполнения: II. Вариант исполнения 2 (на 48 образцов)	Комплект 1 1.1 Пробирка (2 мл) – 48 шт. 1.2 Транспортная среда (32 мл) – 2 флакона Комплект 2 2.1 Магнитный сорбент (550 мкл) – 1 пробирка 2.2 Буфер лизирующий (22 мл) – 1 флакон 2.3 Буфер промывочный № 1 (40 мл) – 1 флакон 2.4 Буфер промывочный № 2 (40 мл) – 1 флакон 2.5 Буфер элюирующий (6 мл) – 1 флакон Комплект 3 3.1 Планшет для ОТ (96 x 14 мкл) – 4 шт. 3.2 Планшет для ПЦР (96 x 16 мкл) – 4 шт. 3.3 Плёнки для заклеивания планшетов – 8 шт. 4 Инструкция по применению 5 Паспорт качества



ООО «Альгимед Техно»
123007, Российская Федерация,
г. Москва, ул. 1-я Магистральная,
дом 18, строение 1, этаж 2,
комната № 25

techno@algimed.com

+7 910 428 43 45

Альгимед Техно
Российская Федерация,
сва, ул. 1-я Магистральная,
строение 1, этаж 2,
та № 25

no@algimed.com

to 428 43 45

Наименование и вариант исполнения	Компоненты, комплектующие
Набор реагентов для оценки состояния эпителия шейки матки и степени тяжести цервикальной дисплазии «NOVAprep miR-CERVIX» по ТУ 21.20.23-005-57564538-2022, вариантах исполнения: III. Вариант исполнения 3 (на 48 образцов)	Комплект 1 1.1 Пробирка (2 мл) – 48 шт. 1.2 Транспортная среда (32 мл) – 2 флакона Комплект 2 2.1 Буфер для разведения (6 мл) – 1 флакон 2.2 Буфер лизирующий (48 x 0,4 мл) – 1 планшет 2.3 Буфер промывочный № 1 (48 x 0,7 мл) – 1 планшет 2.4 Буфер промывочный № 2 (48 x 0,7 мл) – 1 планшет 2.5 Буфер элюирующий (48 x 0,1 мл) – 1 планшет Комплект 3 3.1 Наконечники для выделения – 1 шт. 3.2 Планшет для ОТ (96 x 14 мкл) – 4 шт. 3.3 Планшет для ПЦР (96 x 16 мкл) – 4 шт. 3.4 Плёнки для заклеивания планшетов – 8 шт. 4 Инструкция по применению 5 Паспорт качества
Набор реагентов для оценки состояния эпителия шейки матки и степени тяжести цервикальной дисплазии «NOVAprep miR-CERVIX» по ТУ 21.20.23-005-57564538-2022, вариантах исполнения: IV. Вариант исполнения 4 (на 96 образцов)	Комплект 1 1.1 Пробирка (2 мл) – 96 шт. 1.2 Транспортная среда (32 мл) – 4 флакона Комплект 2 2.1 Магнитный сорбент (1,1 мл) – 1 пробирка 2.2 Буфер лизирующий (44 мл) – 1 флакон 2.3 Буфер промывочный № 1 (40 мл) – 2 флакона 2.4 Буфер промывочный № 2 (40 мл) – 2 флакона 2.5 Буфер элюирующий (12 мл) – 1 флакон Комплект 3 3.1 Планшет для ОТ (96 x 14 мкл) – 8 шт. 3.2 Планшет для ПЦР (96 x 16 мкл) – 8 шт. 3.3 Плёнки для заклеивания планшетов – 16 шт. 4 Инструкция по применению 5 Паспорт качества
Набор реагентов для оценки состояния эпителия шейки матки и степени тяжести цервикальной дисплазии «NOVAprep miR-CERVIX» по ТУ 21.20.23-005-57564538-2022, вариантах исполнения: V. Вариант исполнения 5 (на 96 образцов)	Комплект 1 1.1 Пробирка (2 мл) – 96 шт. 1.2 Транспортная среда (32 мл) – 4 флакона Комплект 2 2.1 Буфер для разведения (12 мл) – 1 флакон 2.2 Буфер лизирующий (96 x 0,4 мл) – 1 планшет 2.3 Буфер промывочный № 1 (96 x 0,7 мл) – 1 планшет 2.4 Буфер промывочный № 2 (96 x 0,7 мл) – 1 планшет 2.5 Буфер элюирующий (96 x 0,1 мл) – 1 планшет 2.6 Наконечники для выделения – 1 шт. Комплект 3 3.1 Планшет для ОТ (96 x 14 мкл) – 8 шт. 3.2 Планшет для ПЦР (96 x 16 мкл) – 8 шт. 3.3 Плёнки для заклеивания планшетов – 16 шт. 4 Инструкция по применению 5 Паспорт качества

* В состав каждого 96-луночного планшета для ОТ входит 12 стрипов по 8 лунок. Семь из восьми лунок содержат оптимизированную по составу смесь компонентов реакции обратной транскрипции.

** В состав каждого 96-луночного планшета для ПЦР входит 12 стрипов по 8 лунок. Семь из восьми лунок содержат идентичную реакционную смесь, содержащую HS-Taq ДНК-полимеразу и все необходимые компоненты для проведения амплификации нуклеиновых кислот. Восьмая лунка каждого стрипа содержит раствор компонентов для амплификации уникального фрагмента геномной ДНК, которая проводится для оценки качества анализируемого материала.

6. ПРИНЦИП МЕТОДА РАБОТЫ

Исследование предполагает следующие этапы (Рисунок 5):



Рисунок 5. Этапы проведения исследования

1. Получение биологического материала (соскоб цервикального эпителия) проводится в клиническом учреждении в рамках гинекологического обследования традиционным методом с помощью цервикальной щетки (cytobrush) может быть выполнено одновременно с получением материала для последующего проведения цитологического исследования (традиционная или жидкостная цитология) или только для проведения последующего анализа микроРНК.

2. Полученный материал (клеточная суспензия в транспортной среде) может храниться до 14 дней при +4°C или доставляется в лабораторию для проведения исследования.

3. Отделение клеточного осадка от транспортной среды путем центрифугирования и визуальная оценка количества биологического материала.



ООО «Альгимед Техно»
123007, Российская Федерация,
г. Москва, ул. 1-я Магистральная,
дом 18, строение 1, этаж 2,
комната № 25

techno@algimed.com

+7 910 428 43 45

лунок.
ентов
лунок.
ю HS-
едения
держит
ДНК,

ALGIMED
TECHNO

4. Выделение тотального пула молекул нуклеиновых кислот (ДНК/РНК). Для этого проводится обработка клеточного осадка лизирующим раствором, который разрушает клеточные мембраны и комплексы ДНК и РНК с белковыми молекулами, затем нуклеиновые кислоты (преимущественно молекулы среднего и малого размера) сорбируются на поверхность магнитных частиц. Последующие отмывки обеспечивают удаление клеточных компонентов. Обработка магнитных частиц раствором для элюции приводит к диссоциации нуклеиновых кислот, включая микроРНК, от поверхности частиц в элюирующий раствор.

5. Синтез ДНК, частично комплементарной детектируемой молекуле микроРНК. Реакция обратной транскрипции (ОТ) проводится с помощью микроРНК-специфичного праймера с двумя участками комплементарного взаимодействия с молекулой микроРНК. В результате реакции синтезируется молекула длиной 65-75 нуклеотидов. Затем проводится полимеразная цепная реакция (ПЦР) с помощью двух микроРНК-специфичных праймеров. Эффективность амплификации оценивается в режиме реального времени (real-time quantitative PCR) с помощью зондов, меченных флуоресцентным красителем (FAM). Одновременно проводятся две контрольные реакции: (1) контроль качества исследуемого материала и (2) контроль эффективности ферментативных реакций.

6. Анализ результатов включает последовательные этапы (i) оценки результатов контрольных реакций, (ii) оценки эффективности амплификации шести маркерных молекул микроРНК, (iii) расчет соотношений концентраций шести маркерных молекул микроРНК и комплексный анализ значений девяти диагностических параметров, (iv) вычисление значения численного параметра NOVAprep miR-CERVIX и графическое представление результата. Анализ результатов производится с помощью оценки показателя NOVAprep miR-CERVIX.

Результат представляется в виде цветной шкалы и обозначения позиции на этой шкале параметра NOVAprep miR-CERVIX, например:



Рисунок 6. Пример результата

7. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Требуемые материалы и оборудование, не поставляемые в наборе (ручной способ выделения нуклеиновых кислот)

- ламинарный бокс II или III класса биологической безопасности (например, BA safe производства Белаквилон, Беларусь или аналог);
- вортекс персональный (например, V1-plus, Biosan, Латвия или аналог)
- центрифуга со скоростью не менее 6000 g (например, центрифуга Microfuge 16, Beckman Coulter или аналог);
- термошейкер для микропробирок 1,5/2,0 мл с диапазоном поддержания температур 25-100°C (например, TS-100, Biosan, Латвия или аналог);
- холодильник с камерами, поддерживающими температуру от +2 до +8 °C (для хранения набора реагентов «NOVAprep miR-CERVIX», например, «Атлант», Беларусь или аналог);
- холодильник с камерами, поддерживающими температуру от +2 до +8 °C (для хранения препарата РНК, например, «Атлант», Беларусь или аналог). Не допускается хранение препарата РНК в одном холодильнике с компонентами набора для выделения РНК;

льного
еского
orush) и
ющего
костная

«Альгимед Техно»
07, Российская Федерация,
сква, ул. 1-я Магистральная,
18, строение 1, этаж 2,
ата № 25

hno@algimed.com

910 428 43 45

- микропипетки объемом 1,5/2,0 мл с замком Safe-Lock (например, Corning, США или аналогичные);
- штативы пластиковые для микропипеток объемом 1,5 мл/2,0 мл (например, Isolab, Турция или аналог);
- штатив магнитный для микропипеток объемом 1,5/2,0 мл;
- дозатор полуавтоматический переменного объема от 100 до 1000 мкл, аттестованный по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %) (например, Socorex, Швейцария или аналог);
- дозатор полуавтоматический переменного объема от 0,5 до 10 мкл, аттестованный по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %) (например, Socorex, Швейцария или аналог);
- дозатор полуавтоматический переменного объема от 0,5 до 10 мкл, аттестованный по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %) (например, Socorex, Швейцария или аналог);
- дозатор многоканальный на 8 образцов переменного объема от 5-50 мкл, аттестованный по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %) (например, производства Socorex, Швейцария или аналог);
- одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов объемом 1-10 мкл с маркировкой «RNAase-free, DNAase-free» (например, Corning, США или аналог);
- одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов объемом 5-50 мкл с маркировкой «RNAase-free, DNAase-free» (например, Corning, США или аналог);
- одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов объемом 100-1000 мкл с маркировкой «RNAase-free, DNAase-free» (например, Corning, США или аналог);
- средства индивидуальной защиты (одноразовые отдельный халат, шапочка маска, перчатки, бахилы);
- емкость с крышкой для дезинфицирующего раствора;
- центрифуга-вортекс для ПЦР-планшетов (например, центрифуга BioSan или аналог, опционально);
- амплификатор планшетного типа CFX96, CFX Opus, iQ5(Bio-Rad) или аналоги.

Требуемые материалы и оборудование, не поставляемые в набор (автоматический способ выделения нуклеиновых кислот):

- роботизированная автоматическая станция с возможностью работы магнитными частицами с обрабатываемым объемом 20-1000 мкл;
- ламинарный бокс II или III класса биологической безопасности (например, BA safe производства Белаквилон, Беларусь или аналог);
- центрифуга-вортекс с функцией центрифугирования и встряхивания (например, FVL-2400 производства Biosan, Латвия или аналог);
- центрифуга со скоростью не менее 6000 g (например, центрифуга Microfuge 16, Beckman Coulter или аналог);
- центрифуга-вортекс для ПЦР-планшетов (например, центрифуга BioSan или аналог, опционально);
- холодильник с камерами, поддерживающими температуру от +2 до +8 °C (для хранения набора реагентов «NOVAprep miR-CERVIX», например, производства «Атлант», Беларусь или аналог);
- холодильник с камерами, поддерживающими температуру от +2 до +8 °C (для хранения препарата РНК, например, производства «Атлант», Беларусь или аналог).



ООО «Альгимед Техно»
123007, Российская Федерация,
г. Москва, ул. 1-я Магистральная,
дом 18, строение 1, этаж 2,
комната № 25

techno@algimed.com

+7 910 428 43 45

orning,
0 мл
ALGIMED
ECHNO

или аналог). Не допускается хранение препарата РНК в одном холодильнике с компонентами набора для выделения РНК;

- штативы пластиковые для микропробирок объемом 1,5 мл/2,0 мл (например; производства Isolab, Турция или аналог);

- дозатор многоканальный на 8 образцов переменного объема от 5-50 мкл, аттестованный по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %) (например; производства Socorex, Швейцария или аналог);

- дозатор полуавтоматический переменного объема от 100 до 1000 мкл, аттестованный по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %) (например, производства Socorex, Швейцария или аналог);

- дозатор полуавтоматический переменного объема от 0,5 до 10 мкл, аттестованный по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %) (например, Socorex, Швейцария или аналог);

- дозатор полуавтоматический переменного объема от 5 до 50 мкл, аттестованный по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %) (например, Socorex, Швейцария или аналог);

- одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов объемом 100-1000 мкл с маркировкой «RNAase-free, DNAase-free» (например, производства Corning, США или аналог);

- одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов объемом 1-10 мкл с маркировкой «RNAase-free, DNAase-free» (например, Corning, США или аналог);

- одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов объемом 5-50 мкл с маркировкой «RNAase-free, DNAase-free» (например, Corning, США или аналог);

- одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов объемом 100-1000 мкл с маркировкой «RNAase-free, DNAase-free» (например, Corning, США или аналог);

- специализированные пластиковые расходные материалы, рекомендованные для работы с используемой роботизированной автоматической станцией;

- средства индивидуальной защиты (одноразовые отдельный халат, шапочка, маска, перчатки, бахилы);

- емкость с крышкой для дезинфицирующего раствора;

- амплификатор планшетного типа CFX96, CFX Opus, iQ5(Bio-Rad) или аналоги.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Взятие материала

Материал (соскоб цервикального эпителия) с шейки матки для исследования берется в гинекологическом кабинете врачом-гинекологом или акушеркой. В рамках одной процедуры материал может быть получен для проведения цитологического исследования и для анализа микроРНК набором NOVAprep miR-CERVIX.

«Альгимед Техно»
107, Российская Федерация,
Москва, ул. 1-я Магистральная,
18, строение 1, этаж 2,
кв. № 25

info@algimed.com

810 428 43 45

В случае получения материала **только** для анализа микроРНК необходимо:

- 1) Подготовить пробирку, поставляемую в составе набора NOVAprep miR-CERVIX, промаркировать её.
- 2) Дозировать в пробирку 1,25 мл транспортной среды.
- 3) Соскоб цервикального эпителия проводится цитощеткой (Cervix Brush или другой щеткой такого же типа) из цервикального канала. В цервикальном канале необходимо производить 4-5 вращательных движений цитощеткой.
- 4) Затем щетку поместить в пробирку с транспортной средой, держатель отрезать, пробирку с щеткой плотно закрыть и встряхнуть для равномерного распределения клеток в транспортной среде (**Рисунок 7**).

Важно!!! Не извлекать цитощетку из пробирки. Цитощетка должна быть погружена в транспортную среду.

Важно!!! Не допускать пересыхания цитощетки при транспортировке в лабораторию.

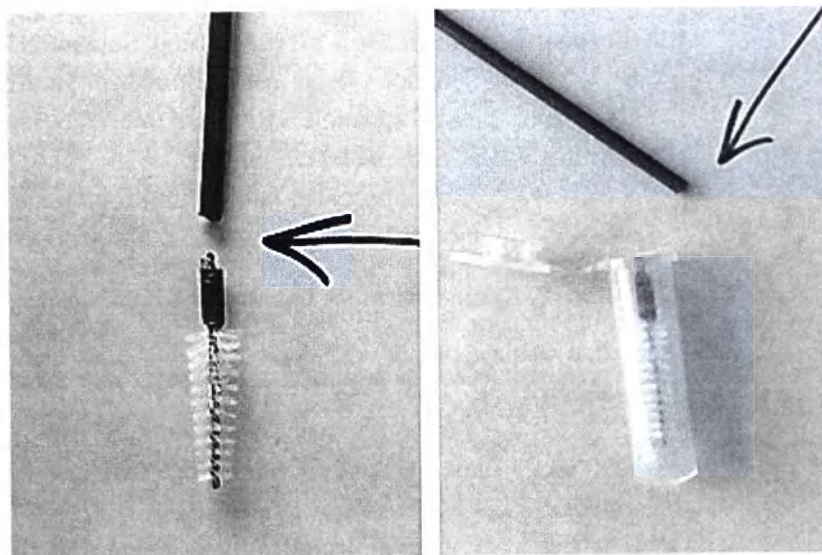


Рисунок 7. Способ подготовки материала для исследования

В случае получения материала одновременно для проведения стандартного цитологического исследования и анализа микроРНК необходимо:

- 1) Подготовить пробирку, поставляемую в составе набора NOVAprep miR-CERVIX, промаркировать её.
- 2) Дозировать в пробирку 1,5 мл транспортной среды.
- 3) Соскоб цервикального эпителия проводится цитощеткой (Cervix Brush или другой щеткой такого же типа) из цервикального канала. В цервикальном канале необходимо производить 4-5 вращательных движений цитощеткой, затем материал наносят на два стандартных маркированных стекла, которые используют для цитологического исследования.
- 4) После этого цитощетка с оставшимся на ней биологическим материалом помещают в пробирку с транспортной средой, держатель отрезают, пробирку с цитощеткой плотно закрыть и встряхнуть для равномерного распределения клеток в транспортной среде (**Рисунок 7**).



ООО «Альгимед Техно»
123007, Российская Федерация,
г. Москва, ул. 1-я Магистральная,
дом 18, строение 1, этаж 2,
комната № 25

techno@algimed.com

+7 910 428 43 45

ALGIMED TECHNO

В случае получения материала одновременно для проведения жидкостной цитологии и анализа микроРНК необходимо:

- 1) Отобрать образцы в соответствующие маркированные виалы, согласно методикам по пробоподготовке для жидкостной цитологии различных производителей (Рисунок 8).
- 2) Подготовить пробирку, поставляемую в составе набора NOVAprep miR-CERVIX, промаркировать её.
- 3) Тщательно перемешать взвесь клеток в виале.
- 4) **1,8 мл** взвеси переместить с помощью дозатора в пробирку.

Важно!!! При последовательном проведении жидкостной цитологии и анализа микроРНК с помощью набора NOVAprep miR-CERVIX необходимо исключить возможность перекрестной контаминации образцов.

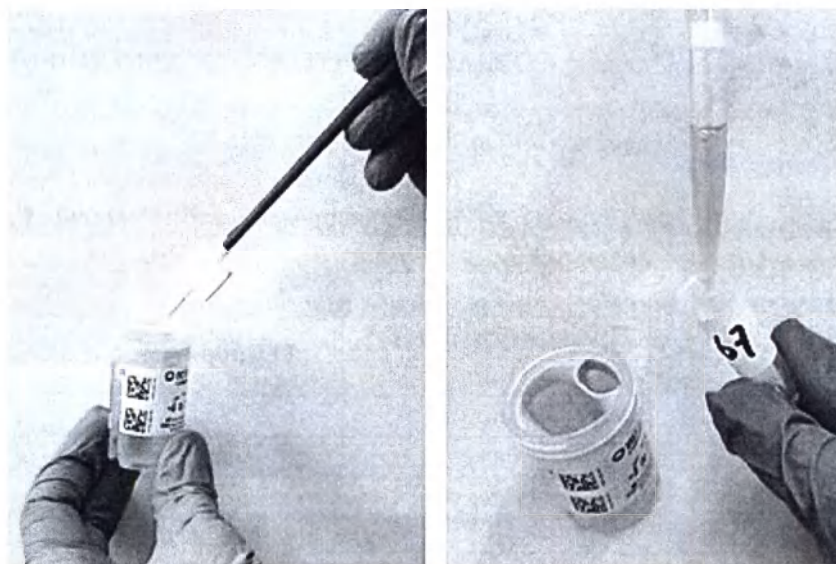


Рисунок 8. Способ подготовки материала для проведения жидкостной цитологии

Условия транспортировки

Образцы цервикального эпителия транспортируются в лабораторию при комнатной температуре, возможно хранение при +4 °C до 14 дней.

Меры предосторожности

При работе с биологическим материалом (образцами цервикального эпителия) необходимо соблюдение мер безопасности, соответствующих работе с потенциально инфицированным материалом.

ПОДГОТОВКА К ПРОВЕДЕНИЮ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

Набор реагентов NOVAprep miR-CERVIX предполагает проведение ферментативных реакций с помощью амплификаторов планшетного типа Bio-Rad CFX96/CFX Opus/iQ5.

Для проведения исследования амплификатор должен работать под управлением персонального компьютера, на котором установлена программа Bio-Rad CFX Manager/CFX Maestro.

Для проведения исследования возможно использование специального плагина (NOVAprep-miR analysis), альтернативно, исследование может быть

«Альгимед Техно»

107, Российская Федерация,
Москва, ул. 1-я Магистральная,
18, строение 1, этаж 2,
дата № 25

hno@algimed.com

910 428 43 45



ООО «Альгимед Техно»
123007, Российская Федерация,
г. Москва, ул. 1-я Магистральная,
дом 18, строение 1, этаж 2,
комната № 25

techno@algimed.com

+7 910 428 43 45

проведено после самостоятельного создания ПРОТОКОЛА (ОТ и ПЦР) ШАБЛОНА.

СОЗДАНИЕ ПРОТОКОЛА ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ (ОТ)

1. В стартовом окне программы Bio-Rad CFX Manager/CFX Maestro необходимо выбрать вкладку **File**.
2. В выпадающем списке выбрать **New**, а затем нажать **Protocol**
3. В появившемся окне **Protocol Editor – New** задать параметры реакции:
 - 25 °C - 45 минут
 - 85 °C - 5 минут
 - 8 °C - forever
4. Указать объем реакционной смеси – **20 мкл**
5. Задать имя протокола NOVAprep-miR-RT
6. Нажать **OK**.

СОЗДАНИЕ ПРОТОКОЛА АМПЛИФИКАЦИИ (ПЦР)

1. В стартовом окне программы Bio-Rad CFX Manager/CFX Maestro необходимо выбрать вкладку **File**.
2. В выпадающем списке выбрать **New**, а затем нажать **Protocol**
3. В появившемся окне **Protocol Editor – New** задать параметры реакции:

Продолжительность этапа	Температурный режим	Количество циклов
5 минут	95 °C	1
5 секунд	95 °C	45
15 секунд	60 °C	

4. Указать объем реакционной смеси: **20 мкл**.
5. Задать имя протокола NOVAprep-miR-PCR
6. Нажать **OK**.

СОЗДАНИЕ ШАБЛОНА ПЛАНШЕТА

1. В стартовом окне программы Bio-Rad CFX Manager/CFX Maestro необходимо выбрать вкладку **File**.
2. В выпадающем списке выбрать **New**, а затем нажать **Plate**
3. В появившемся окне **Plate Editor – New** задать расположение пробирок в модуле.
4. Нажав кнопку **Select Fluorophores**, выбрать галочками в колонке **Selected** флуорофоры: FAM, SYBR.
5. Нажать **OK**.
6. В меню **Sample type** выбрать **Unknown** для всех образцов.
7. Затем задать галочками в колонке **Load** (в правой части окна) измерение флуоресцентного сигнала:
 - все лунки A: SYBR green
 - все лунки B-H: FAM
8. В окне **Sample name** задать название образцов, при этом параметр **Load** должен быть отмечен галочкой.

ЦР) и
ALGIMED
TECHNO

Maestro

аметры

Maestro

аметры

лов

Maestro

ожение

колонке

и окна)

араметр

9. Сохранить схему планшета: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Plate Editor New**, ввести имя файла.
10. Нажать Сохранить

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Общие меры предосторожности

Применение набора реагентов NOVAprep miR-CERVIX требует соблюдения принципов надлежащей лабораторной практики, включая правила технического обслуживания оборудования, предусмотренных для молекулярной биологии и соответствующим действующим нормативным требованиям и стандартам.

Все этапы исследования необходимо проводить в неопудренных одноразовых перчатках, лабораторном халате и защитных очках.

Нельзя допускать микробного или нуклеазного (РНКазного) загрязнения образца и/или ферментных смесей в составе набора.

Необходимо использовать одноразовые наконечники для дозаторов с аэрозольным барьерным фильтром.

Перед началом работы необходимо убедиться в том, что срок годности набора реагентов NOVAprep miR-CERVIX не истек. Не используйте компоненты набора с истекшим сроком годности или компоненты, хранившиеся неправильно. Не рекомендуется комбинировать компоненты наборов разной комплектации или наборов из разных лотов, это может исказить результаты анализа.

Сведите к минимуму воздействие света на компоненты набора (особенно, смеси для ПЦР), это может привести к изменению характеристик реакционных смесей и флуоресцентных зондов.

Перед началом работы убедитесь в рабочем состоянии амплификатора, заранее создайте или убедитесь в наличии готовых шаблонов для проведения реакций (обратной транскрипции и ПЦР).

ПОДГОТОВКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

1 Подготовка комплекта реагентов для выделения нуклеиновых кислот

Набор реагентов извлекают из холодильника, не открывая индивидуальную упаковку, доводят температуру реагентов до комнатной.

При наличии кристаллов в лизирующем буфере прогреть содержимое флакона при 60 °С до полного их растворения.

При работе необходимо исключить прямое попадание солнечных лучей на компоненты набора реагентов.

Перед использованием жидкие реагенты необходимо перемешать путем осторожного вращения или переворачивания флаконов. Не допускается переливать обратно в оригинальные флаконы остатки реагентов, используемых при проведении исследования.

«Альгимед Техно»
17, Российская Федерация,
Москва, ул. 1-я Магистральная,
18, строение 1, этаж 2,
кв. № 25

info@algimed.com

810 428 43 45

2 Подготовка комплекта реагентов для ОТ и ПЦР

Необходимое количество «Планшетов для ОТ» и «Планшетов для ПЦР» (учитывая, что 1 планшет рассчитан на исследование 12 образцов) извлекают из морозильника за 30 минут до проведения исследования. Не снимая индивидуальную упаковку, размораживают при комнатной температуре.

После размораживания содержимое лунок необходимо осадить путем кратковременного центрифугирования.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Для проведения анализа микроРНК используется суспензия клеток цервикального эпителия в транспортной среде, входящей в состав набора. Оптимальное количество клеток для проведения исследования >50.000, что соответствует видимому осадку, который формируется на дне пробирки. Наличие в составе образца видимых сгустков слизи или крупных (>1 мм) фрагментов ткани недопустимо.

1. Приготовить клеточный осадок. Биологический материал (взвесь клеток цервикального эпителия) может поступать в лабораторию для проведения исследования в двух вариантах: в пробирке, содержащей транспортную среду (1,2 мл) и отрезанный конец цитощетки, и во флаконе (12-20 мл) для проведения жидкостной цитологии, содержащий взвесь клеток в транспортной среде.

- Для анализа образцов, полученных в пробирке с цитощеткой: течение 10 минут инкубировать цитощетку на вортексе, для отделения биологического материала от щетки. Цитощетку извлечь из пробирки, пробирку центрифугировать 10 минут со скоростью 6 000 g.

- Для анализа образцов, полученных во флаконе для жидкостной цитологии (12-20 мл): тщательно перемешать взвесь клеток, открыть флакон, 1,8 мл взвеси переместить с помощью дозатора в пустую пробирку, пробирку центрифугировать 10 минут со скоростью 6000 g.

2. Оценить визуально клеточный осадок. На дне пробирки должен формироваться видимый осадок, объемом 5 – 50 мкл. Количество клеток невидимым невооруженным глазом будет недостаточным для анализа. В этом случае, при наличии дополнительного объема клеточной взвеси, рекомендуется осадить клетки повторно в той же пробирке. Избыток клеток может привести к снижению качества выделения нуклеиновых кислот, в этом случае рекомендуется перемешать осадок, удалить часть взвеси и осадить клетки повторно.

3. В зависимости от способа выделения нуклеиновых кислот:

- Ручной способ выделения:

1) Приготовить смесь из буфера лизирующего и магнитного сорбента: рассчитать 400 мкл буфера лизирующего и 10 мкл магнитного сорбента на проведение одного выделения. При расчете необходимо учитывать запас на 1 образец больше.

2) К осадку клеток добавить приготовленную в п.1 смесь по 400 мкл в пробирку.

3) Плотно закрыть крышки пробирок, перемешать на вортексе.



ООО «Альгимед Техно»
123007, Российская Федерация,
г. Москва, ул. 1-я Магистральная,
дом 18, строение 1, этаж 2,
комната № 25

techno@algimed.com

+7 910 428 43 45

ПЦР» иот из льную

ALGIMED TECHNO

путем

клеток

абора.

), что

ичие в

ткани

взвесь

едения

у (1,25

едения

кой: в

еления

обирку

остной

1,8 мл

обирку

должен

димое

е, при

клетки

чества

осадок,

ента из

едение

ыше

0 МЛ В

«Альгимед Техно»

7, Российская Федерация,
Москва, ул. 1-я Магистральная,
зд. строение 1, этаж 2,
кв. № 25

info@algimed.com

810 428 43 45

- Способ выделения нуклеиновых кислот с помощью автоматических станций:
 - 1) К осадку клеток добавить 100 мкл буфера для разведения.
 - 2) Плотнo закрыть крышки пробирок, перемешать на вортексе.

ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Работа проводится в условиях, исключающих контаминацию реакционных смесей РНКазой.

Наборы реагентов NOVAprep miR-CERVIX предполагают либо ручной, либо автоматический способ выделения нуклеиновых кислот в зависимости от варианта исполнения. Выберите соответствующий протокол.

ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ (РУЧНОЙ СПОСОБ)

1. Пробирки, содержащие биологический образец, буфер лизирующий и магнитный сорбент, перемешать на вортексе и инкубировать в течение 10 минут при 60 °С.
2. После инкубации перемешать пробирки на вортексе, осадить капли кратковременным центрифугированием и поместить пробирки на магнитный штатив.
3. Когда частицы сформируют осадок, полностью удалить супернатант. Перенести пробирки на обычный штатив. Добавить 700 мкл буфера промывочного №1.
4. Перемешать пробирки на вортексе, осадить капли кратковременным центрифугированием и поместить пробирки на магнитный штатив.
5. Когда частицы сформируют осадок, полностью удалить супернатант. Перенести пробирки на обычный штатив. Добавить 700 мкл буфера промывочного №2.
6. Перемешать пробирки на вортексе, осадить капли кратковременным центрифугированием и поместить пробирки на магнитный штатив.
7. Когда частицы сформируют осадок, максимально тщательно удалить супернатант. Инкубировать до полного высыхания жидкости в течение 5 минут при 60° С с открытыми крышками. Не допускать пересушивания магнитных частиц, так как данный этап критичен для выделения чистого препарата нуклеиновых кислот.
8. Добавить в пробирки по 100 мкл буфера элюирующего.
9. Перемешать на вортексе и инкубировать в течение 5 минут при 60° С
10. После инкубации перемешать пробирки на вортексе, осадить капли кратковременным центрифугированием и поместить пробирки на магнитный штатив.
11. Когда частицы сформируют осадок, отобрать элюент и перенести в чистые пробирки
12. После отбора элюент содержит смесь высокоочищенных препаратов ДНК и РНК, которая готова к использованию в качестве матрицы в ОТ-ПЦР.

ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С ПОМОЩЬЮ АВТОМАТИЧЕСКИХ СТАНЦИЙ

1. Тщательно перемешать содержимое планшетов.
2. Добавить в каждую лунку планшета с лизирующим буфером и магнитным сорбентом по 100 мкл биологического образца.

3. Заклеить планшет пленкой / фольгой или подложкой для запечатывания. Перемешать на шейкере или при установке в автоматическую станцию в течение 1 минуты при максимальной скорости.
4. Включить автоматизированную станцию.
5. Загрузить в автоматизированную станцию на соответствующие позиции планшеты с промывочным буфером №1, №2, элюирующим буфером.

Важно!!! Данный этап необходим для работы со станциями высокой производительности на 96 образцов.

6. Загрузить в автоматизированную станцию планшеты с внесёнными биологическими образцами в лизирующий буфер, содержащий магнитный сорбент.
7. Загрузить наконечники для работы автоматизированной станции.
8. Со всех установленных планшетов снять защитные пленки/фольгу.
9. Загрузить на приборе необходимый протокол или задать протокол с пошаговым внесением пунктов для работы с планшетами, исключая этапы центрифугирования.

10. В конце протокола изъять планшеты с элюентом для постановки ОТ и ПЦР-реакций. Элюент содержит смесь высокоочищенных препаратов ДНК и РНК.

После отбора элюента в пробирки ДНК/РНК-пробы можно хранить в течение 4 часов при температуре от +2 °C до +8 °C или в течение 1 недели при температуре не выше (-16) °C.

ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ (ОТ)

В лунках планшета для обратной транскрипции содержатся все реагенты необходимые для проведения реакции. Каждый «стрип» из 8 лунок рассчитан на анализ одного образца биологического материала. Каждая из двенадцати лунок «А» содержит фермент – ревертазу, в количестве, достаточном для проведения семи реакций. В этой лунке проводится перемешивание фермента и образца. Затем равные объёмы этой смеси переносятся в семь лунок (В–Н), которые содержат специфические олигонуклеотиды (ОТ-праймеры), праймирующие реакции обратной транскрипции отдельных молекул микроРНК. В лунке «В» проводится контрольная реакция (ВКО, внутренний контрольный образец), необходимая для контроля эффективности ферментативных реакций, в лунках «С–Н» проводится реакция обратной транскрипции шести «маркерных» молекул микроРНК. Схема планшета представлена на **Рисунке 9**.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ОТ	ОТ	ОТ	ОТ	ОТ	ОТ	ОТ	ОТ	ОТ	ОТ	ОТ	ОТ
B	ВКО	ВКО	ВКО	ВКО	ВКО	ВКО	ВКО	ВКО	ВКО	ВКО	ВКО	ВКО
C	miR-1	miR-1	miR-1	miR-1	miR-1	miR-1	miR-1	miR-1	miR-1	miR-1	miR-1	miR-1
D	miR-2	miR-2	miR-2	miR-2	miR-2	miR-2	miR-2	miR-2	miR-2	miR-2	miR-2	miR-2
E	miR-3	miR-3	miR-3	miR-3	miR-3	miR-3	miR-3	miR-3	miR-3	miR-3	miR-3	miR-3
F	miR-4	miR-4	miR-4	miR-4	miR-4	miR-4	miR-4	miR-4	miR-4	miR-4	miR-4	miR-4
G	miR-5	miR-5	miR-5	miR-5	miR-5	miR-5	miR-5	miR-5	miR-5	miR-5	miR-5	miR-5
H	miR-6	miR-6	miR-6	miR-6	miR-6	miR-6	miR-6	miR-6	miR-6	miR-6	miR-6	miR-6

Рисунок 9. Схема планшета для обратной транскрипции в составе набора "NOVAprep miR CERVIX"



ООО «Альгимед Техно»
123007, Российская Федерация,
г. Москва, ул. 1-я Магистральная,
дом 18, строение 1, этаж 2,
комната № 25

techno@algimed.com

+7 910 428 43 45

й для
нескую
ующие
ысокой
нными
рбент.
ии.
льгу.
гокол с
этапы
и ОТ и
РНК.
ечение
ратуре

ALGIMED TECHNO

агенты,
тан на
ок «А»
я семи
равные
держат
ратной
ольная
нтроля
еакция
аншета

1. 96-луночный планшет для ОТ извлечь из холодильника за 30 минут до проведения исследования, осадить содержимое на дно лунок путем кратковременного центрифугирования.
2. В ламинарном боксе аккуратно снять защитную пленку / крышки: каждый планшет предполагает анализ 12 образцов биологического материала (маркировка стрипов от 1 до 12) (**Рисунок 9**);
3. К содержимому лунки «А» одного из двенадцати стрипов добавить **50 мкл** раствора нуклеиновых кислот аккуратно перемешать пипетированием (4-5 раз);
4. С помощью автоматического дозатора раскатать по **6 мкл** содержимого лунки «А» последовательно в лунки В, С, D, E, F, G, H (**Рисунок 10**).



Рисунок 10. Схема распределения смеси фермента и биологического материала по лункам планшета для ОТ

Важно!!! При использовании обычных одноканальных механических дозаторов - заменять наконечники после внесения материала в каждую лунку.

Важно!!! При использовании 12-канальных механических дозаторов - заменять наконечники после внесения материала в каждый горизонтальный ряд (В, С, D, E, F, G, H)

Важно!!! При использовании 1-канального электронного дозатора (типа Eppendorf Xplorer Plus) – использовать отдельный наконечник для каждого образца и НЕ касаться наконечником стенок отдельных лунок для исключения контаминации.

5. Повторить процедуру для других одиннадцати образцов.
6. Закрыть пробирки 96-луночного планшета клеящейся пленкой, осадить капли со стенок с помощью центрифуги-вортекс для планшетов.
7. Включить амплификатор, открыть готовый шаблон NOVAprep-miR-RT или создать в соответствии с Главой 8 инструкции по применению.
8. Открыть крышку прибора и поместить планшет в термоблок прибора.
9. Закрыть крышку прибора.
10. Запустить ранее созданный протокол «NOVAprep-miR-RT».
11. После завершения протокола извлечь планшет из термоблока прибора для дальнейшей работы.

«Альгимед Техно»
Российская Федерация,
Москва, ул. 1-я Магистральная,
зд. 1, строение 1, этаж 2,
кв. № 25

reprep miR-
mo@algimed.com
428 43 45

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ (ПЦР)

В лунках планшета для полимеразной цепной реакции содержатся все реагенты, необходимые для ее проведения, кроме образцов ДНК (кДНК, комплементарной ДНК), полученной в ходе реакции обратной транскрипции. Каждый «стрип» из 8 лунок рассчитан на анализ материала одного биологического образца, который должен быть перенесен из соответствующей лунки планшета для ОТ. В лунку А переносится смесь биологического образца и инактивированного фермента (ревертазы), и в этой лунке проводится амплификация уникального фрагмента геномной ДНК в анализируемом образце (эндогенный контроль), необходимый для контроля качества исследуемого материала.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ЭК	ЭК	ЭК	ЭК	ЭК	ЭК	ЭК	ЭК	ЭК	ЭК	ЭК	ЭК
B	ВКО	ВКО	ВКО	ВКО	ВКО	ВКО	ВКО	ВКО	ВКО	ВКО	ВКО	ВКО
C	miR-1	miR-1	miR-1	miR-1	miR-1	miR-1	miR-1	miR-1	miR-1	miR-1	miR-1	miR-1
D	miR-2	miR-2	miR-2	miR-2	miR-2	miR-2	miR-2	miR-2	miR-2	miR-2	miR-2	miR-2
E	miR-3	miR-3	miR-3	miR-3	miR-3	miR-3	miR-3	miR-3	miR-3	miR-3	miR-3	miR-3
F	miR-4	miR-4	miR-4	miR-4	miR-4	miR-4	miR-4	miR-4	miR-4	miR-4	miR-4	miR-4
G	miR-5	miR-5	miR-5	miR-5	miR-5	miR-5	miR-5	miR-5	miR-5	miR-5	miR-5	miR-5
H	miR-6	miR-6	miR-6	miR-6	miR-6	miR-6	miR-6	miR-6	miR-6	miR-6	miR-6	miR-6

Рисунок 11. Схема планшета для ПЦР в составе набора NOVAprep miR-CERVIX

1. 96-луночный планшет для ПЦР извлечь из холодильника за 30 минут до проведения исследования, осадить содержимое на дно лунок путем кратковременного центрифугирования;
2. В ламинарном боксе аккуратно снять защитную пленку с планшета, на котором была проведена реакция обратной транскрипции и защитную пленку крышки с планшета для ПЦР;
3. С помощью полуавтоматического 8-канального дозатора перенести по 4 мкл реакционной смеси ОТ (из планшета для ОТ) в соответствующие лунки планшета для ПЦР (Рисунок 11).

Важно!!! Рекомендуется использовать 8-канальный дозатор. При этом необходимо использовать отдельный комплект из 8 наконечников для каждого биологического образца (заменять наконечники после внесения материала в каждый вертикальный ряд 1-12).

4. Закрывать ПЦР-планшет прозрачной клеящейся пленкой, после чего осадить капли со стенок лунок с помощью центрифуги-вортекс для планшетов.

* Допускается закупоривание лунок планшета оптически прозрачными плоскими крышками для стрипованных пробирок.



ООО «Альгимед Техно»
123007, Российская Федерация,
г. Москва, ул. 1-я Магистральная,
дом 18, строение 1, этаж 2,
комната № 25

techno@algimed.com

+7 910 428 43 45

...применяется
...я шейки матки
...er miR-CERVIX
...05-57564538-2
...ся все
...кДНК,
...ипции.
...еского
...ета для
...анного
...льного
...троль),
...минут
...путем
...ета, в
...енку /
...нести
...лулки
...этом
...ждого
...ждый
...после
...и.
...ными

ALGIMED
TECHNO

5. Включить амплификатор, запустить программное обеспечение и выбрать готовый протокол “NOVAPrep-miR-PCR” или создать данный протокол в соответствии с Главой 8 инструкции по применению.

6. Указать идентификаторы образцов, сохранить имя шаблона с указанием даты и порядкового номера анализа (NOVAPrep-miR-PCR YYYY-MM-DD-N)

Открыть крышку прибора и поместить реакционные пробирки в термоблок амплификатора для проведения ПЦР в режиме «реального времени».

7. Закрыть крышку прибора и запустить выполнение протокола “NOVAPrep miR-CERVIX-PCR”.

8. Результаты анализируются только по завершению и выполнению протокола.

9. РЕГИСТРАЦИЯ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

Детекция сигнала амплификации ведется по каналам FAM/SYBR.

Полученные результаты анализируются с помощью программного обеспечения амплификатора.

После завершения реакции амплификации рекомендуется проверить правильность автоматического выбора пороговой линии для каждого канала. Пороговая линия должна пересекать только S-образные (сигмообразные) кривые накопления сигнала образцов и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо установить вручную уровень пороговой линии для каждого канала.

Для этого нужно поставить галочку напротив пункта **Log Scale** (переключение в логарифмический вид) и установить уровень пороговой линии для каждого канала флуоресценции на таком уровне, где кривые флуоресценции носят линейный характер (Рисунок 12).

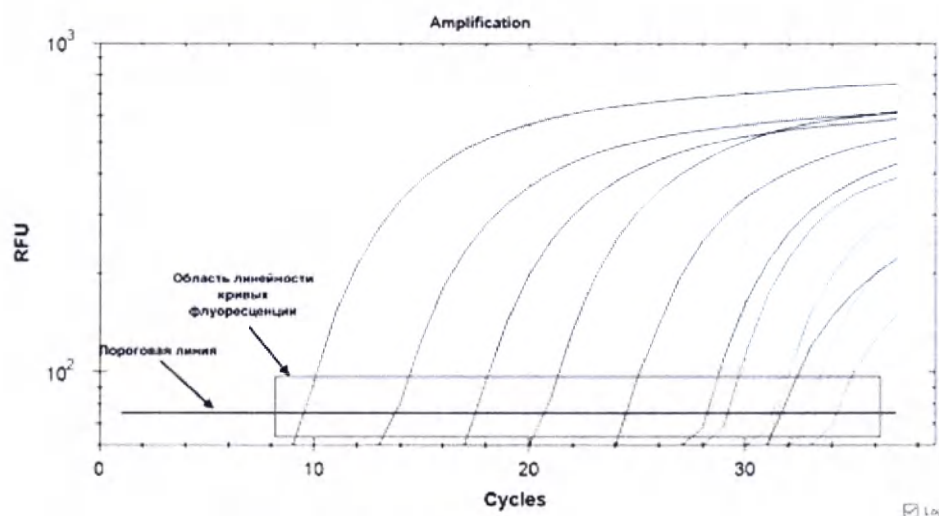


Рисунок 12. Выбор уровня пороговой линии

После оценки правильности пороговой линии, прибор (амплификатор) определяет значения Ct для восьми реакций (6 «маркерных» молекулы и два контроля). Результаты необходимо сохранить в формате Microsoft Excel и оценить параметр NOVAPrep miR-CERVIX.

«Альгимед Техно»
Российская Федерация,
Москва, ул. 1-я Магистральная,
строение 1, этаж 2,
кв. № 25

algimed.com

80 428 43 45

Варианты ответов:

1. Анализ не информативен. Возможна одна из двух или сочетание двух причин:

1.1. – Плохое качество и/или недостаточное количество биологического материала.

Рекомендуется взять материал повторно, проверить соответствие процедуры выделения протоколу.

1.2. – Неэффективность ферментативных реакций

Рекомендуется проверить срок годности набора, условия транспортировки и хранения, соответствие протоколу установленных условий ферментативных реакций и правильность работы амплификатора.

2. Анализ проведен успешно.

В этом случае результаты интерпретируются как:

NOVAprep miR-CERVIX: от 0,01 до 0,49

0,01 0,49

Профиль экспрессии шести маркерных молекул микроРНК соответствует нормальному состоянию цервикального эпителия (чувствительность – 80%, специфичность – 80%)

NOVAprep miR-CERVIX: от 0,50 до 0,77

0,50 0,77

Профиль экспрессии шести маркерных молекул микроРНК отражает переходное состояние цервикального эпителия, которое может соответствовать дисплазии легкой степени (CIN1 / LSIL).

Врачом может быть рекомендовано назначение консервативной терапии и повторной оценки состояния эпителия после ее проведения.

NOVAprep miR-CERVIX: от 0,78 до 0,99

0,78 0,99

Профиль экспрессии шести маркерных молекул микроРНК отражает состояние тяжелой дисплазии цервикального эпителия, которое может соответствовать цитологическому / морфологическому диагнозу (CIN2-CIN3 / HSIL).

Врачом может быть рекомендована оперативная тактика лечения. (чувствительность – 70%, специфичность – 97%)



ООО «Альгимед Техно»
123007, Российская Федерация,
г. Москва, ул. 1-я Магистральная,
дом 18, строение 1, этаж 2,
комната № 25

techno@algimed.com

+7 910 428 43 45

10. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Характеристики систем анализа отдельных молекул

Полуколичественный анализ шести маркерных молекул микроРНК производится путем последовательных реакций обратной транскрипции и ПЦР, инициация этих реакций происходит с помощью ДНК олигонуклеотидов оригинального дизайна.

Аналитическая чувствительность / специфичность анализа отдельных молекул обеспечивается оригинальным дизайном праймеров. Модельная (экспериментальная) аналитическая чувствительность отдельных систем определяется в диапазоне от 10^3 (hsa-miR-29b-3p) до 10^7 (hsa-miR-1290-3p) молекул / реакции. Специфичность анализа отдельных молекул была определена путем оценки эффективности ОТ-ПЦР анализа синтетических аналогов с измененной структурой: изменение последовательности аналита на 10% (2 нуклеотида из 20) приводило к снижению эффективности амплификации более чем на 20%.

Линейность результатов амплификации была протестирована с использованием серийных разведений синтетических аналогов маркерных молекул микроРНК. В каждом случае результаты были получены в пяти независимых экспериментах. Линейная амплификация для всех молекул микроРНК была зафиксирована в диапазоне $10^3 / 10^7 - 10^{13}$ молекул в реакции; физиологические / патологические колебания концентрации маркерных микроРНК в клетках цервикального эпителия находятся в рамках указанных диапазонов, что обеспечивает корректность проводимых измерений.

Воспроизводимость результатов анализа оценивалась путем повторного исследования одного образца нуклеиновых кислот (ДНК/РНК), выделенных из качественного образца цервикального эпителия или модельной суспензии клеток (HELA, 5×10^4). Допустимые колебания результатов анализа маркерных молекул микроРНК: 0.3 цикла.

Интерференция

Вещества, в количестве 0.1% от объема образца, такие как Хлоргексидин, Кетоканазол, Полижинакс, Тержинан, Вагинорм С, Лактожиналь, Эпиген Спрей, раствор Люголя влияют на результаты исследований и являются интерферирующими веществами в любой концентрации.

Контроль

С целью контроля в состав набора включены эндогенный контроль (ЭК), который необходим для контроля качества исследуемого материала и внутренний контрольный образец (ВКО), который необходим для контроля эффективности ферментативных реакций. В качестве ЭК проводится реакция амплификации не транскрибируемого фрагмента геномной ДНК (участок интрона гена beta actin), эффективность которой отражает качество смеси нуклеиновых кислот, использованной для анализа. В качестве ВКО проводится реакция ОТ-ПЦР анализа синтетической молекулы - аналога cel-miR-39-5p. Эффективность реакции амплификации ВКО является комплексным отражением эффективности ферментативных реакций (ОТ и ПЦР).

Клиническая (диагностическая) эффективность и специфичность.

Диагностическая чувствительность / специфичность выявления тяжелой дисплазии цервикального эпителия и/или рака шейки матки оценивалась на популяции пациенток с гистологически подтвержденным диагнозом ($n = 25$) и здоровых доноров ($n = 25$), соответственно составила 0,70 и 0,97.

Альгимед Техно»
Российская Федерация,
Москва, ул. 1-я Магистральная,
строение 1, этаж 2,
кв. № 25

info@algimed.com

8 495 428 43 45

11. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВКИ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

Срок годности

Срок годности не вскрытого МИ– 12 месяцев.

После вскрытия упаковки набора, не вскрытые компоненты могут храниться при указанных температурах хранения до окончания срока годности набора.

Срок годности после вскрытия индивидуальной упаковки компонентов и хранения при указанных температурах:

- Транспортная среда, магнитный сорбент, буфер для разведения, буфер лизирующий, буфер промывочный №1, буфер промывочный №2, буфер элюирующий – 1 месяц при соблюдении условий хранения и эксплуатации;
- ОТ-планшет, ПЦР-планшет – 48 часов при соблюдении условий хранения и эксплуатации;

Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Условия транспортировки и хранения

Наборы и комплектующие из них в транспортной упаковке транспортируются любым видом закрытого транспорта в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на данном виде транспорта в диапазоне температур, соответствующим условиям хранения.

Набор реагентов «NOVAprep miR-CERVIX» при транспортировке и хранении разукладывается согласно температурам хранения, указанным на маркировке:

– Комплект реагентов для забора материала и выделения нуклеиновых кислот – при температуре от +4 до +25 °С, стандартных условиях влажности, без доступа прямых солнечных лучей

– Комплект реагентов для ОТ-ПЦР – при температуре минус 20 °С, стандартных условиях влажности, без доступа прямых солнечных лучей.

Размораживание реагентов для ОТ-ПЦР при транспортировке недопустимо.

Наборы, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

Эксплуатация

Условия эксплуатации – при температуре от +18 до +25 °С.

Аликвотирование реагентов для ОТ и ПЦР недопустимо.

Наборы не требуют стерилизации, дезинфекции.



ООО «Альгимед Техно»
123007, Российская Федерация,
г. Москва, ул. 1-я Магистральная,
дом 18, строение 1, этаж 2,
комната № 25

techno@algimed.com

+7 910 428 43 45

АЛЬГИМЕД
ТЕХНО

ранится
ентов и
едения,
буфер
словий

КИТ.

наковке
вилами
пазоне

овке и
ным на

ИНОВЫХ
ти, без

с 20 °С,

стимо.
ежима,

12. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ, МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ, ПРЕДПРИНИМАЕМЫЕ В СЛУЧАЕ НЕОБХОДИМОСТИ МЕРЫ И ОГРАНИЧЕНИЯ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ IN VITRO.

Набор реагентов для оценки состояния эпителия шейки матки и степени тяжести цервикальной дисплазии «NOVAprep miR-CERVIX» и его компоненты предназначены только для лабораторного использования и не должны проглатываться.

При работе надевайте защитную одежду и перчатки.

13. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие выпускаемых товаров, настоящим техническим условиям при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями.

В случае невыполнения указанных условий изготовитель рекламаций не принимает и претензий не рассматривает.

14. РЕКЛАМАЦИИ

По вопросам эксплуатации и претензий по качеству медицинского изделия обращаться к производителю на территории РФ по адресу:

Общество с ограниченной ответственностью «Альгимед Техно» (ООО «Альгимед Техно»)

Адрес: 123007, Российская Федерация, город Москва, улица 1-я Магистральная, дом 18, строение 1, этаж 2, комната № 25

Тел.: +7 910 428 43 45

Почтовый адрес: 123007, г. Москва, улица 1-я Магистральная, дом 18, строение 1, этаж 2, комната № 25

E-mail: techno@algimed.com

www.algimed-techno.com

Сертифицированная система менеджмента качества, отвечающая требованиям ISO 9001-2015;

Сертифицированная система менеджмента качества, отвечающая требованиям ISO 13485-2016.

«Альгимед Техно»
123007, Российская Федерация,
улица 1-я Магистральная,
дом 18, строение 1, этаж 2,
комната № 25

techno@algimed.com

+7 910 428 43 45

15. СИМВОЛЫ НА УПАКОВКЕ ТОВАРА

Таблица 2. Символы и обозначения для наборов реагентов для оценки степени тяжести цервикальной дисплазии «NOVAprep miR-CERVIX», комплект 1, комплект 2.

Символ	Значение	Символ	Значение
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Температурный диапазон
	Изготовитель		Срок годности
	Дата изготовления		Обратитесь к инструкции по применению
	Код партии		Беречь от влаги
	Номер по каталогу		Не допускается воздействие солнечного света
	Легковоспламеняющиеся жидкости		

Таблица 3. Символы и обозначения для набора реагентов для оценки степени тяжести цервикальной дисплазии «NOVAprep miR-CERVIX», комплект 3.

Символ	Значение	Символ	Значение
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Температурный диапазон
	Изготовитель		Срок годности
	Дата изготовления		Обратитесь к инструкции по применению
	Код партии		Беречь от влаги
	Номер по каталогу		Не допускается воздействие солнечного света
	Не переворачивать		

16. УТИЛИЗАЦИЯ

Изделие необходимо утилизировать в соответствии с требованиями по обращению с медицинскими отходами, установленными СанПиН 2.1.7.2790-2010 от 12.12. 2010 для класса Б и другими нормативными актами Российской Федерации.

17. ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЗОПАСНОЙ КОМБИНАЦИИ И (ИЛИ) ИНФОРМАЦИЯ ОБ ИЗВЕСТНЫХ ОГРАНИЧЕНИЯХ ПО СОВМЕСТНОМУ ИСПОЛЬЗОВАНИЮ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

Ограничения отсутствуют.



ООО «Альгимед Техно»
123007, Российская Федерация,
г. Москва, ул. 1-я Магистральная,
дом 18, строение 1, этаж 2,
комната № 25

techno@algimed.com

+7 910 428 43 45

ALGIMED
CHNO

18. ПРОИЗВОДИТЕЛЬ

Общество с ограниченной ответственностью «Альгимед Техно» (ООО «Альгимед Техно»)

Адрес: 123007, Российская Федерация, город Москва, улица 1-я Магистральная, дом 18, строение 1, этаж 2, комната № 25

Тел.: +7 910 428 43 45

Почтовый адрес: 123007, г. Москва, улица 1-я Магистральная, дом 18, строение 1, этаж 2, комната № 25

E-mail: techno@algimed.com

www.algimed-techno.com

Сертифицированная система менеджмента качества, отвечающая требованиям ISO 9001-2015;

Сертифицированная система менеджмента качества, отвечающая требованиям ISO 13485-2016.

19. ДАННЫЕ О ВЫПУСКЕ ИЛИ ПОСЛЕДНЕМ ПЕРЕСМОТРЕ ИНСТРУКЦИИ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Выпуск инструкции по применению Вер.1.0 от 23.04.2022 г.

и по
10 от
ции.

ЦИИ
ИЯ
ЦИЯ
МУ

«Альгимед Техно»
17, Российская Федерация,
Москва, ул. 1-я Магистральная,
18, строение 1, этаж 2,
комната № 25

techno@algimed.com

+7 910 428 43 45

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью

14 (четырнадцать) листов

Генеральный директор

ООО "Альгимед Техно "

Лютынский В.В. _____

« 29 » 09 2023 года М.П.

