

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ мРНК ГЕНА РСА3 И ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ
ЕГО ЭКСПРЕССИИ МЕТОДОМ ДВУСТАДИЙНОЙ ОТ-ПЦР-РВ (ПРОСТА-ТЕСТ)
ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ IN VITRO
В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ**

© 2018 А.Н. Тороповский¹, А.Г. Никитин², М.Г. Гордиев³, Д.А. Викторов¹,
Л.М. Мухаметханова¹, О.Н. Павлова⁴

¹ООО «ТестГен», Ульяновск

²Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи
и медицинских технологий ФМБА России, Москва

³ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер
Министерства здравоохранения Республики Татарстан», Казань

⁴Частное учреждение образовательная организация высшего образования
«Медицинский университет «Реавиз», Самара

Целью работы является анализ результатов испытания набора реагентов для выявления мРНК гена РСА3 и определения уровня его экспрессии методом двустадийной ОТ-ПЦР-РВ (Проста-Тест) для внедрения его в клинико-лабораторную практику при диагностике рака предстательной железы.

На базе ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер МЗ РТ» были проведены клинические испытания медицинского изделия для диагностики *in vitro* «Набор реагентов для выявления мРНК гена РСА3 и определения уровня его экспрессии методом двустадийной ОТ-ПЦР-РВ (Проста-Тест) в исполнениях: 1) «Проста-Тест-12» на 12 определений; 2) «Проста-Тест-24» на 24 определения», производства ООО «Тест-Ген». В качестве объектов клинического испытания было использовано 50 образцов клеточного осадка, полученного центрифугированием мочи, собранной после массажа простаты, от пациентов-мужчин в возрасте от 40 лет с наличием показаний к биопсии предстательной железы. Ранее, с целью выполнения валидации функциональных характеристик, испытания набора реагентов были проведены на 200 образцах клеточного осадка мочи, в результате были определены диагностические показатели, аналогичные полученным в данном исследовании. Таким образом общий объем выборки составил 250 образцов.

После проведения процедуры отбора проб мочи, собранной после пальцевого ректального массажа предстательной железы, пациент в обычном порядке подвергался процедуре биопсии. В 23 образцах ткани предстательной железы диагноз «рак предстательной железы» был подтвержден гистологически и в 27 образцах ткани предстательной железы результаты гистологических исследований были отрицательными, то есть диагноз «рак предстательной железы» не подтвержден.

Каждый из 50 образцов клеточного осадка был разделен на 2 порции - свежий клеточный осадок и клеточный осадок, фиксированный в среде для стабилизации и сохранения РНК. Из каждого образца клеточного осадка было проведено по 2 процедуры выделения РНК, которые были проанализированы с помощью наборов реагентов в варианте исполнения «Проста-Тест-12» на 12 определений и набора реагентов «Проста-Тест-24» на 24 определения.

Таким образом, в ходе проведения клинических испытаний было проведено 200 клинико-лабораторных исследований, из которых 100 исследований проведено на образцах проб РНК человека, выделенных из образцов свежего клеточного осадка (46 опытов с образцами РНК с подтвержденным гистологически диагнозом «рак предстательной железы» и 54 опыта с образцами РНК с не подтвержденным гистологически диагнозом «рак предстательной железы») и 100 исследований проведено на образцах проб РНК человека, выделенной из образцов фиксированного в среде для стабилизации и сохранения РНК клеточного осадка (46 опытов с образцами РНК с подтвержденным гистологически диагнозом «рак предстательной железы» и 54 опыта с образцами РНК с не подтвержденным гистологически диагнозом «рак предстательной железы»).

Анализ и оценка результатов проведенных клинико-лабораторных испытаний медицинского изделия подтвердили соответствие качества набора реагентов, эффективности и безопасности его применения. По результатам статистической обработки полученных характеристик эффективности с доверительной вероятностью 90 % диагностическая чувствительность исследуемого медицинского изделия на образцах проб РНК человека, выделенных из образцов свежего клеточного осадка составила 68,4 %, диагностическая специфичность – 73,1 %. Воспроизводимость результатов 100 %.

По результатам статистической обработки полученных характеристик эффективности с доверительной вероятностью 90 % диагностическая чувствительность исследуемого медицинского изделия на образцах проб РНК человека, выделенных из образцов фиксированного в среде для стабилизации и сохранения РНК клеточного осадка составила 68,4 %, диагностическая специфичность – 73,1 %.

Воспроизводимость результатов – 100 %. В процессе испытаний наборы продемонстрировали высокую надежность.

Ключевые слова: ген РСА3, мРНК, метод двустадийной ОТ-ПЦР-РВ, рак предстательной железы.

Согласно эпидемиологическим исследованиям заболеваемость раком предстательной железы значительно возросла в последние 2 десятилетия. В настоящее время рак предстательной железы (РПЖ) является одним из наиболее часто диагностируемых онкологических заболеваний мужчин в развитых странах. Также, в последние годы это заболевание стало главной причиной смерти пожилых мужчин [1].

Ранняя диагностика РПЖ позволяет подобрать и провести лечение, способствующее полному выздоровлению или длительной ремиссии. Однако на начальных стадиях это заболевание протекает часто бессимптомно или с симптомами, характерными для менее опасных и более распространенных заболеваний, таких как простатит и доброкачественная гиперплазия предстательной железы. Все эти факторы осложняют постановку диагноза и приводят к выявлению заболевания на более поздних стадиях, когда лечение малоэффективно [1, 3].

Общепринятые методы диагностики рака простаты, такие как пальцевое ректальное исследование, трансректальное ультразвуковое исследование, магнитно-резонансная томография предстательной железы, анализ простатоспецифического антигена (ПСА) имеют относительно низкую чувствительность и специфичность, особенно на ранних стадиях развития заболевания [3].

В настоящее время биопсия простаты является золотым стандартом в диагностике рака предстательной железы. Этот метод позволяет не только поставить диагноз, но и определить стадию заболевания. Однако биопсия – это крайне болезненная для пациента процедура, нередко приводящая к осложнениям, таким как гематурия, ректальные кровотечения и другим. В этой связи очевидна необходимость поиска новых чувствительных, специфичных и неинвазивных методов, позволяющих проводить диагностику рака предстательной железы на ранних стадиях развития заболевания [1, 3, 4].

Ряд авторов для диагностики рака предстательной железы предлагает использовать анализ уровня экспрессии белков ПСА, АМАСР (α -метилацил-коА-рацемазы), hTERT (теломеразы человека), РНК РСА3. Наиболее перспективными среди предложенных методов диагностики являются тест-системы, основанные на количественном анализе продукта гена РСА3, гиперэкспрессия которого происходит при малигнизации тканей простаты [2, 3, 5].

Продукт гена РСА3 был открыт в конце 1990-х годов при сравнении транскриптомов нормальных и злокачественных тканей предстательной железы [3, 7]. Было установлено, что уровень экспрессии мРНК в раковых клетках простаты более чем в 60 раз выше уровня экспрессии в нормальных клетках предстательной железы. Эта мРНК была названа DD3 (differ-

ential display clone 3), а позже РСА3 (prostate cancer antigen 3). Ген РСА3 сверхэкспрессируется в тканях злокачественных опухолей предстательной железы, а РНК-продукт этого гена может присутствовать в моче и эякуляте. В ходе дальнейших исследований было установлено, что высокий уровень экспрессии РСА3 строго специфичен для злокачественных опухолей простаты и ее метастазов, но не для любых нормальных тканей и доброкачественных и злокачественных опухолей другого генеза. Это позволило предположить, что возможно использовать анализ уровня экспрессии гена РСА3 в качестве генетического маркера РПЖ [3].

Для исследования экспрессии РСА3 в ткани ПЖ существуют такие методики, как транскрипционно-опосредованная амплификация и гибридизация РНК *in situ* [10, 11]. В 2003 г. D. Hessels и соавт. предложили проводить оценку экспрессии РСА3 методом количественной ОТ-ПЦР не только в ткани, но и в осадке мочи, полученной после массажа ПЖ [9]. В 2006 г. J. Groskopf и соавт. предложили определять экспрессию РСА3 в моче с помощью транскрипционно-опосредованной амплификации [8].

На сегодняшний день предложено 3 поколения тест-систем диагностики РПЖ, основанных на определении содержания РНК РСА3 в моче или ее клеточном осадке. Полученное значение нормируют на число клеток простаты в анализируемом образце, определяемое, в свою очередь, по количеству мРНК гена *KLK3* (ген калликреина человека), кодирующего белок ПСА и экспрессирующегося исключительно в тканях предстательной железы [2, 3, 4].

Рядом авторов проведена оценка возможности стратификации риска РПЖ с помощью РСА3, исследователи определяли взаимосвязь между уровнем экспрессии маркера и степенью агрессивности РПЖ (клиническая и патоморфологическая стадия, степень дифференцировки по Gleason, объем опухоли, наличие экстрапростатического роста) [1, 6].

Некоторые авторы показали возможность использования индекса РСА3 при планировании первичной либо повторной биопсии ПЖ с построением номограмм рисков в комплексе с другими индивидуальными показателями обследования пациента, в том числе с другими новейшими биомаркерами РПЖ. Применение РСА3 в повседневной практике может способствовать увеличению специфичности диагностики РПЖ и уменьшить количество «ненужных» биопсий ПЖ [1, 3, 6].

Компанией «ТестГен» разработан набор реагентов для выявления мРНК гена РСА3 и определения уровня его экспрессии методом двустадийной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР-РВ) «Проста-Тест», предназначенный для профессионального применения в медицинских организациях и клиничко-диагностических лабораториях онкологического и урологического профиля.

Набор реагентов выявляет отношение количества некодирующей мРНК гена РСА3 к уровню мРНК гена *KLK3* методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в пробе РНК человека, выделенной из образцов свежего или фиксированного в среде для стабилизации и сохранения РНК клеточного осадка, полученного центрифугированием или фильтрованием мочи, собранной после массажа простаты. Клиническая значимость теста, выполняемого с помощью разработанного набора реагентов, состоит в поддержке диагностики патологии «рак предстательной железы» с помощью определения относительного уровня экспрессии гена РСА3, а также для получения дополнительного критерия при назначении первой или повторной биопсии предстательной железы при обследовании мужчин в возрасте от 40 лет.

Целью нашей работы являлся анализ результатов испытания набора реагентов для выявления мРНК гена РСА3 и определения уровня его экспрессии методом двустадийной ОТ-

ПЦР-РВ «Проста-Тест» для внедрения его в клинико-лабораторную практику при диагностике рака предстательной железы.

Для реализации поставленной цели предстояло решить следующие задачи:

- изучить соответствие набора реагентов своему назначению;
- определить эффективность медицинского изделия для диагностики *in vitro* в соответствии с предназначенным производителем применением медицинского изделия по назначению;
- определить качество набора реагентов, эффективность и безопасность его применения.

Материалы и методы. Клинические испытания медицинского изделия для диагностики *in vitro* «Набор реагентов для выделения мРНК гена *PCSA3* и определения уровня его экспрессии методом двустадийной ОТ-ПЦР-РВ (Проста-Тест) по ТУ 9398-003-97638376-2015 в исполнениях: 1) «Проста-Тест-12» на 12 определений; 2) «Проста-Тест-24» на 24 определения, производства ООО «ТестГен» проводились на базе ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер МЗ РТ» в соответствии с Приказом Министерства Здравоохранения РФ от 9 января 2014 г. № 2н.

Материалом для проведения ОТ-ПЦР служили пробы РНК человека, выделенной из образцов свежего или фиксированного в среде для стабилизации и сохранения РНК клеточного осадка, полученного центрифугированием или фильтрованием мочи, собранной после массажа простаты.

Общее время проведения анализа составляет 2–2,5 ч.

Аналитические характеристики набора представлены таблице 1.

Таблица 1

Аналитические характеристики набора реагентов «Проста-Тест»

Аналитическая специфичность	Специфичен по отношению к мРНК генов <i>COMT</i> , <i>KLK3</i> , <i>PCSA3</i> человека
Аналитическая чувствительность	100 копий РНК
Диапазон количества тотальной РНК, пригодного для выполнения исследования	min 1 мкг, max 5 мкг*
Значения уровня <i>PCSA3</i> , соответствующие норме	< 35

Примечание: * мРНК составляет 2–3 % от тотальной РНК.

Набор реагентов состоит из комбинированного комплекта реагентов:

- комплект для проведения реакции обратной транскрипции «Проста-Тест» ОТ;
- комплект для проведения ПЦР амплификации «Проста-Тест» ПЦР.

В качестве объектов клинического испытания было использовано 50 образцов клеточного осадка, полученного центрифугированием мочи, собранной после массажа простаты, от пациентов-мужчин в возрасте от 40 лет с наличием показаний к биопсии предстательной железы. Ранее, с целью выполнения валидации функциональных характеристик, испытания набора реагентов были проведены на 200 образцах клеточного осадка мочи, в результате были определены диагностические показатели, аналогичные полученным в данном исследовании [2]. Таким образом общий объем выборки составил 250 образцов.

Все используемые для проведения клинико-диагностических испытаний образцы представляли собой остаточные аликвоты, собранные в процессе рутинной лечебно-диагностической практики ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер

МЗ РТ», достаточные по объемам и удовлетворяющие параметрам программы клинического испытания.

В 23 предоставленных образцах диагноз «рак предстательной железы» был подтвержден гистологически, а в 27 образцах результаты гистологических исследований были отрицательными, то есть диагноз «рак предстательной железы» не подтвержден. Биопсия проведена в рамках стандартных диагностических процедур, связанных с диагнозом «рак предстательной железы».

Критерии включения объектов испытаний:

- наличие показаний к биопсии предстательной железы у мужчин в возрасте от 40 лет.

Критерии исключения:

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

- загрязнение гемоглобином (кровью) образцов осадков мочи;

- образцы, загрязненные посторонним биологическим материалом;

- набор реагентов «Проста-Тест» не может быть использован у пациентов, которые принимают лекарства, влияющие на уровень простатспецифического антигена, такие как финастерид (Proscar), дутастерид (Avodart), альфузоксин (Uroxatral) и препарат антиандрогенной терапии (Lupron);

- простатэктомия, радиотерапия, биопсии простаты и другие процедуры могут повлиять на жизнеспособность ткани предстательной железы и, соответственно, на значение ПСАЗ.

Количество образцов выбрано исходя из количества пациентов-мужчин в возрасте от 40 лет с наличием показаний к биопсии предстательной железы, проходящих диагностические процедуры в ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер МЗ РТ» и наличия образцов в банке остаточных аликвот клеточного осадка в ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер МЗ РТ».

Проверка функциональных свойств и эффективности регистрируемого медицинского изделия была проведена в пробах с отрицательным результатом наличия рака предстательной железы в 54 опытах с РНК человека, выделенных из образцов свежего клеточного осадка и 54 опытах с РНК человека, выделенных из образцов фиксированного в среде для стабилизации и сохранения РНК клеточного осадка. Согласно графику на рис. 1, приведенному в Приложении В «Методических рекомендаций по порядку проведения экспертизы качества, эффективности и безопасности медицинских изделий для государственной регистрации», одобренных Научно-экспертным Советом ФГБУ «ВНИИИМТ» Росздравнадзора 27 июля 2016 года стопроцентный результат в 54 опытах (то есть, если во всех 54 случаях исследуемый набор покажет истинноотрицательное значение) может рассматриваться как доказательство для показателя эффективности – диагностической специфичности медицинского изделия – на уровне 0,958 (95,8 %) с доверительной вероятностью 90 %.

Проверка функциональных свойств и эффективности регистрируемого медицинского изделия была проведена в пробах с положительным результатом наличия рака предстательной железы в 46 опытах с РНК человека, выделенных из образцов свежего клеточного осадка и 46 опытах с РНК человека, выделенных из образцов фиксированного в среде для стабилизации и сохранения РНК клеточного осадка. Согласно графику, приведенному на рисунке 1, стопроцентный результат в 46 опытах (то есть, если во всех 46 случаях исследуемый набор покажет истинноположительное значение) может рассматриваться как доказательство для

показателя эффективности – диагностической чувствительности медицинского изделия – на уровне 0,952 (95,2 %) с доверительной вероятностью 90 %.

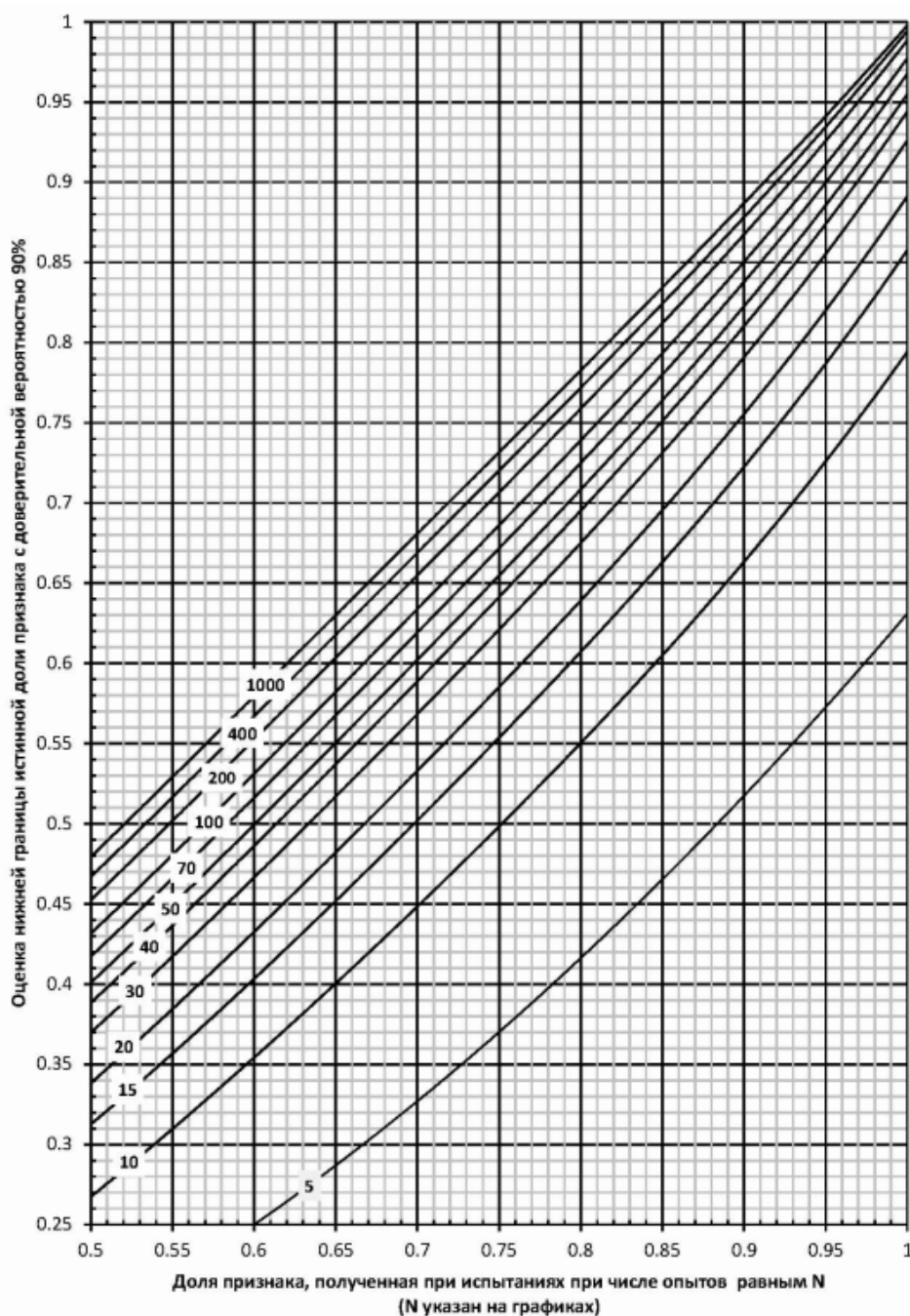


Рис. 1. График оценки статистической достоверности результатов испытаний в зависимости от числа независимых опытов N при доверительной вероятности 90 %

Каждый из 50 образцов подвергался анализу для выявления отношения количества мРНК гена PCA3 к уровню мРНК гена KLK3 методом обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Для экстракции РНК из исследуемых образцов использовали комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС) по ТУ 9398-035-46482062-2009, производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, (ФСР 2010/08867 от 13.10.2016 г.).

Полученную после процедуры выделения РНК сразу использовали для постановки реакции обратной транскрипции, так как препарат РНК не подлежит хранению.

Определение относительного уровня экспрессии гена *РСА3* методом обратной транскрипции и последующей количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включал в себя четыре этапа:

А) реакция обратной транскрипции;

Б) ПЦР-амплификация ДНК;

В) гибридизационно-флуоресцентная детекция продуктов амплификации в режиме «реального времени»;

Г) интерпретация результатов и расчёт относительного уровня экспрессии гена *РСА3*.

С пробами РНК проводилась реакция обратной транскрипции в реакционном буфере при помощи праймеров и фермента MMLV ревертазы. С полученными в результате обратной транскрипции пробами комплементарной ДНК проводились реакции амплификации участков транскриптов генов *РСА3*, *KLK3* и *СОМТ* в реакционном буфере при помощи специфичных к этим участкам ДНК праймеров и фермента Taq-полимеразы. 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 осуществлялась непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора детектирующего ДТ-96 прайм («ДНК-Технология», Россия) для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени».

Продукты амплификации всех задействованных в реакции генов детектировались по каналу, соответствующему флуорофору FAM. Фиксировались средние для двух дублей (повторностей) пороговые цикл (*C_p*) прохождения реакций каждого из генов: *СОМТ*, *KLK3*, *РСА3*.

Правильные результаты для положительных контрольных образцов (ПКО) характеризуются тем, что полученные пороговые циклы (*C_p*) реакций в ПКО составляют не более 35. Правильные результаты для отрицательных контрольных образцов (ОКО) – отсутствие прохождения реакции в каждом из отрицательных контрольных образцов (ОКО *СОМТ*, ОКО *KLK3*, ОКО *РСА3*).

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

Об эффективности выделения РНК и прохождении реакции обратной транскрипции судили по среднему для двух дублей пороговому циклу (*C_p*) прохождения реакции гена *СОМТ*:

- при среднем пороговом цикле (*C_p*) по гену *СОМТ* для данного образца выше 35 – эффективность выделения либо прохождения реакции обратной транскрипции оценивали как неудовлетворительную, а результат интерпретировали как невалидный;

- при среднем пороговом цикле (*C_p*) по гену *СОМТ* для данного образца менее 35 – эффективность выделения либо прохождения реакции обратной транскрипции оценивали как удовлетворительную и приступали к расчёту относительного уровня экспрессии гена *РСА3*.

Результаты интерпретировали на основании расчётов отношения *РСА3*/*KLK3*, по формуле:

$$R = 1000 \times (1,92^{(Cp_{KLK3} - Cp_{PSA3})}),$$

где R – относительный уровень экспрессии гена $PSA3$,

Cp_{KLK3} – средний для двух дублей (повторностей) пороговый цикл (Cp) прохождения реакции $KLK3$,

Cp_{PSA3} – средний для двух дублей (повторностей) пороговый цикл (Cp) прохождения реакции $PSA3$,

1,92 – средняя эффективность реакций по генам $KLK3$ и $PSA3$,

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

Коэффициент вариации порогового цикла (Cp) рассчитывали для повторностей контрольного образца чувствительности ($КОЧ$) (не менее 6) путем определения стандартного отклонения, выраженного в процентах.

Принцип интерпретации результатов следующий:

– риск наличия онкологических процессов предстательной железы для данного образца высокий, если относительный уровень экспрессии гена $PSA3$ более 35, а пороговый цикл (Cp) по гену $SOMT$ не больше 35.

– риск наличия онкологических процессов предстательной железы для данного образца низкий, если относительный уровень экспрессии гена $PSA3$ не более 35, а пороговый цикл (Cp) по гену $SOMT$ не больше 35.

– результат анализа невалидный, если пороговый цикл (Cp) по гену $SOMT$ больше 35.

– результат анализа сомнительный, если Cp в двух повторностях одного или обоих исследуемых генов ($KLK3$ и/или $PSA3$) отличаются более чем на 5 циклов, или если показательный график по одному из дублей отсутствовал. Во втором случае расчёт уровня экспрессии гена $PSA3$ проводится по единственному нормально построенному графику. Определение среднего Cp в этом случае не проводится.

Также проведен статистический анализ результатов исследования.

Результаты исследований. В ходе проведения клинических испытаний было проведено 200 клиничко-лабораторных исследований, из которых 100 исследований проведено на образцах проб РНК человека, выделенных из образцов свежего клеточного осадка (46 опытов с образцами РНК с подтвержденным гистологически диагнозом «рак предстательной железы») и 54 опыта с образцами РНК с не подтвержденным гистологически диагнозом «рак предстательной железы») и 100 исследований проведено на образцах проб РНК человека, выделенных из образцов фиксированного в среде для стабилизации и сохранения РНК клеточного осадка (46 опытов с образцами РНК с подтвержденным гистологически диагнозом «рак предстательной железы») и 54 опыта с образцами РНК с не подтвержденным гистологически диагнозом «рак предстательной железы»).

В результате сравнения полученных результатов на образцах проб РНК человека, выделенных из образцов свежего клеточного осадка с результатами биопсии было выявлено 10 ложноотрицательных результата и 10 ложноположительных.

В результате сравнения полученных результатов на образцах проб РНК человека, выделенных из образцов фиксированного в среде для стабилизации и сохранения РНК клеточного осадка с результатами биопсии было выявлено 10 ложноотрицательных результата и 10 ложноположительных.

Сводные результаты клинических испытаний представленных образцов медицинского изделия в сравнении с результатами биопсии приведены в таблице 2.

Таблица 2

Сводные результаты клинических испытаний представленных образцов медицинского изделия в сравнении с результатами биопсии

а) сравнение полученных результатов на образцах проб РНК человека, выделенных из образцов свежего клеточного осадка с результатами биопсии

Результат сравнения	«Проста-Тест-12», LOT: 1704-376	«Проста-Тест-12», LOT: 1704-377	«Проста-Тест-12», LOT: 1704-378	«Проста-Тест-12», LOT: 1704-379	«Проста-Тест-12», LOT: 1704-380	«Проста-Тест-24», LOT: 1704-381	«Проста-Тест-24», LOT: 1704-382	«Проста-Тест-24», LOT: 1704-383
ИП	3	3	4	7	1	6	11	1
ИО	7	6	5	3	1	13	8	1
ЛП	2	1	1	1	0	3	2	0
ЛО	0	2	2	1	0	2	3	0
Количество								

б) сравнение полученных результатов на образцах проб РНК человека, выделенных из образцов фиксированного в среде для стабилизации и сохранения РНК клеточного осадка

Результат сравнения	«Проста-Тест-12», LOT: 1709-402	«Проста-Тест-12», LOT: 1709-403	«Проста-Тест-12», LOT: 1709-404	«Проста-Тест-12», LOT: 1709-405	«Проста-Тест-12», LOT: 1709-406	«Проста-Тест-24», LOT: 1709-407	«Проста-Тест-24», LOT: 1704-408	«Проста-Тест-24», LOT: 1709-409
ИП	3	3	4	7	1	6	11	1
ИО	7	6	5	3	1	13	8	1
ЛП	2	1	1	1	0	3	2	0
ЛО	0	2	2	1	0	2	3	0
Количество								

Примечание: ИП – истинноположительные, ЛО – ложноотрицательные, ИО – истинноотрицательные, ЛП – ложноположительные. Результаты анализа всех аликвот, полученных от одних и тех же образцов совпали, что говорит о 100 % воспроизводимости результатов.

Для расчёта диагностической чувствительности и диагностической специфичности использовали формулы, приведенные в п.5.5 ГОСТ Р 53022.3-2008 «Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов»:

$$\text{Чувствительность} = \frac{\text{Истинноположительные}}{\text{Истинноположительные} + \text{Ложноотрицательные}} \times 100 \%$$

$$\text{Специфичность} = \frac{\text{Истинноотрицательные}}{\text{Истинноотрицательные} + \text{Ложноположительные}} \times 100 \%$$

Оценку результатов исследований проводили согласно Приложению В «Методических рекомендаций по порядку проведения экспертизы качества, эффективности и безопасности медицинских изделий для государственной регистрации», одобренных Научно-экспертным Советом ФГБУ «ВНИИИМТ» Росздравнадзора 27 июля 2016 года.

По результатам статистической обработки полученных характеристик эффективности с доверительной вероятностью 90 % диагностическая чувствительность исследуемого медицинского изделия на образцах проб РНК человека, выделенных из образцов свежего клеточного осадка составила 68,4 %, диагностическая специфичность – 73,1 %.

По результатам статистической обработки полученных характеристик эффективности с доверительной вероятностью 90 % диагностическая чувствительность исследуемого медицинского изделия на образцах проб РНК человека, выделенных из образцов фиксированного в среде для стабилизации и сохранения РНК клеточного осадка составила 68,4 %, диагностическая специфичность – 73,1 %.

Воспроизводимость результатов 100 %. В процессе испытаний наборы продемонстрировали высокую надежность.

Анализ и оценка результатов проведенных клинико-лабораторных испытаний медицинского изделия подтвердили качество набора реагентов, эффективность и безопасность его применения.

Выводы. В результате проведенных клинических испытаний в форме клинико-лабораторных испытаний установлено: «Набор реагентов для выявления мРНК гена РСА3 и определения уровня его экспрессии методом двустадийной ОТ-ПЦР-РВ (Проста-Тест) по ТУ 9398-003-97638376-2015 в исполнениях: 1) «Проста-Тест-12» на 12 определений; 2) «Проста-Тест-24» на 24 определения», производства ООО «ТестГен» безопасен и клинически эффективен при использовании по назначению, установленному производителем.

1. Результаты проведенных испытаний подтверждают эффективность и безопасность применения медицинского изделия «Набор реагентов для выявления мРНК гена РСА3 и определения уровня его экспрессии методом двустадийной ОТ-ПЦР-РВ (Проста-Тест) по ТУ 9398-003-97638376-2015 в исполнениях: 1) «Проста-Тест-12» на 12 определений; 2) «Проста-Тест-24» на 24 определения», производства ООО «ТестГен».

2. Изделие может применяться в медицинских учреждениях и клинико-диагностических лабораториях онкологического профиля. Область применения набора реагентов – клиническая лабораторная диагностика, онкология, онкоурология.

3. Отклонения от алгоритма выполнения клинических испытаний отсутствовали.

В ходе клинических испытаний медицинского изделия были выявлены следующие достоинства:

1. При производстве изделия применены современные, безопасные, при использовании в клинических лабораторных условиях при соблюдении требований инструкции по применению, материалы.

2. Удобство при использовании: изделие представляет собой набор реагентов, готовых к использованию.

3. Медицинское изделие с высокими показателями диагностической чувствительности (в исследованиях с образцами проб РНК человека, выделенных из образцов свежего клеточного осадка – 68,4 % с доверительной вероятностью 90 %, с образцами проб РНК человека, выделенных из образцов фиксированного в среде для стабилизации и сохранения РНК клеточного осадка – 68,4 % с доверительной вероятностью 90 %) и диагностической специфичности (в исследованиях с образцами проб РНК человека, выделенных из образцов свежего клеточного осадка – 73,1 % с доверительной вероятностью 90 %, с образцами проб РНК человека, выделенных из образцов фиксированного в среде для стабилизации и сохранения РНК клеточного осадка – 73,1 % с доверительной вероятностью 90 %) может применяться в целях поддержки диагностики рака предстательной железы, а также получения дополнительного критерия при назначении первой или повторной биопсии предстательной железы при обследовании мужчин в возрасте от 40 лет.

4. Воспроизводимость результатов 100 %. В процессе испытаний наборы продемонстрировали высокую надежность.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Брызгунова О.Е., Власов В.В., Лактионов П.П. Современные методы диагностики рака предстательной железы // Вопросы биомедицинской химии. – 2007 – Т. 1. – № 3 – С. 177–184.
- 2 Тороповский А.Н. и др. Оценка прогностической ценности тест-системы для неинвазивного определения уровня экспрессии гена PCA3 при диагностике рака предстательной железы // Злокачественные опухоли. – 2015. – № 4, спецвыпуск 2. – С. 273–274.
- 3 Павлов К.А., Корчагина А.А., Абдулина Ю.А. и др. PCA3 – перспективный биомаркер рака предстательной железы // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2012. – № 3. – С. 54–58.
- 4 Павлов К.А., Шкопоров А.Н., Хохлова Е.В. и др. Разработка диагностической тест-системы для ранней неинвазивной диагностики рака простаты, основанной на количественной детекции мРНК гена PCA3 в осадке мочи методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2013. – № 5. – С. 45–51.
- 5 Сидоренков А.В., Говоров А.В., Пушкарь Д.Ю. и др. Российская тест-система PCA3: первые результаты // Экспериментальная и клиническая урология. – 2014. – № 2. – С. 36–43.
- 6 Сидоренков А.В., Пушкарь Д.Ю. PCA3 – истинный онкомаркер рака предстательной железы (обзор литературы) // Онкоурология. – 2014. – № 2. – С. 70–77.
- 7 Bussemakers MJ, van Bokhoven A, Verhaegh GW et al. DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res* 1999; 59: 5975–9.
- 8 Groskopf J, Aubin SM, Deras IL, Blase A, Bodrug S, Clark C, et al. APTIMA PCA3 Molecular Urine Test: Development of a Method to Aid in the Diagnosis of Prostate Cancer. *Clin Chem* 2006; 52(6): 1089-95.
- 9 Hessels D, Klein Gunnewiek JM, van Oort I, Karthaus HF, van Leenders GJ, van Balken B, et al. DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur Urol* 2003; 44: 8-15.
- 10 Popa I, Fradet Y, Beaudry G, Hovington H, Beaudry G, Tetu B. Identification of PCA3 (DD3) in prostatic carcinoma by in situ hybridization. *Mod Pathol* 2007; 20: 1121–27.
- 11 Warrick JI, Tomlins SA, Carskadon SL, Young AM, Siddiqui J, Wei JT, et al. Evaluation of tissue PCA3 expression in prostate cancer by RNA in situ hybridization—a correlative study with urine PCA3 and TMPRSS2-ERG. *Mod Pathol* 2014; 27(4): 609-20.

Рукопись получена: 1 февраля 2018 г.

Принята к публикации: 15 февраля 2018 г.