

1. 1990年12月1日以前



УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «ТестГен»
А. Н. Тороповский
«20» июня 2022 г.

**Набор реагентов для выявления мРНК
химерного гена *TMPRSS2-ERG*
и уровня относительной экспрессии гена *PCA3*
методом двустадийной мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ
«Проста-Тест-2.0»**

TY 21.20.23-027-97638376-2020

Версия 3 от 20.06.2022

ЭЛЕКТРОННАЯ КОПИЯ ОФОРМЛЕНА ЦЕНТРОМ ИСПЫТАНИЙ И РЕГИСТРАЦИИ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

Список сокращений

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

РПЖ	Рак предстательной железы
ПЦР	полимеразная цепная реакция
ОТ	обратная транскрипция
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК	комплиментарная ДНК
РНК	рибонуклеиновая кислота
ВКО	внутренний контрольный образец
ОКО	отрицательный контрольный образец
ПКО	положительный контрольный образец
КОЧ	контрольный образец для определения чувствительности

Содержание

Введение	5
1. Назначение.....	7
2. Принцип метода	7
3. Состав набора реагентов	10
4. Характеристики набора реагентов	14
5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов «Проста-Тест-2.0»	20
6. Меры предосторожности при работе с набором.....	20
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором	22
8. Анализируемые образцы	23
9. Проведение анализа	29
10. Регистрация и интерпретация результатов	34
11. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора	38
12. Утилизация	39
13. Гарантийные обязательства, контакты	40
Приложение А.....	41

Введение

Рак предстательной железы (РПЖ) – одно из наиболее распространённых онкологических заболеваний у мужчин. На начальных стадиях заболевание может протекать бессимптомно либо с симптоматикой, которая обусловлена сопутствующими, более распространёнными патологиями (хронический простатит и доброкачественная гиперплазия предстательной железы). Ранняя диагностика РПЖ позволяет провести своевременное лечение, которое способствует полному выздоровлению пациентов.

Целевые аналиты, выявляемые при помощи набора реагентов «Проста-тест-2.0», являются некодирующая мРНК гена *PCA3* и мРНК химерного гена *TMPRSS2-ERG*.

Научная обоснованность

Диагностическое действие тест-системы основано на выявлении двух молекулярно-генетических маркеров.

Химерный ген *TMPRSS2-ERG* является результатом процесса слияния андроген-регулируемого гена *TMPRSS2* с представителем онкогенного ETS семейства факторов транскрипции *ERG*, а ген *PCA3* может иметь повышенный уровень экспрессии в тканях предстательной железы при раке, следовательно, РНК-продукты этих генов могут присутствовать в моче и эякуляте пациентов с раком предстательной железы.

Выявление мРНК химерного гена *TMPRSS2-ERG* и определение относительного уровня экспрессии гена *PCA3* по отношению к уровню мРНК гена *KLK3* в биологическом образце может быть использовано для ранней неинвазивной диагностики рака предстательной железы и служить дополнительным критерием при назначении пациенту первичной или повторной биопсии предстательной железы^{1,2,3}.

¹ Пешков М.Н., Генерозов Э.В., Кострюкова Е.С. Эволюция маркеров рака предстательной железы // Клиническая лабораторная диагностика. – 2016. – №61 (3). – С. 132-140.

² Сивков А.В., Ефремов Г.Д., Михайленко Д.С., Григорьева М.В. Комбинация маркеров *PCA3* и *TMPRSS2-ERG* в ранней диагностике рака предстательной железы (обзор литературы) // Экспериментальная и клиническая урология. – 2014. – №3. – С. 20.27.

³ Клинические рекомендации "Рак предстательной железы" (утв. Минздравом России, год утверждения 2021 г.)

Область применения набора реагентов — клиническая лабораторная диагностика онкологических заболеваний

Показания и противопоказания к применению

Показания к применению: Набор реагентов «Проста-тест 2.0» рекомендуется использовать при обследовании мужчин в возрасте от 40 лет на наличие онкологических процессов предстательной железы перед назначением первичной или повторной биопсии.

Применяемый способ исследования РНК относится к неинвазивным процедурам, не несет угрозы здоровью человека и не вызывает осложнений.

Противопоказания к применению: при использовании специально обученным персоналом и с учетом применения по назначению не выявлены.

Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия:

Рекомендуется применять набор «Проста-тест 2.0» для обследования мужчин старше 40 лет

Стерильность: изделие не стерильно.

1. Назначение

Назначение:

Набор реагентов «Проста-Тест-2.0» предназначен для качественного выявления мРНК химерного гена *TMPRSS2-ERG* и определения уровня относительной экспрессии гена *PCA3* методом двустадийной мультиплексной обратной транскрипции — полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией (ОТ-ПЦР-РВ) в пробе РНК человека, выделенной из образцов свежего или фиксированного в среде для стабилизации и сохранения РНК клеточного осадка, полученного центрифугированием или фильтрованием утренней мочи, взятой без предварительного массажа простаты, или пробы мочи, взятой в любое время после пальцевого ректального массажа простаты при обследовании мужчин в возрасте от 40 лет на наличие онкологических процессов предстательной железы перед назначением первичной или повторной биопсии.

Функциональное назначение: полученные результаты могут использоваться для поддержки диагностики рака предстательной железы, а также получения дополнительного критерия при назначении первичной или повторной биопсии предстательной железы у мужчин в возрасте от 40 лет.

Потенциальные потребители медицинского изделия: набор предназначен для профессионального применения в медицинских учреждениях и клинко-диагностических лабораториях. Профессиональный уровень потенциальных потребителей — врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник.

2. Принцип метода

Метод

Двустадийная обратная транскрипция и последующая мультиплексная аллель-специфическая полимеразная цепная реакция в реальном времени с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Тип анализируемого образца

Материалом для проведения ОТ-ПЦР служат пробы РНК человека, выделенной из образцов свежего или фиксированного в среде для стабилизации и сохранения РНК клеточного осадка,

полученного центрифугированием или фильтрованием утренней мочи, взятой без предварительного массажа простаты, или пробы мочи, взятой в любое время после пальцевого ректального массажа простаты.

Принцип определения

Выявление мРНК химерного гена *TMPRSS2-ERG* и определение относительного уровня экспрессии гена *PCA3* основано на использовании метода обратной транскрипции и последующей полимеразной цепной реакции в реальном времени и включает в себя три этапа:

- 1) обратную транскрипцию (получение кДНК);
- 2) ПЦР-амплификацию ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в реальном времени;
- 4) интерпретацию результатов и расчёт относительного уровня экспрессии гена *PCA3*.

Экстракция РНК из исследуемого материала проводится с помощью рекомендованной процедуры выделения. Затем с полученными пробами РНК проводится реакция обратной транскрипции в реакционном буфере при помощи праймеров и фермента MMLV-ревертазы.

С полученными в результате обратной транскрипции пробами кДНК проводятся мультиплексные реакции амплификации участков транскриптов генов *PCA3*, *KLK3*, *TMPRSS2-ERG*, а также последовательности внутреннего контрольного образца (далее ВКО) в реакционном буфере при помощи специфичных к этим участкам ДНК праймеров и фермента Taq-полимеразы (см. раздел 9).

В составе реакционной смеси для амплификации присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени и разрушаются Taq-полимеразой, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции

флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени». Продукты амплификации гена *PCA3* и гена *TMPRSS2-ERG* регистрируются в разных пробирках по каналу, соответствующему флуорофору FAM/Green, продукты амплификации гена *KLK3* – по HEX/Yellow, продукты амплификации ВКО – по Cy5/Red (табл. 1).

Таблица 1 – Состав мультиплексов, входящих в набор

Мультиплекс (праймер-микс)	Канал, соответствующий флуорофору		
	FAM/Green	Cy5/Red	HEX/Yellow
PCA3+KLK3	PCA3	ВКО	KLK3
T2E+KLK3	T2E	ВКО	KLK3

ВКО (внутренний контрольный образец) позволяет оценить эффективность выделения РНК и возможного наличия ингибиторов в пробе, присутствие которых может привести к ложноотрицательным результатам.

Ограничения метода

Возможная причина получения ложноположительного результата – контаминация на этапе выделения ДНК или проведения реакции мультиплексной ПЦР. Ложноположительный результат может быть выявлен с помощью отрицательного контрольного образца.

Нарушение целостности упаковки при транспортировании.

Использование набора с истекшим сроком годности или условий хранения набора.

Нарушение условий хранения и транспортирования образцов.

Время проведения реакции обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией оставляет 2,5 -3 ч в зависимости от используемого амплификатора (без учета пробоподготовки).

3. Состав набора реагентов

Формы комплектации

Набор реагентов «Проста-Тест-2.0» выпускается в двух формах комплектации:

1. «Проста-Тест-2.0-12» для проведения 12 определений – рассчитан на проведение 12 реакций обратной транскрипции и 14 реакций ПЦР каждого мультиплекса, что соответствует определению 12 исследуемых образцов, положительного и отрицательного контрольных образцов при одновременной постановке или 4 исследуемых образцов, положительных и отрицательных контрольных образцов при единичных постановках.

2. «Проста-Тест-2.0-24» для проведения 24 определений – рассчитан на проведение 24 реакций обратной транскрипции и 26 реакции ПЦР каждого мультиплекса, что соответствует определению 24 исследуемых образцов, положительного и отрицательного контрольных образцов при одновременной постановке или 8 исследуемых образцов, положительных и отрицательных контрольных образцов при единичных постановках.

Состав набора

Таблица 2 – Состав формы комплектации «Проста-Тест-2.0-12»

Наименование комплекта	Описание	Количество, объём
ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 120 мкл
ОТ-ферменты	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 6 мкл
ОТ-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 114 мкл
ПЦР-буфер 5x	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 112 мкл
Праймер-микс PCA3	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	1 пробирка, 140 мкл
Праймер-микс T2E	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	1 пробирка, 140 мкл
ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 48 мкл
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 48 мкл

Примечание: Эксплуатационная документация (инструкция по применению и паспорт качества) не входит в состав изделия, но входят в комплект поставки изделия. Набор реагентов, для обеспечения соблюдения условий транспортирования, помещается в термоконтейнер пенополиуретановый многоразового использования для временного хранения и транспортирования с подготовленными хладоэлементами. Термоконтейнер вкладывается в коробку из картона, туда же помещается инструкция по применению и паспорт качества на каждую поставляемую партию изделия.

Таблица 3 – Состав формы комплектации «Проста-Тест-2.0-24»

Наименование комплекта	Описание	Количество, объём
ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 240 мкл
ОТ-ферменты	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 12 мкл
ОТ-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 228 мкл
ПЦР-буфер 5x	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 208 мкл
Праймер-микс PCA3	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	1 пробирка, 260 мкл
Праймер-микс T2E	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	1 пробирка, 260 мкл
ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 96 мкл
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 96 мкл

Примечание: Эксплуатационная документация (инструкция по применению и паспорт качества) не входит в состав изделия, но входят в комплект поставки изделия. Набор реагентов, для обеспечения соблюдения условий транспортирования, помещается в термоконтейнер пенополиуретановый многоразового использования для временного хранения и транспортирования с подготовленными хладоэлементами. Термоконтейнер вкладывается в коробку из картона, туда же помещается инструкция по применению и паспорт качества на каждую поставляемую партию изделия.

Внутренний контрольный образец (ВКО) готов к использованию и содержит армированную РНК с уникальной последовательностью в буферном растворе.

Ферменты обратной транскрипции (ОТ-ферменты) готовы к использованию и содержат ревертазу «RevM обратная транскрипция» с подавленной активностью РНКазы и повышенной термостабильностью и «РНазин ингибитор рибонуклеаз».

Буфер обратной транскрипции (ОТ-буфер) готов к использованию и содержит все необходимые компоненты для проведения реакции ОТ, включая смесь dNTP и праймеры для обратной транскрипции.

ПЦР-буфер 5x готов к использованию и содержит все основные реагенты, включая термостабильную ДНК-полимеразу с «горячим стартом», дезоксинуклеотидтрифосфаты, урацил-ДНК-гликозидазу и оптимизированный буфер.

Праймер-микс PCA3 готов к использованию и содержит в себе мультиплексную смесь праймеров и зондов:

1. Праймеры и зонды к гену *PCA3*, сверхэкспрессирующийся в тканях злокачественных опухолей предстательной железы. Детекция осуществляется по каналу FAM/Green.

2. Праймеры и зонды к гену *KLK3*, кодирующего белок ПСА и экспрессирующегося специфично в тканях предстательной железы. Детекция осуществляется по каналу HEX/Yellow.

3. Праймеры и зонды к внутреннему контрольному образцу (ВКО). Детекция осуществляется по каналу Cy5/Red.

Праймер-микс T2E готов к использованию и содержит в себе мультиплексную смесь праймеров и зондов:

1. Праймеры и зонды к гену *TMPRSS2-ERG*, экспрессирующегося в опухолевых тканях предстательной железы. Детекция осуществляется по каналу FAM/Green.

2. Праймеры и зонды к гену *KLK3*, кодирующего белок ПСА и экспрессирующегося специфично в тканях предстательной железы. Детекция осуществляется по каналу HEX/Yellow.

3. Праймеры и зонды к внутреннему контрольному образцу (ВКО). Детекция осуществляется по каналу Cy5/Red.

Положительный контрольный образец (ПКО) готов к использованию и представляет собой плазмидный вектор с

синтетическими вставками последовательностей, комплементарными РНК внутреннего контрольного образца и фрагментов генов *PCA3*, *KLK3* и *TMPRSS2-ERG* в ТЕ буфере (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА) с концентрацией 100 000 коп/мл.

Отрицательный контрольный образец (ОКО) готов к использованию и представляет собой деионизованную стерильную воду свободную от РНКаз.

Прохождение реакции по каналу HEX/Yellow $Cp \leq 35$ говорит о правильном заборе материала и о его достаточном количестве для проведения реакции. Значение порогового цикла реакции по каналу HEX/Yellow также используется для вычисления относительного уровня экспрессии гена *PCA3*.

Прохождение реакции по каналу FAM/Green в соответствующей пробирке говорит о наличии экспрессии генов *PCA3* и *TMPRSS2-ERG*.

Прохождение реакции по каналу Cy5/Red $Cp \leq 35$ говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов обратной транскрипции и ПЦР. При отсутствии реакции результат следует считать недостоверным, и в этом случае для данного исследуемого образца рекомендуется провести повторное исследование, начиная с забора биоматериала.

Положительный контрольный образец (ПКО) готов к использованию и представляет собой плазмидный вектор с синтетическими вставками ДНК, комплементарными РНК внутреннего контрольного образца и фрагментов генов *PCA3*, *KLK3* и *TMPRSS2-ERG*.

Отрицательный контрольный образец (ОКО) готов к использованию и представляет собой деионизованную стерильную воду свободную от РНКаз.

В составе набора отсутствуют лекарственные средства для медицинского применения, вещества человеческого или животного происхождения.

4. Характеристики набора реагентов

4.1 Технические и функциональные характеристики

Таблица 4

Наименование показателя	Характеристики и нормы	Пункт ТУ
1. Технические характеристики		
1.1 Внешний вид		
1.1.1 Форма комплектации «Проста-Тест-2.0-12»		
ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
ОТ- буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
ОТ-ферменты	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
ПЦР-буфер 5х	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс PCA3	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс T2E	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	Раздел 7, пункт 7.6
ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
1.1.2 Форма комплектации «Проста-Тест-2.0-24»		
ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
ОТ- буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
ОТ-ферменты	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
ПЦР-буфер 5х	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс PCA3	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс T2E	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	Раздел 7, пункт 7.6
ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
1.2. Комплектность	В соответствии с п. 1.4 ТУ 21.20.23-027-97638376-2020	Раздел 7, пункт 7.12
1.3. Маркировка	В соответствии с п. 4 ТУ 21.20.23-027-97638376-2020	Раздел 7, пункт 7.12
1.4. Упаковка	В соответствии с п. 5 ТУ 21.20.23-027-97638376-2020	Раздел 7, пункт 7.12
2. Функциональные характеристики		
2.1. Положительный результат с ПКО	Регистрация роста сигнала флуоресценции в пробирках с ПКО по каналам FAM/Green, HEX/Yellow и Cy5/Red, $Cp \leq 35$.	Раздел 7, пункт 7.8.2

2.2. Прохождение реакций с ВКО	Регистрация роста сигнала флуоресценции в пробирках с ВКО по каналу Cy5 $Cp \leq 35$.	Раздел 7, пункт 7.8.2
2.3. Отрицательный результат с ОКО	Рост сигнала флуоресценции в пробирках с ОКО по каналам FAM/Green, HEX/Yellow и Cy5/Red Cp отсутствует либо $Cp > 35$.	Раздел 7, пункт 7.8.2
2.4. Прохождение реакции в пробирках с КОЧ	В пробирках с КОЧ по каналам FAM, HEX и Cy5 во всех повторях (не менее 6) $Ct \leq 40$ и при значении стандартного отклонения в повторях КОЧ не более 5%.	Раздел 7, пункт 7.8.2
2.5. Прохождение реакции в образце ОКО+ВКО	Регистрация роста сигнала флуоресценции в пробирках с ОКО+ВКО по каналу Cy5 $Cp \leq 35$, и отсутствию выхода графиков по каналам FAM, HEX.	Раздел 7, пункт 7.8.2
2.6 Оценка относительного уровня экспрессии гена PCA3 в ПКО	Значение относительного уровня экспрессии гена PCA3 в пробирке с ПКО должно находиться в пределах $250 \leq R \leq 4000$	Раздел 7, пункт 7.8.2
2.7 Тест на правильность определения относительного уровня экспрессии гена PCA3	Полученное значение относительного уровня экспрессии гена PCA3 должно соответствовать относительному уровню экспрессии гена PCA3, полученному с помощью зарегистрированного набора сравнения, с допуском 10%.	Раздел 7, пункт 7.8.2
2.8 Тест на правильность качественного определения химерного гена TMPRSS2-ERG.	Полученный результат качественного определения химерного гена TMPRSS2-ERG должен соответствовать определению тканевой экспрессии химерного гена TMPRSS2-ERG, полученному с помощью зарегистрированного набора сравнения	Раздел 7, пункт 7.8.2

Примечание: 1) При проведении контрольной ПЦР в качестве КОЧ (контрольный образец для определения чувствительности) используют смесь плазмид с синтетическими вставками фрагмента геномной кДНК

вируса гепатита С и фрагмента генома бактериофага в 10 % ТЕ-буфере (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА) с концентрацией 250 копий в 1 мл каждой.

2) Тест на правильность определения относительного уровня экспрессии гена PCA3 и тест на правильность качественного определения химерного гена TMPRSS2-ERG проводится в ходе предварительных и технических испытаний.

4.2 Характеристики аналитической эффективности

4.2.1 Аналитическая специфичность

Специфичен по отношению к транскриптам генов *TMPRSS2-ERG*, *PCA3* и *KLK3* человека

Аналитическая специфичность целевых фрагментов генов *TMPRSS2-ERG*, *PCA3* и *KLK3* подтверждалась *in silico* с помощью ресурса BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.2.2 Аналитическая чувствительность

10 копий в 1 мкл раствора РНК

4.2.3 Прецизионность в условиях повторяемости

Для оценки прецизионности в условиях повторяемости положительный контрольный образец, контрольный образец чувствительности были исследованы по 10 повторов.

Данные по повторяемости получают внутри лаборатории для конкретного оборудования и внутри конкретной партии набора реагентов.

Для оценки прецизионности в условиях повторяемости рассчитывают среднее арифметическое выборки, дисперсию, среднеквадратическое отклонение и коэффициент вариации по полученным значениям в повторах контрольных образцов.

Результаты исследования показали, что коэффициент вариации в условиях повторяемости набора составляет не более 5%.

4.2.4 Прецизионность в условиях воспроизводимости

Оценку воспроизводимости тест-системы проводят аналогично расчёту прецизионности в условиях повторяемости (раздел 4.2.3.), однако для тестирования используют различные партии набора реагентов, реакции ставят в разных лабораториях, разные операторы, в разные дни, на разных ПЦР-амплификаторах (Блок воспроизводимости 1, Блок воспроизводимости 2, Блок воспроизводимости 3, Блок воспроизводимости 4).

При проведении прецизионности в условиях воспроизводимости наблюдалась полная внутрисерийная, межсерийная и межсерийная воспроизводимость, коэффициент вариации не превышает 5%.

4.3 Характеристики клинической эффективности:

Таблица 5 - Результаты диагностических характеристик Набора реагентов «Проста-Тест-2.0 при определении уровня относительной экспрессии гена PCA3

Амплификатор	Мультиплекс PCA3							
	Пробы свежего клеточного осадка утренней мочи (1-29)				Пробы клеточного осадка, фиксированного в среде для стабилизации и сохранения РНК, утренней мочи (30-58)			
	Количество наблюдений с положительными пробами	Количество наблюдений с отрицательными пробами	Диагностическая чувствительность с доверительной вероятностью 95 %	Диагностическая специфичность с доверительной вероятностью 95 %	Количество наблюдений с положительными пробами	Количество наблюдений с отрицательными пробами	Диагностическая чувствительность с доверительной вероятностью 95 %	Диагностическая специфичность с доверительной вероятностью 95 %
без предварительного массажа простаты								
ДТпрайм	18	38	90,0% (95% ДИ:68,3 0%-98,77%)	100% (95% ДИ:90,75 %-100%)	22	36	100% (95% ДИ:84,56 %-100%)	100% (95% ДИ:90,2 6%-100%)
CFX 96	18	38	90,0% (95% ДИ:68,3 0%-98,77%)	100% (95% ДИ:90,75 %-100%)	22	36	100% (95% ДИ:84,56 %-100%)	100% (95% ДИ:90,2 6%-100%)
Rotor-Gene Q	18	38	90,0% (95% ДИ:68,3 0%-98,77%)	100% (95% ДИ:90,75 %-100%)	22	36	100% (95% ДИ:84,56 %-100%)	100% (95% ДИ:90,2 6%-100%)
QuantStudio 5	18	38	90,0% (95% ДИ:68,3 0%-98,77%)	100% (95% ДИ:90,75 %-100%)	22	36	100% (95% ДИ:84,56 %-100%)	100% (95% ДИ:90,2 6%-100%)
после предварительного массажа простаты								
ДТпрайм	20	38	100% (95% ДИ:83,1 6%-100%)	100% (95% ДИ:90,75 %-100%)	22	36	100% (95% ДИ:84,56 %-100%)	100% (95% ДИ:90,2 6%-100%)

			100%)				100%)
CFX 96	20	38	100% (95% ДИ:83,1 6%- 100%)	100% (95% ДИ:90,75 %-100%)	22	36	100% (95% ДИ:84,56 %-100%)
Rotor- Gene Q	20	38	100% (95% ДИ:83,1 6%- 100%)	100% (95% ДИ:90,75 %-100%)	22	36	100% (95% ДИ:84,56 %-100%)
QuantStu dio 5	20	38	100% (95% ДИ:83,1 6%- 100%)	100% (95% ДИ:90,75 %-100%)	22	36	100% (95% ДИ:84,56 %-100%)

Таблица 6 - Результаты изучения диагностических характеристик Набора реагентов «Проста-Тест-2.0» при выявлении мРНК химерного гена TMPRSS2-ERG

Амплификатор	Мультиплекс <i>TMPRSS2-ERG</i>							
	Пробы свежего клеточного осадка утренней мочи (1-29)				Пробы клеточного осадка, фиксированного в среде для стабилизации и сохранения РНК, утренней мочи (30-58)			
	Количество наблюдений с положительными пробам	Количество наблюдений с отрицательными пробам	Диагностическая чувствительность с доверительной вероятностью 95 %	Диагностическая специфичность с доверительной вероятностью 95 %	Количество наблюдений с положительными пробам	Количество наблюдений с отрицательными пробам	Диагностическая чувствительность с доверительной вероятностью 95 %	Диагностическая специфичность с доверительной вероятностью 95 %
	без предварительного массажа простаты							
ДТпрайм	14	42	87,50% (95% ДИ:61,6 5%- 98,45%)	100% (95% ДИ:91,59 %-100%)	16	40	88,89% (95% ДИ:65,29 %- 98,62%)	100% (95% ДИ:91,1 9%- 100%)
CFX 96	14	42	87,50% (95% ДИ:61,6 5%- 98,45%)	100% (95% ДИ:91,59 %-100%)	16	40	88,89% (95% ДИ:65,29 %- 98,62%)	100% (95% ДИ:91,1 9%- 100%)
Rotor- Gene Q	14	42	87,50% (95% ДИ:61,6 5%- 98,45%)	100% (95% ДИ:91,59 %-100%)	16	40	88,89% (95% ДИ:65,29 %- 98,62%)	100% (95% ДИ:91,1 9%- 100%)
QuantStu	14	42	87,50%	100%	16	40	88,89%	100%

dio 5			(95% ДИ:61,6 5%- 98,45%)	(95% ДИ:91,59 %-100%)			(95% ДИ:65,29 %- 98,62%)	(95% ДИ:91,1 9%- 100%)
после предварительного массажа простаты								
ДТпрайм	16	42	100% (95% ДИ:79,4 1%- 100%)	100% (95% ДИ:91,59 %-100%)	18	40	100% (95% ДИ:81,47 %-100%)	100% (95% ДИ:91,1 9%- 100%)
CFX 96	16	42	100% (95% ДИ:79,4 1%- 100%)	100% (95% ДИ:91,59 %-100%)	18	40	100% (95% ДИ:81,47 %-100%)	100% (95% ДИ:91,1 9%- 100%)
Rotor- Gene Q	16	42	100% (95% ДИ:79,4 1%- 100%)	100% (95% ДИ:91,59 %-100%)	18	40	100% (95% ДИ:81,47 %-100%)	100% (95% ДИ:91,1 9%- 100%)
QuantStu dio 5	16	42	100% (95% ДИ:79,4 1%- 100%)	100% (95% ДИ:91,59 %-100%)	18	40	100% (95% ДИ:81,47 %-100%)	100% (95% ДИ:91,1 9%- 100%)

5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов «Проста-Тест-2.0»

В пограничную зону риска вошли опасности:

1. потеря функциональных свойств реагентов, входящих в набор, из-за нарушения условий транспортирования, хранения или эксплуатации,
2. загрязнение клинического материала ингибирующими веществами
3. контаминация реакционных смесей с образцами исследуемой РНК содержимым из пробирки ПКО, или продуктами ПЦР,
4. невыполнение требований по пробоподготовке, проведению анализов и утилизации вследствие работы с набором неквалифицированного персонала,
5. использование набора, непригодного для применения (использование по истечении срока годности или при нарушении упаковки).

В области недопустимой зоны риски не выявлены.

Совокупный остаточный риск применения медицинского изделия «Набор реагентов для выявления мРНК химерного гена *TMPRSS2-ERG* и уровня относительной экспрессии гена *PCAZ* методом двустадийной мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ «Проста-Тест-2.0», производства ООО «ТестГен» является допустимым, польза от его применения превышает риск.

6. Меры предосторожности при работе с набором

Класс в зависимости от потенциального риска применения – 2б в соответствии с номенклатурной классификацией медицинских изделий, утверждаемой приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 06.06.2012 N 4н.

Все составные части и реагенты, входящие в состав набора реагентов «Проста-Тест-2.0», относятся к 4 классу опасности (вещества малоопасные) в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 «ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности».

Реагенты, входящие в набор «Проста-Тест-2.0», обладают низкой упругостью пара и исключают возможность ингаляционного отравления.

Реагенты, входящие в набор «Проста-Тест-2.0» не токсичны, поскольку готовятся путём смешивания отдельных нетоксичных компонентов.

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СанПиН 2.1.3684.21 от 28.01.2021 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий". Следовать рекомендациям, изложенным в МУ 287-113, МУ 1.3.2569-09.

Необходимо одновременно обеспечить и соблюдать персоналом правила биологической безопасности и требования к организации и проведению данных работ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами и (или) ампликонами исследуемых проб, помещений и оборудования.

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- удалять неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 от 28.01.2021 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий";

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

1. применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции;

2. допускать к работе с набором только специально обученный персонал (специалист с высшим медицинским образованием,

прошедшего обучение на лицензированных курсах специализации по ПЦР-диагностике, а также со средним специальным медицинским образованием);

3. не использовать набор по истечении срока годности;

4. избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть поражённое место водой и обратиться за медицинской помощью.

Необходимых мер предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних электрических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников термического воспламенения не предусмотрено.

В составе набора отсутствуют вещества человеческого или животного происхождения, обладающие потенциальной инфекционной природой, поэтому меры предосторожности против любых специальных, несвойственных рисков при использовании или реализации изделия не предусмотрены.

7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором

Работа с набором реагентов «Проста-Тест-2.0» осуществляется рабочей зоне для приготовления реакций (МУ 1.3.2569-09).

Оборудование для проведения реакции ОТ-ПЦР:

1. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).

2. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).

3. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объёма (типа «Eppendorf», Германия).

4. Холодильник от +2 до +8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.

5. Амплификатор роторного типа, например, «Rotor-Gene Q» (Qiagen, Германия) или амплификатор планшетного типа, например, Real-Time CFX96 Touch («BioRad», США), «ДТпрайм» («ДНК – Технология», Россия), QuantStudio 5 (Thermo Scientific, США).

Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия:

1. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 1000 мкл, до 200 мкл, до 100 мкл, до 20 мкл и до 10 мкл. (например, «Ахуген», США).

2. Штативы для наконечников (например, «Ахуген», США) и микропробирок на 0,2 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).

3. Отдельный халат и одноразовые перчатки.

4. Ёмкость с крышкой для дезинфицирующего раствора.

5. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР⁴:

а) на 0,1 мл (плоская крышка, нестрипованные), (например «Ахуген», США) для постановки в ротор на 72 пробирок – для приборов ПЦР в реальном времени с детекцией через дно пробирки (например, «Rotor-Gene»).

б) на 0,2 мл (куполообразная крышка) (например, «Ахуген», США) – для приборов для ПЦР в реальном времени с детекцией через крышку (например, «CFX96», «ДТ-Прайм»).

6. ПЦР-планшеты (могут использоваться вместо пробирок, указанных в пункте 5).

7. Оптически прозрачная плёнка для заклеивания планшетов.

8. Стерильный физиологический раствор;

9. Минеральное масло (для предотвращения испарения смеси при использовании для проведения реакции обратной транскрипции термостата без нагревающейся крышки).

10. Набор реагентов для выделения ДНК/РНК из клинического материала «НК-Экстра» по ТУ 21.20.23-013-97638376-2019, производства ООО «ТестГен», Россия (Регистрационное удостоверение № РЗН 2021/15428 от 24.09.2021 г.).

11. Набор реагентов для стабилизации РНК в биопробах СТОР-ЭКС по ТУ 9398-099-46482062-2017, производства «ДНК-Технология», Россия (регистрационное удостоверение № РЗН 2018/7775 от 08.11.2018) (при необходимости).

8. Анализируемые образцы

Тип анализируемого образца

Биологическим материалом для исследования являются пробы клеточного осадка утренней мочи, взятой без предварительного

⁴ Убедитесь в совместимости пробирок для ПЦР с используемым амплификатором

массажа простаты, или мочи, взятой в любое время после пальцевого ректального массажа простаты.

8.1 Процедура получения клинического материала

ВНИМАНИЕ! Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2012.

Забор материала на исследование

Для анализа отбирают пробы первой порции утренней мочи, взятой без предварительного массажа простаты, или пробы мочи, взятой в любое время после пальцевого ректального массажа простаты в количестве не менее 20-30 мл в специальный сухой стерильный контейнер на 50 мл.

Условия транспортирования, хранения и утилизации исходного клинического материала:

Рекомендуется осуществлять транспортировку и хранение образцов мочи и полученного из неё клеточного осадка без раствора для стабилизации и сохранения РНК при +2...+8 °С до 3 суток. В течение данного срока должна быть выполнена процедура пробоподготовки – получения клеточного осадка мочи. Суммарная продолжительность хранения образца цельной мочи и полученного из неё клеточного осадка без раствора для стабилизации и сохранения РНК не должна превышать 3-х суток при +2...+8 °С.

При использовании раствора для стабилизации и сохранения РНК при температуре +2...+8 °С в течение 10 суток.

Длительное хранение образцов (от 10 суток до 1 года) при температуре не выше -18 °С в растворе для стабилизации и сохранении РНК.

ВНИМАНИЕ! Замораживание образцов цельной мочи категорически не допускается.

ВНИМАНИЕ! Оттаивание и повторное замораживание образцов клеточного осадка мочи нежелательно, поскольку способно существенно снизить выход РНК.

Утилизация клинического материала (класс В), как чрезвычайно эпидемиологически опасных отходов осуществляется в соответствии с СанПин 2.1.3684.21.

8.2. Подготовка клинического материала.

Рекомендуем соблюдать процедуру получения клеточных осадков мочи (материал для выделения РНК):

1. Стерильные, свободные от РНКаз промаркированные пластиковые центрифужные пробирки объемом 50, 15, 10 или 2 мл наполняют отобранными образцами мочи отдельными стерильными наконечниками или пипетками;

2. Пробирки на 50, 15 или 10 мл центрифугируют при 3 000 g в течение 20 минут или при 5 000 g в течение 15 минут; пробирки на 2 мл допускается центрифугировать при 10 000 g в течение 5 минут;

3. Не задевая осадков, отдельными стерильными наконечниками или пипетками удаляют надосадочную жидкость;

4. При использовании пробирок на 15, 10 или 2 мл, поверх осадков аккуратно наслаивают следующие порции мочи тех же образцов отдельными стерильными наконечниками или пипетками, не допуская кросс-контаминации, повторяют пункты 2-4 до полного использования объемов мочи;

5. При необходимости хранения осадков более 3 суток, отдельными стерильными наконечниками добавляют к осадкам (объемом 50-300 мкл) 1,0 мл раствора для стабилизации и сохранения РНК, аккуратно ресуспендируют осадки пипетированием;

6. При центрифугировании образцов в пробирках на 50, 15 или 10 мл, переносят полученные суспензии в промаркированные стерильные пластиковые пробирки на 1,5 или 2 мл отдельными стерильными наконечниками;

7. Помещают пробирки в холодильную камеру с температурой +2...+8 °С (не допуская замораживания) или, если был добавлен раствор для стабилизации и сохранения РНК, в морозильную камеру с температурой -18...-24 °С.

8.3 Выделение РНК из клинического материала (производится в зоне для выделения нуклеиновых кислот)

Если к образцу был добавлен раствор для стабилизации и сохранения РНК, то перед выделением РНК необходимо отцентрифугировать пробирки при 10 000 g в течение 5 минут и удалить надосадочную жидкость. Выделение РНК осуществлять из осадка.

ВНИМАНИЕ! Перед процедурой выделения РНК к исследуемому биоматериалу добавить внутренний контрольный образец (ВКО) в количестве 10 мкл.

Для экстракции РНК рекомендуется использование следующих комплектов реагентов:

- Набор реагентов для выделения ДНК/РНК из клинического материала "НК-Экстра" по ТУ 21.20.23-013-97638376-2019, ООО «ТестГен», Россия (Регистрационное удостоверение № РЗН 2021/15428 от 24.09.2021),

Рекомендуемый минимальный объем раствора для элюирования РНК – 20 мкл.

Во время процедуры выделения РНК необходимо строго соблюдать протокол и требования инструкции применяемого набора реагентов.

Условия возможного хранения анализируемых образцов РНК

- при температуре от 2 до 8 °С не более 4 ч.

8.4 Интерферирующие вещества и ограничения по использованию анализируемого материала

Влияние потенциально интерферирующих веществ на работу набора реагентов «Проста-Тест-2.0» было проверено в отношении потенциально интерферирующих веществ, которые могут встречаться при нормальном использовании набора реагентов «Проста-Тест-2.0», и, предположительно, влиять на способность набора реагентов выдавать достоверные результаты.

Интерферирующие вещества могут происходить от следующих внешних и внутренних источников:

1) вещества, используемые при лечении пациента (например, лекарственные средства);

2) вещества, встречающиеся в конкретных видах образцов - в данном случае, загрязнение клинического образца биологическим агентом (гемоглобин крови) может ингибировать ПЦР при недостаточной очистке при проведении процедуры выделения РНК;

3) вещества, добавляемые во время подготовки образца (например, среда для стабилизации и сохранения РНК).

Исследованные концентрации интерферирующих веществ, которые приведены в таблице 7.

Таблица 7

Тип	Вещество	Активный компонент	Концентрация
Эндогенные	Биологические агенты	гемоглобин	260 мкг/мл
Экзогенные	Препарат для лечения доброкачественной гиперплазии предстательной железы. Ингибитор 5α-редуктазы.	финастерид	0,001 мг/мл
	Препарат для лечения доброкачественной гиперплазии предстательной железы. Ингибитор 5α-редуктазы.	дутастерид	0,0001 мг/мл
	Препарат, применяемый при нарушениях мочеиспускания, связанных с доброкачественной гиперплазией предстательной железы. Альфа1-адреноблокатор	альфузозин	0,001 мг/мл
	Противоопухолевое средство, гонадотропин-рилизинг гормона аналог.	лейпрорелин	0,00075 мг/мл
	Антиандрогенный препарат противоопухолевой активностью	бикалутамид	0,03 мг/мл
	Антиандрогенный препарат противоопухолевой активностью	флутамид	0,05 мг/мл
	Противоопухолевое средство, гонадотропин-	трипторелин	0,00075 мг/мл

рилизинг гормона аналог.		
Противоопухолевое средство, гонадотропин-рилизинг гормона аналог	гозерелин	0,00072 мг/мл

На основании результатов исследования к ингибиторам ПЦР при проведении анализа отнесены лекарства, влияющие на уровень простатспецифического антигена, такие как финастерид, дутастерид, альфузоксин и препараты антиандрогенной терапии (бикалутамид, флутамид).

Набор реагентов «Проста-Тест-2.0» не может быть использован у пациентов, которые принимают лекарства, влияющие на уровень простатспецифического антигена, такие как финастерид, дутастерид, альфузоксин и препараты антиандрогенной терапии (бикалутамид, флутамид).

Для снижения количества ингибиторов ПЦР необходимо соблюдать правила взятия клинического материала.

Ограничения по использованию анализируемого материала:

- анализируемый материал не подлежит использованию при нарушении условий хранения и транспортировки (температура, продолжительность, многократное замораживание-оттаивание),

- не гарантируется получение достоверных результатов при использовании образцов осадков мочи, загрязнённых гемоглобином (кровью),

- не допускается использование образцов, загрязнённых посторонним биологическим материалом.

- полученную после процедуры выделения РНК необходимо сразу использовать для постановки реакции обратной транскрипции, так как препарат РНК не подлежит хранению.

- ошибки оператора при взятии клинического образца и в ходе процедуры выделения РНК, нарушение рекомендованной инструкции по применению набора реагентов может привести к получению недостоверных результатов.

- набор реагентов «Проста-Тест-2.0» не может быть использован у пациентов, которые принимают лекарства, влияющие на уровень простатспецифического антигена, такие как финастерид,

дутастерид, альфузоксин и препараты антиандрогенной терапии (бикалутамид, флутамид);

- простатэктомия, радиотерапия, биопсии простаты и др. могут повлиять на жизнеспособность ткани предстательной железы и, соответственно, на значение РСАЗ.

9. Проведение анализа

Установка, монтаж, настройка, калибровка медицинского изделия для ввода в эксплуатацию не требуется.

ВНИМАНИЕ! При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free». Обязательно использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером для каждого компонента реакции.

9.1. Проведение реакции обратной транскрипции

Подготовка пробирок для проведения реакции обратной транскрипции

Выбор пробирок для проведения реакции обратной транскрипции зависит от используемого термостата (амплификатора). Для внесения в пробирки реагентов и проб РНК используются одноразовые наконечники с фильтрами.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением реакции обратной транскрипции. Смешивать реагенты для проведения необходимого количества реакций согласно настоящей инструкции.

1. До начала работы следует полностью разморозить при комнатной температуре ОТ буфер и осадить капли с крышек пробирок. ОТ ферменты доставать из морозильника непосредственно перед внесением, не допускать длительного (более 15 минут) хранения при комнатной температуре.

2. После размораживания тщательно перемешать содержимое пробирок (встряхнув пробирки на вортексе в течение нескольких секунд), осадить капли кратковременным центрифугированием.

3. Отобрать необходимое количество пробирок для обратной транскрипции, соответствующее количеству исследуемых образцов. Тип пробирок, стрипов или плашек выбрать в зависимости от используемого термостата (амплификатора).

4. Подготовленные для обратной транскрипции пластиковые пробирки на 1,5 или 0,2 мл рекомендуется подержать под УФ-лучами в течение 20 минут в ламинарном или ПЦР-боксе, где будет проводиться приготовление реакций.

Проведение реакции обратной транскрипции
(производится в помещении для проведения ПЦР)

Субстратом для проведения реакции обратной транскрипции является РНК, выделенная согласно п. 8.3.

Во время приготовления реакций обратной транскрипции необходимо помнить, что РНК быстро деградирует, поэтому все манипуляции проводить без промедлений, не допуская длительных пауз между этапами. Реакционную смесь для обратной транскрипции начинать готовить только после полного завершения процедуры выделения РНК.

Общий объем реакции обратной транскрипции – 20 мкл.

ВНИМАНИЕ! Запрещено изменять объем реакции. При изменении объёма чувствительность метода резко снижается!!!

1. Добавить в каждую пробирку по 9,5 мкл ОТ буфера.⁵
2. Добавить в каждую пробирку по 0,5 мкл ОТ ферментов⁴.
3. Отдельными наконечниками перенести по 10 мкл выделенной РНК в отдельные пробирки, перемешать пипетированием.
7. Тщательно перемешать содержимое пробирок на вихре, стряхнуть капли кратковременным центрифугированием.
8. При использовании термостата без нагревающейся крышки наложить на содержимое пробирок минеральное масло для предотвращения испарения смеси.
9. Поместить пробирки в термостат при температуре 55 °С на 90 минут.

⁵ При исследовании 2 и более образцов, на усмотрение оператора, допускается сначала приготовить мастермик для обратной транскрипции, смешав, из расчёта на каждый образец 9,5 мкл ОТ буфера и 0,5 мкл ОТ ферментов. Тщательно перемешать содержимое пробирок на вихре, осадить капли кратковременным центрифугированием. Внести приготовленный мастермик в чистые пробирки, соответствующие используемому термостату (амплификатору), для обратной транскрипции.

10. По окончании 90 минут установить на термостате температуру 80°С и термостатировать ещё 10 минут.⁶

11. При необходимости смесь после обратной транскрипции хранить до 1 суток при температуре +4°С.⁵

9.3. Проведение ПЦР

Подготовка пробирок для проведения амплификации.

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора. Для внесения в пробирки реагентов, проб кДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа. Смешивать реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, необходимо согласно таблице 8.

1. До начала работы следует полностью разморозить при комнатной температуре реагенты набора для амплификации (Праймер-миксы, ОКО, ПКО, ПЦР-буфер 5x) и осадить капли с крышек пробирок кратковременным центрифугированием.
2. После размораживания тщательно перемешать содержимое пробирок (встряхнув пробирки на вихре в течение нескольких секунд или перевернув 10 раз), осадить капли с крышек пробирок кратковременным центрифугированием.
3. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации исследуемых и контрольных образцов ДНК. Рекомендуемый порядок размещения реакций приведен в таблице 8. Для каждого исследуемого образца кДНК готовится по 2 ПЦР-пробирки, ещё 4 ПЦР-пробирки для каждой постановки готовится для контрольных образцов.

⁶ Если для проведения реакции обратной транскрипции используется амплификатор, то применяется следующая программа амплификации (объём 20 мкл):

Температура, °С	Продолжительность, мин
55	90
80	10
4	хранение

4. Подготовленные для ПЦР пластиковые пробирки рекомендуется поддержать под УФ-лучами в течение 20 минут в ламинарном или ПЦР-боксе, где будет проводиться приготовление реакций.

Протокол проведения ПЦР-реакции

(производится в помещении для проведения ПЦР)

Реакционную смесь для ПЦР начинать готовить только после полного завершения реакции обратной транскрипции.

Общий объем реакции – 20 мкл.

ВНИМАНИЕ! Запрещено изменять объем реакции. При изменении объема чувствительность метода резко снижается!!!

Необходимо использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером для каждого компонента реакции.

1. Приготовление реакционных смесей для образцов, ПКО и ОКО рекомендуется проводить непосредственно в ПЦР-пробирках путём смешивания всех необходимых компонентов согласно расчетной таблице 9.⁷ Для этого:

1.1. Расположить пробирки в 2 горизонтальных ряда, по (n+2) пробирок в каждом ряду (горизонтально), где «n» - количество исследуемых образцов (см. табл. 8).

При этом в горизонтальных рядах будут располагаться реакционные смеси для каждого из двух генов (*PCAZ*, *TMPRSS2-ERG*), по одному образцу для каждого гена; в вертикальных рядах – исследуемые образцы кДНК и контрольные образцы.

1.2. Внести по 4 мкл ПЦР-буфера 5х во все пробирки.

1.3. Внести в (n+2) пробирок, расположенные в верхнем горизонтальном ряду по 10 мкл праймер-микса *PCAZ*.

1.4. Внести в (n+2) пробирок, расположенные в нижнем горизонтальном ряду по 10 мкл праймер-микса *T2E*.

⁷ При исследовании большого количества образцов (более 4), на усмотрение оператора, допускается сначала приготовить 2 отдельные реакционные смеси (*PCAZ* и *T2*) путём смешивания соответствующих ПЦР-буферов и смесей праймеров согласно таблице 9. Перемешать содержимое пробирок на вортексе, осадить капли кратковременным центрифугированием. Внести по 14 мкл приготовленных реакционных смесей в соответствующие ПЦР-пробирки согласно таблице 8.

Таблица 8 – Схема расположения пробирок для ПЦР

Мультиплекс	Образец 1	Образец n	ПКО	ОКО
PCAZ	○	○	○	○
T2E	○	○	○	○

Таблица 9 – Приготовление мастермиксов (в расчете на одну реакцию).

Название реакции	Мастермикс		
	Праймер-микс <i>PCAZ</i> или <i>T2E</i> , мкл	ПЦР-буфер 5х, мкл	Образец кДНК, мкл
PCAZ	10	4	6
T2E	10	4	6

2. Внести по 6 мкл ОКО в соответствующие пробирки (см. табл. 8).

3. Внести 6 мкл ПКО в соответствующие пробирки (см. табл. 4).

4. Внести по 6 мкл образцов кДНК в пробирки для образцов (см. табл. 8).

5. Заклеить ПЦР-планшет/заккрыть пробирки, убедиться, что все крышки или плёнка прилегают плотно.

6. Открутить ПЦР-планшет/пробирки, чтобы собрать реакционную смесь на дне лунок, сохраняя правильную ориентацию плашки или серии пробирок.

7. Установить пробирки в реакционный модуль прибора для ПЦР в «реальном времени». Рекомендуется устанавливать пробирки по центру термоблока для равномерного прижима пробирок нагревающей крышкой.

8. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала, соблюдая инструкцию для используемого прибора. Протокол ПЦР указан в таблице 10.

Таблица 10 – Протокол ПЦР

Стадия	Температура, °C	Время, мин:сек	Каналы детекции	Всего циклов
1	95	05:00		1
2	94	00:10		50
	65	00:30	FAM/Green, HEX/Yellow, Cy5/Red	

9. Указать количество и идентификаторы образцов, отметить расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой.

11. Удостовериться, что в параметрах оптических измерений программы амплификации задействованы каналы детекции FAM/Green, HEX/Yellow, Cy5/Red.

12. Запустить протокол ПЦР с детекцией флуоресцентного сигнала.

13. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

10. Регистрация и интерпретация результатов

Регистрацию результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по каналу FAM/Green (PCA3, T2E), HEX/Yellow (KLK3) и Cy5/Red (BKO). Фиксируют пороговые циклы (Cp).

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Правильные результаты для ПКО характеризуются тем, что полученный пороговый цикл (Cp) реакции ПКО *KLK3*, *PCA3*, *TMPRSS2-ERG* и ВКО составляет не более 35. Правильные результаты для ОКО – отсутствие прохождения реакции или $Cp \leq 35$ в каждом из отрицательных контрольных образцов (ОКО *PCA3*, ОКО *KLK3*, ОКО *TMPRSS2-ERG* и ВКО (табл. 11).

Таблица 11 – Результаты исследования для отрицательного и положительных контрольных образцов

Внесенный материал	Выбранный флуорофор		
	FAM/Green (PCA3, T2E)	HEX/Yellow (KLK3)	Cy5/Red (BKO)
ОКО	Cp >35 или отсутствует	Cp >35 или отсутствует	Cp >35 или отсутствует
ПКО	Cp ≤35	Cp ≤35	Cp ≤35

При получении для отрицательного контрольного образца значений, отличающихся от указанных в таблице 11, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

При получении для положительного контрольного образца значений, отличающихся от указанных в таблице 11, требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов. При повторном получении для положительного контрольного образца значений, отличающихся от указанных в таблице 11, необходимо заменить реагенты.

Интерпретация результатов в исследуемых образцах

Интерпретацию результатов для исследуемых образцов проводят только при правильных результатах для ОКО и ПКО данной постановки.

По выходу графиков по гену *KLK3* (канал HEX/Yellow в каждой пробирке) судят о правильном заборе материала. При пороговом цикле (Cp) по гену *KLK3* (канал HEX/Yellow в каждой пробирке) для данного образца выше 35 и пороговом цикле (Cp) по ВКО (канал Cy5/Red в каждой пробирке), менее 35, результат интерпретируют как невалидный вследствие плохого качества биоматериала. В этом случае рекомендуется повторить исследование начиная со взятия биоматериала у пациента.

Об эффективности выделения РНК, прохождении реакции обратной транскрипции и отсутствии ингибирования ПЦР в конкретной пробирке судят по пороговому циклу (Cp) прохождения реакции ВКО. В случае одновременного отсутствия или позднего (Cp >35) выхода графиков по гену *KLK3* (канал HEX/Yellow в

каждой пробирке) и ВКО (канал Cy5/Red в каждой пробирке), результат интерпретируют как невалидный вследствие низкой эффективности выделения РНК, реакции обратной транскрипции или ингибирования ПЦР. В этом случае рекомендуется повторить исследование начиная со взятия биоматериала у пациента.

В случае выхода графиков по гену *KLK3* (канал HEX/Yellow в каждой пробирке) с пороговым циклом (*Cp*) до 35, приступают к расчёту относительного уровня экспрессии гена *PCA3* по формуле⁸:

$$R = 1000 \times (1,92^{(Cp_{KLK3} - Cp_{PCA3})}),$$

где:

R – относительный уровень экспрессии гена *PCA3*,

Cp_{KLK3} – пороговый цикл (*Cp*) прохождения реакции *KLK3*,

*Cp_{PCA3}*⁹ – пороговый цикл (*Cp*) прохождения реакции *PCA3*,

1,92 – средняя эффективность реакций по генам *KLK3* и *PCA3*,

1000 – коэффициент, введённый для получения удобного, не дробного формата данных.

Например, значения *Cp* для гена *KLK3* получилось 28,7; значение *Cp* для гена *PCA3* – 33,3. Рассчитывается относительный уровень экспрессии *PCA3*:

$$\begin{aligned} R &= 1000 \times (1,92^{(28,7 - 33,3)}) = 1000 \times (1,92^{-4,6}) = \\ &= 1000 \times 0,04975 = 49,75 \end{aligned}$$

Принципы интерпретации результатов представлены в таблице 12-13.

⁸ Bustin, Stephen A., ed. A-Z of Quantitative PCR. La Jolla, CA: International University Line, 2004-2006

⁹ Если графики по гену *PCA3* отсутствуют, а *Cp* по гену *KLK3* (Канал Hex/Yellow) не более 35, то относительный уровень экспрессии гена *PCA3* (значение *R*) принимают за ноль.

Таблица 12 – Принцип интерпретации результатов для мультиплекса *PCA3*

Относит. уровень экспрессии гена <i>PCA3</i>	Канал Hex/Yellow (ген <i>KLK3</i>)	Канал Cy5/Red (ВКО)	Результат
$R \geq 25$	$Cp \leq 35$	не учитывается	Высокий риск наличия онкологических процессов предстательной железы (независимо от результатов по гену <i>TMPRSS2/ERG</i>)
$R < 25$	$Cp \leq 35$	не учитывается	Низкий риск наличия онкологических процессов предстательной железы
не учит.	$Cp > 35$ или отсутствует	$Cp \leq 35$	Результат невалидный по причине низкого качества образца
не учит.	$Cp > 35$ или отсутствует	$Cp > 35$ или отсутствует	Результат невалидный вследствие низкой эффективности выделения РНК, реакции обратной транскрипции или ингибирования ПЦР

Таблица 13 – Принцип интерпретации результатов для мультиплекса *T2E*.

Канал Fam/Green (ген <i>T2E</i>)	Канал Hex/Yellow (ген <i>KLK3</i>)	Канал Cy5/Red (ВКО)	Результат
$Cp \leq 40$	не учитывается	не учитывается	Высокий риск наличия онкологических процессов предстательной железы (независимо от результатов по гену <i>PCA3</i>)
$Cp > 40$ или отсутствует	$Cp \leq 35$	не учитывается	Низкий риск наличия онкологических процессов предстательной железы
$Cp > 40$ или отсутствует	$Cp > 35$ или отсутствует	$Cp \leq 35$	Результат невалидный по причине низкого качества образца
$Cp > 40$ или отсутствует	$Cp > 35$ или отсутствует	$Cp > 35$ или отсутствует	Результат невалидный вследствие низкой эффективности выделения РНК, реакции обратной транскрипции или ингибирования ПЦР

11. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора

Хранение

Набор реагентов «Проста-Тест-2.0» в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре от минус 16 до минус 24°C в течение всего срока годности набора.

Допускается заморозка/оттаивание набора «Проста-Тест-2.0», не более 10 раз.

Набор реагентов, хранившийся с нарушением регламентированного режима, не подлежит применению.

Транспортирование

Транспортировать набор реагентов «Проста-Тест-2.0», следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.

Транспортировать при температуре от минус 16 до минус 24°C в течение всего срока годности набора.

Атмосферное давление не контролируется, т.к. не влияет на качество изделия.

Для обеспечения соблюдения условий транспортирования на протяжении всего срока транспортирования набор реагентов помещается в термоконтейнер пенополиуретановый многоразового использования для временного хранения и транспортирования с подготовленными хладоэлементами. Тип, объём и количество хладоэлементов, закладываемых в термоконтейнер с транспортируемыми наборами реагентов, а также объём термоконтейнера подбираются в зависимости от продолжительности и условий транспортирования.

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

Срок годности

Срок годности набора реагентов «Проста-Тест-2.0» – 12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации. Набор реагентов с истёкшим сроком годности применению не подлежит.

Срок годности вскрытых компонентов набора 12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при условии хранения при температуре от минус 16 до минус 24°C.

Срок годности приготовленных для работы компонентов набора. 1 час при соблюдении условий, препятствующих испарению компонентов, а также контаминации посторонним биологическим материалом.

12. Утилизация

Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1 3684 21 от 28.01 2021 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

В соответствии с классификацией медицинских отходов наборы относятся к классу А (эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твёрдым бытовым отходам). Неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиН 2.1 3684 21 от 28.01 2021 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий" собираются в одноразовую маркированную упаковку любого цвета (кроме жёлтого и красного).

Оставшиеся после выполнения работ пробирки и материалы утилизируют в соответствии с МУ 287-113 (Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения).

Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожаются сливом в канализацию с предварительным разбавлением реагента

водопроводной водой 1:100 и вывозом остатков упаковок как производственный или бытовой мусор.

Потребительская упаковка набора реагентов подлежит механическому разрушению с вывозом остатков как производственного или бытового мусора.

Персонал, осуществляющий уничтожение набора реагентов, должен соблюдать правила безопасности проведения того или иного способа уничтожения.

13. Гарантийные обязательства, контакты

Предприятие-изготовитель гарантирует качество и безопасность набора реагентов «Проста-Тест-2.0» в течение срока годности при соблюдении требований транспортирования и хранения продукции, а также при соблюдении правил эксплуатации.

При возникновении претензий по качеству наборов, нежелательных событий или инцидентов направлять информацию по адресу:

Общество с Ограниченной Ответственностью «ТестГен»
(ООО «ТестГен»),
432072 г. Ульяновск, Инженерный 44-й проезд, дом 9, офис 13
Тел.: +7 (499) 705-03-75
www.testgen.ru

Служба технической поддержки:

Тел.: +7 927 981 58 81

E-mail: help@testgen.ru

Инструкция по применению соответствует требованиям Приказа Минздрава России от 09.01.2014 №2н, Приказа Минздрава России от 19.01.2017 № 11н, ГОСТ 51088-2013.

Приложение А

Обозначение	Наименование документа
ГОСТ ISO 14971-2011	Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.
ГОСТ Р 15.309-98	Система разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приёмка выпускаемой продукции. Основные положения.
ГОСТ Р 51088-2013	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro
ГОСТ Р 51352-2013	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Методы испытаний.
ГОСТ Р EN 13612-2010	Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики in vitro
ГОСТ Р 56894-2016	Сводный комплект технической документации для демонстрации соответствия общим принципам обеспечения безопасности и основных функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики in vitro
ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.
ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая

	изготовителем(маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro
ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020	Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования
ГОСТ ISO 13485-2017	Изделия медицинские. Системы менеджмента качества. Требования для целей регулирования
ГОСТ 2.114-2016	Единая система конструкторской документации. Технические условия
ГОСТ 2.104-2006	Единая система конструкторской документации (ЕСКД). Основные надписи
ГОСТ Р 1.3-2018	Стандартизация в Российской Федерации. Технические условия на продукцию. Общие требования к содержанию, оформлению, обозначению и обновлению

П р и м е ч а н и е – Указанные выше стандарты были действующими на момент утверждения инструкции по применению. В дальнейшем, при пользовании документом, целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов на текущий момент. Если ссылочный документ заменён или изменён, то при применении настоящего документа следует пользоваться заменённым (изменённым) документом.

скреплено печатью
22 (двадцать две) листов

Должность: ген. директор

Гороповский А.И.

