

Progensa PCA3 Assay

Til *in vitro* diagnostisk brug.

Kun til eksport fra USA.

Generel information	2
Tilslgtet anvendelse	2
Resumé og forklaring af testen	2
Funktionsprincip	2
Vedlagte reagenser og materialer	4
Materialer	8
Advarsler og forholdsregler	10
Krav til opbevaring og håndtering	12
Indsamling, transport og opbevaring af prøver	14
Fremgangsmåde ved testning	16
Bemærkninger til fremgangsmåden	22
Kvalitetskontrolprocedurer	25
Fortolkning af resultater	26
Begrænsninger	31
Funktionskarakteristika	32
Bibliografi	38

Generel information

Tilsigtet anvendelse

Progensa PCA3 Assay er en *in vitro* nukleinsyreamplifikationstest (NAAT), der detekterer Prostatacancer gen 3 (PCA3) ribonukleinsyre (RNA) i urinprøver fra mænd til generering af en PCA3 Score. PCA3 Score beregnes til anvendelse sammen med almindeligt anvendte diagnostiske algoritmer som hjælp til diagnosticering af prostatacancer.

Resumé og forklaring af testen

Anvendelse af serum-PSA-testen (prostata-specifikt antigen) til prostatacancer-screening har resulteret i biopsidiagnosticering af mindre, tidligere ikke-detekterede tumorer (1) og har således skabt et nyt diagnostisk dilemma: Kun en brøkdel af mænd med øgede serum-PSA-niveauer har detekterbar prostatacancer. Mænd med mindst én negativ biopsi har ofte persisterende øget serum-PSA primært som følge af forstørrede prostata og benign prostatahyperplasi (BPH). En væsentlig del af mænd med lettere øget serum-PSA (2,5-4,0 µg/l) vil dog enten have eller vil udvikle klinisk signifikant prostatacancer (1). Selv om biopsi forbliver standarden for detektion af prostatacancer, er der behov for mere nøjagtige tests med bedre specificitet som hjælp til at tage beslutninger om prostatabiopsi.

PCA3 (der også kaldes "PCA3^{DD3}" eller "DD3^{PCA3}") er en ikke-kodende prostataspecifik RNA, der er kraftigt overudtrykt i prostatacancer celler med en median opregulering på 66-fold sammenlignet med hosliggende benign væv (2). Genekspressionen af PSA er derimod omtrent ens i cancer- og benigne celler; PSA RNA-niveauerne kan derfor anvendes til normalisering for mængden af prostataspecifik ribonukleinsyre (RNA) i molekylære testprøver. Effektiviteten af kvantitativ PCA3-baseret molekylær testning af urinsedimenter (2) og af ubehandlet urin (3) er blevet påvist.

Progensa PCA3 Assay anvender ubehandlet urin, opsamlet efter en rektaleksploration, der består af tre tryk pr. lap. Rektaleksplorationen løsner prostataceller, der går gennem prostatakanaalen og ind i urinvejen, hvor de kan opsamles i den første urin. Urinen behandles ved tilsætning af urintransportmedium (UTM), der lyserer cellerne og stabiliserer RNA. PCA3 og PSA RNA kvantificeres, og PCA3 Score bestemmes på grundlag af forholdet mellem PCA3 og PSA RNA. Foruden normalisering af PCA3-signal tjener måling af PSA RNA også til at bekræfte, at udbyttet af prostataspecifik RNA er tilstrækkeligt til at generere et gyldigt resultat. Højere PCA3 Scores korrelerer med større sandsynlighed for en positiv prostatabiopsi.

Funktionsprincip

Progensa PCA3 Assay består af to kvantitative nukleinsyreamplifikationstests. Progensa PCA3 Assay kombinerer teknikkerne til Target Capture, transkriptionsmedieret amplifikation (TMA) og hybridiseringsbeskyttelsesanalyse (HPA) til henholdsvis at strømline urinprøvebehandling, amplificere target RNA og detektere amplicon.

Når Progensa PCA3 Assay udføres i laboratoriet, isoleres target RNA-molekylerne fra urinprøverne vha. Target Capture. Oligonukleotider ("capture oligonukleotider"), der er komplementære til sekvensspecifikke regioner af targets, hybridiseres til targets i urinprøven. Der anvendes et separat capture-oligonukleotid til hvert target. Det hybridiserede target indfanges dernæst på magnetiske mikropartikler, der separeres fra urinprøven i et magnetisk

felt. Vasketrin anvendes til at fjerne fremmede komponenter fra reaktionsrøret. Magnetisk separation og vasketrin udføres med et Target Capture System.

Targetamplifikation forekommer via TMA, som er en transkriptionsbaseret nukleinsyreamplifikationsmetode, der anvender to enzymer, Moloney murint leukæmivirus (MMLV) revers transkriptase og T7 RNA polymerase. Der anvendes et unikt primersæt til hvert target. Revers transkriptase anvendes til at generere en deoxyribonukleinsyrekopi (DNA) (der indeholder en promotersekvens for T7 RNA polymerase) af target-sekvensen. T7 RNA-polymerase producerer flere kopier af RNA-amplicon fra DNA-kopiskabelonen.

Detektion opnås ved HPA vha. enstrengede kemiluminiserende nukleinsyreprober, der er komplementære til amplicon'et. Separate prober anvendes til hvert target-amplicon. De mærkede nukleinsyreprober hybridiserer specifikt til amplicon'et. Selektionsreagenset differentierer mellem hybridiserede og ikke-hybridiserede prober ved at inaktivere mærket på de ikke-hybridiserede prober. Under detektionstrinnet måles det kemiluminescerende signal, der produceres af den hybridiserede probe, i et luminometer og rapporteres som relative lysenheder (RLU).

PCA3 og PSA RNA kvantificeres i separate reagensglas og deres PCA3 Score bestemmes. Kalibratorer, der indeholder kendte mængder PCA3- eller PSA RNA-transkripter, inkluderes i hver analysekørsel og anvendes til at generere en standardkurve. PCA3- og PSA-kontroller inkluderes også til verificering af nøjagtigheden af resultaterne, der interpoleres fra standardkurven.

Vedlagte reagenser og materialer

Bemærk: For oplysninger om enhver fare og sikkerhedsdeklarerings, der kan være tilknyttet reagenser, henvises til Safety Data Sheet Library (Arkivet med sikkerhedsdataark) på www.hologic.com/sds.

Reagenser og materialer, der følger med i Progensa PCA3/PSA-Assay Kit til Progensa PCA3 Assay, står anført nedenfor. Reagenssymbolerne er ligeledes angivet ved siden af reagensbetegnelsen.

Progensa PCA3 Assay Kit, 2 x 100 reaktioner, kat.nr. 302355 (8 æsker)**Progensa PCA3 100-Reaction Kit**

Progensa PCA3, nedkølet æske — opbevares ved 2 °C-8 °C fra modtagelsen og indtil den anførte udløbsdato

Symbol	Komponent	Kvantitet
A	PCA3-amplifikationsreagens <i>Ikke-infektiøse nukleinsyrer tørret i HEPES bufferopløsning, der indeholder <10 % volumenforøgende middel.</i>	1 hætteglas
E	PCA3/PSA-enzymreagens <i>Revers transkriptase og RNA-polymerase tørret i HEPES bufferopløsning, der indeholder <10 % volumenforøgende middel.</i>	1 hætteglas
P	PCA3-probereagens <i>Ikke-infektiøse kemiluminescerende DNA-prober tørret i succinatbufferopløsning, der indeholder <5 % volumenforøgende middel og <5 % lithiumlaurylsulfat.</i>	1 hætteglas

Progensa PCA3, æske ved stuetemperatur — opbevares ved 15 °C-30 °C fra modtagelsen og indtil den anførte udløbsdato

Symbol	Komponent	Kvantitet
AR	Amplifikationrekonstitutionsopløsning til PCA3 <i>Vandig opløsning, der indeholder konserveringsmidler (<1 % parabener).</i>	1 x 9,3 ml
ER	PCA3/PSA-enzymrekonstitutionsopløsning <i>HEPES bufferopløsning, der indeholder overfladeaktivt stof (10 % Triton X-100) og 20 % glycerol.</i>	1 x 3,3 ml
PR	PCA3/PSA-proberekonstitutionsopløsning <i>Succinatbufferopløsning, der indeholder <5 % lithiumlaurylsulfat.</i>	1 x 12,4 ml
S	PCA3/PSA-selektionsreagens <i>Boratbufferopløsning, der indeholder overfladeaktivt stof (1 % Triton X-100).</i>	1 x 31 ml
TCR	PCA3-Target Capture-reagens <i>Ikke-infektiøs nukleinsyre i HEPES bufferopløsning, der indeholder fastfase.</i>	1 x 22 ml
	Afdækningspapir	1 pakke
	Rekonstitueringsmanchetter	1 pakke

Progensa PCA3 Calibrator and Controls Kit — opbevares ved 2 °C-8 °C fra modtagelsen og indtil den anførte udløbsdato

Symbol	Komponent	Kvantitet
CAL	PCA3-kalibrator 1 <i>Fosfatbufferopløsning, der indeholder <5 % lithiumlaurylsulfat.</i>	1 x 2,0 ml
CAL	PCA3-kalibratorer 2-5 <i>Ikke-infektøs PCA3-nukleinsyre i fosfatbufferopløsning, der indeholder <5 % lithiumlaurylsulfat.</i>	4 x 1,7 ml
PC	PCA3-positive kontroller <i>Ikke-infektøs PCA3-nukleinsyre i fosfatbufferopløsning, der indeholder <5 % lithiumlaurylsulfat.</i>	2 x 1,7 ml
	Informationsark, som angiver PCA3-koncentrationer	1 ark

Progensa PSA 100-Reaction Kit

Progensa PSA, nedkølet æske — opbevares ved 2 °C-8 °C fra modtagelsen og indtil den anførte udløbsdato

Symbol	Komponent	Kvantitet
A	PSA-amplifikationsreagens <i>Ikke-infektøse nukleinsyrer tørret i HEPES bufferopløsning, der indeholder <10 % volumenforøgende middel.</i>	1 hætteglas
E	PCA3/PSA-enzymreagens <i>Revers transkriptase og RNA-polymerase tørret i HEPES bufferopløsning, der indeholder <10 % volumenforøgende middel.</i>	1 hætteglas
P	PSA-probereagens <i>Ikke-infektøse kemiluminescerende DNA-prober tørret i succinatbufferopløsning, der indeholder <5 % volumenforøgende middel og <5 % lithiumlaurylsulfat.</i>	1 hætteglas

ProgenSA PSA, æske ved stuetemperatur — opbevares ved 15 °C-30 °C fra modtagelsen og indtil den anførte udløbsdato

Symbol	Komponent	Kvantitet
AR	Amplifikationsrekonstitutionsopløsning til PSA <i>Vandig opløsning, der indeholder konserveringsmidler (<1 % parabener).</i>	1 x 9,3 ml
ER	PCA3/PSA-enzymrekonstitutionsopløsning <i>HEPES bufferopløsning, der indeholder overfladeaktivt stof (10 % Triton X-100) og 20 % glycerol.</i>	1 x 3,3 ml
PR	PCA3/PSA-proberekonstitutionsopløsning <i>Succinatbufferopløsning, der indeholder <5 % lithiumlaurylsulfat.</i>	1 x 12,4 ml
S	PCA3/PSA-selektionsreagens <i>Boratbufferopløsning, der indeholder overfladeaktivt stof (1 % Triton X-100).</i>	1 x 31 ml
TCR	PSA-Target Capture-reagens <i>Ikke-infektøs nukleinsyre i HEPES bufferopløsning, der indeholder fastfase.</i>	1 x 22 ml
	Afdækningspapir	1 pakke
	Rekonstitueringsmanchetter	1 pakke

ProgenSA PSA Calibrator and Controls Kit — opbevares ved 2 °C-8 °C fra modtagelsen og indtil den anførte udløbsdato

Symbol	Komponent	Kvantitet
CAL	PSA-kalibrator 1 <i>Fosfatbufferopløsning, der indeholder <5 % lithiumlaurylsulfat.</i>	1 x 2,0 ml
CAL	PSA-kalibratore 2-5 <i>Ikke-infektøs PSA-nukleinsyre i fosfatbufferopløsning, der indeholder <5 % lithiumlaurylsulfat.</i>	4 x 1,7 ml
PC	PSA positive kontroller <i>Ikke-infektøs PSA-nukleinsyre i fosfatbufferopløsning, der indeholder <5 % lithiumlaurylsulfat.</i>	2 x 1,7 ml
	Informationsark, som angiver PSA-koncentrationer	1 ark

Aptima Assay Fluids — opbevares ved 15 °C-30 °C (2 æsker) fra modtagelsen og indtil den anførte udløbsdato

Symbol	Komponent	Kvantitet
W	Vaskeopløsning <i>HEPES bufferopløsning, der indeholder <2 % natriumdodecylsulfat.</i>	1 x 402 ml
DF	Buffer til deaktiveringsvæske <i>Bikarbonatbufferopløsning.</i>	1 x 402 ml
O	Oliereagens <i>Silikoneolie.</i>	1 x 24,6 ml

Bemærk: Alle materialerne, der er med i Progenssa PCA3 Assay Kit, kan også købes separat (der er nærmere oplysninger i afsnittet Materialer).

Materialer

Bemærk: For oplysninger om enhver fare og sikkerhedsdeklareringer, der kan være tilknyttet reagenser, henvises til Safety Data Sheet Library (Arkivet med sikkerhedsdataark) på www.hologic.com/sds.

Bemærk: Materialer, der fås hos Hologic, står opført med katalognummer.

Nødvendige materialer, der skal anskaffes separat

	<u>kat. nr.</u>
Progensa PCA3 Urine Specimen Transport Kit	302352
Leader HC+ luminometer	104747
Hologic Target Capture System (TCS)	104555
Aptima Auto Detect Kit	301048
2 eppendorf Repeater Plus pipetter	105725
Spidser til gentagelsespipetter (2,5 ml, 5,0 ml, 25,0 ml)	—
Enten:	—
2 stk. multireagensglas-vortexmixere	102160F
3 stk. cirkulationsvandbade (62 °C ± 1 °C, 42 °C ± 1 °C, 62 °C ± 1 °C)	104586F
3 stk. vandbadsindsatser	104627
ELLER	
2 stk. SB100 Dry Heat Bath/vortexmixere	105524F
Yderligere SB100-instrumenter kan være påkrævet, alt afhængigt af ønsket kapacitet	
Mikropipette, 1000 µl RAININ PR1000	901715
Spidser, 1000 µl PR1000	105049
Pipette, eppendorf 20-200 µl	105726
Spidser, pipette 20-200 µl	—
Blegemiddel, 5 %-7 % (0,7 M til 1,0 M) natriumhypochloritopløsning	—
Store plastbeholdere med låg	—
Standard urinindsamlingsbeholdere uden konserveringsmidler	—
Enheder med ti reagensglas (TTU)	TU0022
Ti-spids-kassetter (TTC)	104578
SysCheck kalibreringsstandard	301078

Valgfri materialer

	<u>kat. nr.</u>
Progensa PCA3 100-Reaction Kit	302354
Progensa PSA 100-Reaction Kit	302357
Progensa PCA3 Calibrators and Controls Kit	302353
Progensa PSA Calibrators and Controls Kit	302356

		<u>kat. nr.</u>
Progensa PCA3/PSA Proficiency Panels		302350
Progensa PCA3 Specimen Diluent Kit		302351
Aptima Assay Fluids Kit		302002C
Engangspipettespidser med filter (1 ml)		10612513 (Tecan)
TECAN Freedom EVO 100/4		900932
<i>PCA3-dækplade, DTS 800</i>	902021	—
<i>Reagensbeholder (40 ml kvart modul)</i>	104765	
<i>Delt reagensbeholder (19 ml x 2 kvart modul)</i>	901172	
Transportrør		302521
Gennemtrængelige udskiftningshætter		302520
Uigennemtrængelige udskiftningshætter		103036A

Advarsler og forholdsregler

- A. Til *in vitro* diagnostisk brug.
- B. Kun til eksport fra USA.

Vedrørende laboratoriet

- C. Brug kun medfølgende eller specificerede laboratorieartikler til engangsbrug.
- D. Rutinemæssige laboratorieforholdsregler skal følges. Der må hverken spises, drikkes eller ryges i arbejdsområderne. Brug engangshandsker uden pudder, beskyttelsesbriller og laboratoriekittel ved håndtering af urinprøver og kitreagenser. Vask hænderne grundigt efter håndtering af urinprøver og kitreagenser.
- E. **Advarsel: Lokalirriterende, ætsende stoffer.** Undgå, at Auto Detect 1 og Auto Detect 2 kommer i kontakt med huden, øjnene og slimhinderne. Hvis disse væsker kommer i kontakt med huden eller øjnene, vaskes det pågældende sted med vand. Hvis disse væsker spildes, skal den spildte væske fortyndes med vand, inden den tørres op.
- F. Arbejdsflader, pipetter og andet udstyr skal regelmæssigt dekontamineres med 2,5 %-3,5 % (0,35 M-0,5 M) natriumhypochloritopløsning (se *Bemærkninger til fremgangsmåden*).
- G. Det anbefales stærkt, at der benyttes et separat område til post-amplifikation, så amplicon-kontaminering i analysen minimeres. Dette særlige område skal være i afstand af præ-amplifikationsområdet, hvor reagensklargøring, Target Capture og amplifikation finder sted.
- H. Laboratorieområdet skal indrettes med arbejdsgang i én retning fra reagensklargøring til og med post-amplifikation for at bidrage til at forhindre, at områder af laboratoriet bliver kontamineret med amplicon. Prøver, udstyr og reagenser bør ikke føres tilbage til det område, hvor et tidligere trin blev udført. Personalet bør ikke gå tilbage til et tidligere arbejdsområde uden at tage korrekte foranstaltninger imod kontaminering.

Vedrørende prøver

- I. Efter at urin er blevet tilsat, skal væskenniveauet i transportrøret til urinprøver til at begynde med stå mellem de to sorte indikatorstreger på etiketten på røret. Hvis det ikke er tilfældet, skal prøven kasseres.
- J. Under forsendelse af prøver skal korrekte opbevaringsforhold bevares for at sikre prøvens integritet. Prøvestabilitet under forsendelsesforhold, der er anderledes end de anbefalede forhold, er ikke blevet vurderet.
- K. Udløbsdatoerne på prøveudtagningskit gælder for indsamlingsstedet og ikke for laboratoriet, hvor testen foretages. Prøver, der indsamles før udløbsdatoen på indsamlingskittet og transporteres og opbevares som anvist i indlægssedlen, kan testes, selv om udløbsdatoen for indsamlingsglasset er passeret.
- L. Alle prøver skal opbevares ved den specificerede temperatur. Hvis der anvendes forkert opbevarede prøver, kan det indvirke på analysepræstationen. Se særlig anvisning i *Indsamling, transport og opbevaring af prøver*.

- M. Urinprøver kan være infektiøse. Der skal tages generelle forholdsregler ved udførelse af denne analyse. Korrekte håndterings- og bortskaffelsesmetoder bør etableres af laboratorielederen. Kun personale, der er korrekt oplært i udførelse af Progensa PCA3 Assay og i håndtering af infektiøse materialer, bør have tilladelse til at udføre denne procedure.
- N. Undgå krydskontaminering under prøvehåndteringstrinnene. Urinprøver kan indeholde høje niveauer af RNA target. Pas på, at prøvebeholdere ikke rører hinanden, og kassér brugte materialer uden at føre dem hen over åbne beholdere. Hvis handsker kommer i kontakt med en prøve, skal der skiftes handsker for at undgå krydskontaminering.

Vedrørende analyse

- O. Dette kit må ikke anvendes efter udløbsdatoen.
- P. **For Progensa PCA3 Assay Kittet må PCA3-analysereagenser med forskellige lotnumre ikke byttes om med hinanden, blandes eller kombineres** (dvs. for hver analyt skal analysereagenserne i den nedkølede æske og i æsken ved stuetemperatur være fra samme lotnummer). Analysereagenserne kan bruges sammen med kalibrator- og kontrolkit fra forskellige lotnumre. Aptima Assay Fluids kits kan byttes om med hinanden. Det er ikke nødvendigt at matche PCA3- og PSA-analysereagenskit med hinanden.
- Q. Alle prøvereagenser skal opbevares ved den specificerede temperatur. Hvis der anvendes forkert opbevarede analysereagenser, kan det indvirke på analysepræstationen. Se særlige anvisninger i *Krav til opbevaring og håndtering og Bemærkninger til fremgangsmåden*.
- R. Til analysedeaktivering (se *Fremgangsmåde ved testning*) skal natriumhypochloritopløsningen være mindst 2,5 % (0,35 M) **efter** fortynding med deaktiveringsbuffer i forholdet 1:1. Man skal derfor starte med en natriumhypochloritopløsning på 5 %-7 % (0,7 M-1,0 M) for at opnå den slutkoncentration, der er nødvendig til deaktivering.
- S. Der skal anvendes spidser med hydrofobiske propper. Der skal anvendes mindst to gentagelsespipetter specifikt dedikerede til denne analyse: Én til præ-amplifikationstrinnene, og én til post-amplifikationstrinnene. Der skal anvendes én mikropipette specielt til prøveoverførsel, medmindre der anvendes et TECAN Freedom EVO 100/4-instrument. Alle pipetter skal renses regelmæssigt, som anvist i *Bemærkninger til fremgangsmåden*.
- T. Når der anvendes gentagelsespipetter til reagenstilsætning, må pipettespidsen ikke røre ved reaktionsrøret, så overførsel fra et glas til et andet undgås.
- U. Korrekt blanding er nødvendig for at opnå nøjagtige analyseresultater. Find alle oplysninger i *Bemærkninger til fremgangsmåden*.
- V. Der skal anvendes separate vandbade til præ-amplifikations- og post-amplifikationstrinnene i analysen.
- W. Visse reagenser i dette kit er mærket med risiko- og sikkerhedssymboler i henhold til EU-direktiv 1999/45/EC og bør håndteres i henhold dertil. Sikkerhedsdatablade kan ses på webstedet www.hologic.com og fås på anmodning.

Krav til opbevaring og håndtering

A. Der henvises til oplysninger om opbevaring af reagenser i Tabel 1.

Tabel 1: Opbevaring af reagenser

Reagens/væske	Opbevaring uåbnet	Åbnet/rekonstitueret Stabilitet (indtil udløbsdatoen)
Amplifikation-reagenser	2 °C-8 °C indtil udløbsdatoen	30 dage ved 2 °C-8 °C*
Probereagenser	2 °C-8 °C indtil udløbsdatoen	30 dage ved 2 °C-8 °C*
Enzymreagens	2 °C-8 °C indtil udløbsdatoen	30 dage ved 2 °C-8 °C*
Target Capture-reagenser	15 °C-30 °C indtil udløbsdatoen	30 dage ved 15 °C-30 °C
Amplifikationrekonstitutions-opløsning	2 °C-30 °C indtil udløbsdatoen	Ikke relevant (til engangsbrug)
Proberekonstitutions-opløsning	2 °C-30 °C indtil udløbsdatoen	Ikke relevant (til engangsbrug)
Enzymrekonstitutions-opløsning	2 °C-30 °C indtil udløbsdatoen	Ikke relevant (til engangsbrug)
Selektionsreagens	2 °C-30 °C indtil udløbsdatoen	30 dage ved 15 °C-30 °C
Kalibratører	2 °C-8 °C indtil udløbsdatoen	Ikke relevant (til engangsbrug)
Kontroller	2 °C-8 °C indtil udløbsdatoen	Ikke relevant (til engangsbrug)
Oliereagens	15 °C-30 °C indtil udløbsdatoen	30 dage ved 15 °C-30 °C
Vaskeopløsning	15 °C-30 °C indtil udløbsdatoen	30 dage ved 15 °C-30 °C
Buffer til deaktiveringsvæske	15 °C-30 °C indtil udløbsdatoen	28 dage ved 15 °C-30 °C

*Kan bruges igen til andre analysekørsler op til fire gange, hvis det samlede tidsrum ved stuetemperatur ikke overstiger 24 timer.

B. Target capture-reagens må ikke opbevares ved temperatur under 15 °C.

C. Probereagens og rekonstitueret probereagens er lysfølsomme. Disse reagenser skal beskyttes mod længere tids udsættelse for lys under opbevaring og klargøring til brug.

D. Reagenserne må ikke fryses.

E. Reagenser og væsker må ikke bruges efter udløbsdatoen.

F. Progensa PCA3- og PSA-kalibratører og -kontroller er hætteglas til engangsbrug og skal kasseres efter brug.

G. Ændringer i medfølgende reagensers udseende kan være tegn på ustabilitet eller nedbrydning af disse materialer. Hvis der konstateres ændringer i udseendet på reagenser, der resuspenderes (f.eks. tydelige ændringer i reagensfarve eller uklarhed, hvilket er tegn på mikrobiel kontaminering), skal teknisk rådgivning hos Hologic kontaktes, inden reagenserne tages i brug.

H. Rekonstitueret reagens skal kasseres efter 30 dage eller ved udløbsdatoen, alt efter hvad der indtræder først.

- I. Resterende åbnet eller rekonstitueret reagensmateriale kan anvendes i efterfølgende analyser, hvis det opbevares på korrekt måde efter at være blevet brugt første gang. Resterende reagensmateriale kan blive pooled med netop klargjort eller andet resterende reagensmateriale fra samme lot. **Reagenser fra kit med forskellige lotnumre må ikke byttes om med hinanden, blandes eller kombineres.** (Se *Advarsler og forholdsregler*.) Ingen komponenter i pooled reagensmaterialer må have passeret grænserne for opbevaring af åbnet eller rekonstitueret reagensmateriale. Det poolede reagensmateriale skal blandes grundigt, og der skal være klargjort en mængde, der er tilstrækkelig til en hel analysekørsel.

Indsamling, transport og opbevaring af prøver

Progensa PCA3 Assay er beregnet til kvantificering af PCA3 og PSA RNA i den første urin indsamlet efter en rektaleksploration, der består af tre tryk pr. lap. Urin behandles med Progensa PCA3 Urine Specimen Transport Kit. Stabiliteten af PCA3 og PSA RNA i urin og behandlet urin blev etableret ved at følge RNA-kopiniveauer i urinprøver, der blev opsamlet som anvist nedenfor.

A. Anvisning i opsamling og behandling af urinprøver:

1. Det kan være nyttigt at bede patienten om at drikke en stor mængde vand (ca. 500 ml) for at få tilstrækkelig urin til opsamling.
2. Foretag en rektaleksploration, som beskrevet nedenfor, umiddelbart før urinopsamlingen:

Påfør tryk på prostata; trykket skal være tilstrækkeligt til at trykke overfladen ca. 1 cm ned fra basis til apex og fra den laterale linie til midterlinien for hver lap som vist i Figur 1. Der skal påføres nøjagtigt tre tryk for hver lap. Det skal ikke være en prostatamassage.

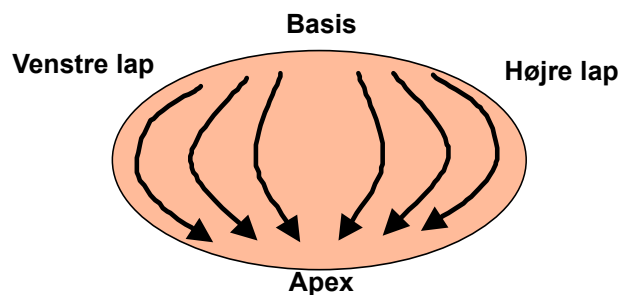


Fig. 1. Korrekt retning af påført prostatatryk

3. Efter rektaleksplorationen skal patienten instrueres i at opsamle den første urin (ca. 20-30 ml af den første urinstrøm) i et korrekt mærket urinopsamlingsbæger. Det skal være den første urinprøve, der udtømmes efter rektaleksploration. Der skal bruges et opsamlingsbæger uden konserveringsmidler. Hvis en patient ikke kan stoppe urinstrømmen og giver mere urin end de første 20-30 ml, der anmodes om, skal hele urinmængden beholdes. Hvis patienten ikke kan afgive den anmodede mængde urin, skal der være mindst 2,5 ml til at køre Progensa PCA3 Assay. Hvis det ikke er tilfældet, skal prøven kasseres.

Bemærk: Meget høje urinmængder kan nedsætte analytkoncentrationerne af PCA3 og PSA, og kan i sjældne tilfælde resultere i en ugyldig prøve. Patienten bør derfor prøve at undgå at fylde urinopsamlingsbægeret helt op.

4. Hvis ubehandlede urinprøver ikke behandles omgående, skal de holdes ved 2 °C-8 °C eller lægges på is. Afkølede, ubehandlede urinprøver skal overføres til transportrøret til urinprøver i løbet af 4 timer efter opsamling. Ellers skal prøven kasseres, og der skal indsamles en ny. Ubehandlede urinprøver må ikke fryses.
5. Urinprøver behandles ved at sætte hættten godt på og vende den ubehandlede urinprøve om 5 gange, så cellerne resuspenderes. Tag hættten af transportrøret til urinprøver, og overfør 2,5 ml af den opsamlede urin til røret med overførselspipetten til engangsbrug. Der er korrekt mængde urin i røret, når væskenniveauet er mellem de sorte streger på etiketten på transportrøret til urinprøver.

6. Sæt hættten godt fast på transportrøret til urinprøver igen, og vend urinprøven om 5 gange, så den blandes. Dette kaldes nu den behandlede urinprøve.

B. Prøvetransport og -opbevaring inden testning:

1. Behandlede urinprøver skal transporteres til laboratoriet i transportrør til urinprøver. De kan forsendes ved omgivelsestemperatur (uden temperaturkontrol) eller frosne. Forsendelsen skal foregå på en sådan måde, at prøver modtages på teststedet i løbet af 5 dage efter opsamlingen.

Ved modtagelsen af forsendelsen bør laboratoriet kontrollere datoen for prøvetagningen på røret. Hvis forsendelsen af prøverne var ved omgivelsestemperatur, og modtages mere end 5 dage efter prøveindsamling, skal prøven forkastes, og der bør anmodes om en ny prøve. Laboratoriet kan opbevare prøverne ved 2 °C-8 °C i op til 14 dage, inden de skal bortskaffes. Hvis længere tidsperioder er nødvendige, henvises til Tabel 2 ang. tilladelige opbevaringstider ved forskellige temperaturer.

Tabel 2: Opbevaringstid for behandlede urinprøver

Opbevaringstemperatur	Tidsrum
Opbevaring og forsendelse af behandlede prøver:	Op til 5 dage*
Efter modtagelse på teststed:	
2 °C-8 °C	Op til 14 dage
-35 °C til -15 °C	Op til 11 måneder**
Ved eller under -65 °C	Op til 36 måneder**

*Den tid, som forsendelsen må tage ved omgivelsestemperatur eller frosnen.

**Tid tilladt efter opbevaring i køleskab.

2. Behandlede urinprøver kan fryses og tøs op 5 gange.

C. Opbevaring af prøver efter testning:

1. Prøver, der er blevet analyseret, skal opbevares lodret i et stativ.
2. Hvis transportrør til urinprøver ikke lukkes med en intakt hætte, skal de dækkes med en ny og ren plast- eller foliebarriere.
3. Hvis de analyserede prøver skal fryses eller sendes, tages de gennemtrængelige hætter af transportrørene til urinprøver, og der sættes nye uigennemtrængelige hætter på. De anbefalede temperaturer skal opretholdes, hvis prøverne sendes til testning et andet sted. **Undgå sprøjtning og krydskontaminering.**

Bemærk: Prøver skal forsendes i henhold til gældende nationale og internationale transportregulativer.

Fremgangsmåde ved testning

A. Klargøring af arbejdsområde

1. Justér et vandbad til $62\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ til præ-amplifikation, et andet vandbad til $42\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ til amplifikation og et tredje vandbad til $62\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ til post-amplifikation. Sørg for, at der er tilstrækkeligt vand i vandbadene (se *Bemærkninger til fremgangsmåden*). Hvis der anvendes SB100 Dry Heat Bath/vortexmixer, henvises der til *Brugervejledningen til SB100 Dry Heat Bath/vortexmixer til Progensa PCA3 Assay (Brugervejledning til SB100)*.
2. Inden analysen startes, skal arbejdsflader og pipetter aftørres med 2,5 %-3,5 % (0,35-0,5 M) natriumhypochloritopløsning. Lad natriumhypochloritopløsningen blive på kontaktfladerne og pipetterne i mindst 1 minut, og skyl dernæst efter med vand. Natriumhypochloritopløsningen må ikke tørre. Dæk bordoverfladen, hvor reaktionen skal udføres, med rene, absorberende afdækningsstykker med plastbagbeklædning til laboratorieborde.
3. Sæt et tilstrækkeligt antal ti-spids-kassetter i Target Capture System (TCS). Kontrollér, at TCS-vaskeflasken er fyldt med vaskeopløsning, og at aspiratoren er forbundet til vakuumpumpen. (Der henvises til *Brugervejledning til Target Capture System*).

B. Rekonstituering og klargøring af reagenser

Reagensrekonstituering skal udføres, inden prøveoverførsel påbegyndes.

1. Til rekonstituering af amplifikations-, enzym- og probereagenser kombineres flaskerne med frysetørret reagens og rekonstitutionsopløsningen. Hvis rekonstitutionsopløsningen er i køleskab, skal den have stuetemperatur inden brug.

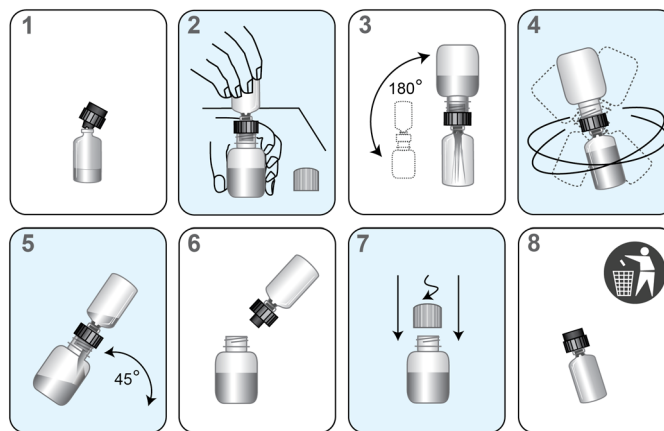


Fig. 2. Rekonstitueringsprocessen

- a. Gruppér den pågældende rekonstitutionsopløsning sammen med det tørrede reagens. Kontrollér, at hætteglassene har samme etiketfarve for at sikre, at de er grupperet korrekt.
- b. Åbn det tørrede reagenshætteglas, og sæt den udskårne ende af rekonstitueringsmanchetten i hætteglasåbningen (Figur 2, trin 1).
- c. Åbn den tilhørende flaske med rekonstitutionsopløsning, og læg låget på et rent, afdækket arbejdsbord. Hold flasken med opløsning på bordet, og sæt den anden ende af rekonstitueringsmanchetten i flaskehalsen med fast hånd (Figur 2, trin 2).

- d. Vend langsomt op og ned på de samlede flasker. Vent på, at opløsningen går fra flasken over i hætteglasset (Figur 2, trin 3). Vent på, at det frysetørrede reagens opløses, og vend dernæst forsigtigt opløsningen i hætteglasset, så den blandes. Pas på ikke at få indholdet til at skumme, mens flasken hvirvles rundt (Figur 2, trin 4).
 - e. Vend glassene om, og vip dem i en vinkel på 45°, så der bliver mindst mulig skum (Figur 2, trin 5). Vent på, at al væsken går tilbage i plastflasken.
 - f. Fjern rekonstitueringsmanchetten og hætteglasset (Figur 2, trin 6).
 - g. Sæt låget på plastflasken igen (Figur 2, trin 7). Skriv operatørens initialer og rekonstitueringsdatoen på alle rekonstituerede reagenshætteglas. Husk at notere analytten (PCA3 eller PSA) ned på hætteglassene med probereagens.
 - h. Bortskaf rekonstitueringsmanchet og hætteglas (Figur 2, trin 8).
2. Tidligere rekonstituerede probe-, amplifikations- og enzymreagenser skal have stuetemperatur (15 °C-30 °C), inden analysen påbegyndes. Der henvises til *Krav til opbevaring og håndtering*, hvis resterende reagenser blandes. Hvis rekonstitueret amplifikationsreagens indeholder bundfald, der ikke bliver opløst ved stuetemperatur, opvarmes det til 62 °C ± 1 °C i 1-2 minutter i præ-amplifikationsområdet. Hvis rekonstitueret probereagens indeholder bundfald, der ikke bliver opløst ved stuetemperatur, opvarmes det til 62 °C ± 1 °C i 1-2 minutter i post-amplifikationsområdet. Efter sådan opvarmning kan de rekonstituerede reagenser anvendes, selv om der er rester af bundfald. Efter resuspension blandes hætteglassene ved at vende dem forsigtigt om.

C. Klargøring af stativ

Gentagelsespipetten, der anvendes til Target Capture, prøveoverførsel og amplifikation, må kun benyttes i disse trin af processen (se *Advarsler og forholdsregler*).

1. Der skal klargøres et stativ til PCA3-analytten og et andet stativ til PSA-analytten.
Bemærk: Hvis antallet af prøver er lavt nok, kan begge analytter testes i et enkelt stativ. Hvis der anvendes TECAN Freedom EVO 100/4-instrument, skal hver analyt have et separat stativ. Der kan højst testes to fulde stativer (20 TTU'er) ad gangen.
2. Sæt et tilstrækkeligt antal TTU'er til kalibratorerne, kontrollerne og prøverne til hver enkelt analyt i stativet eller stativerne til enheder med ti reagensglas (TTU'er).
3. Mærk TTU'erne med prøve-id-numrene. Tabel 3 beskriver tilsætningen af kalibratører, kontroller og prøver. Start PSA-kalibratører på en ny TTU.

Bemærk: Kalibratører skal køre i tre replikater og kontroller i to replikater hver, og de skal køres i samme stativ som prøverne. Prøver skal køres i duplikat. Der må ikke være tomme reaktionsrør mellem kalibratører, kontroller og prøver. Hvis TECAN Freedom EVO 100/4-instrumentet anvendes, henvises der til nærmere anvisning i TECAN Freedom EVO 100/4-brugervejledning til Progenssa PCA3 Assay (TECAN Freedom EVO-brugervejledning).

Tabel 3: Eksempel på klargøring af stativ

Stativ Position	Prøve Beskrivelse	*Target PCA3-koncentration (Kopier/ml (c/ml))	*Target PSA Koncentration (Kopier/ml (c/ml))
1-3	Kalibrator 1	0	0
4-6	Kalibrator 2	250	7.500
7-9	Kalibrator 3	2.500	75.000
10-12	Kalibrator 4	25.000	750.000
13-15	Kalibrator 5	125.000	3.000.000
16-17	Kontrol A	1.250	37.500
18-19	Kontrol B	62.500	1.500.000
20-n	Prøve	ukendt	ukendt

*Positive PCA3- og PSA-kalibratore og kontroller har tildelte værdier, så de faktiske værdier for kopier/ml for kalibrator 2-5 og kontrol A og B vil være lidt forskellige fra målkoncentrationerne, der står opført i tabellen, og vil variere fra lot til lot. Informationen om koncentrationer står på et kort i pakken med kalibrator- og kontrolhætteglas, og anvendes til kalibrering og bestemmelse af kørselsydighed.

D. Verificering af koncentrationsinformation

Kontrollér sammen med systemadministratoren af Progensa PCA3 Assay-softwaren, at koncentrationsinformationen for de testede Progensa PCA3- og PSA-kalibrator- og kontrolkitlot er blevet indtastet. Der er nærmere oplysninger i *Lynvejledning til Progensa PCA3 Assay (Lynvejledning)* og *Systemadministratorvejledning til Progensa PCA3 Assay-software*.

Bemærk: Indtastning af koncentrationsinformation er påkrævet, **inden første brug** af hver enkelt nye kalibrator- og kontrolkitlot. Til efterfølgende kørsler, der bruger kalibratore og kontroller fra samme kitlot, skal der ikke indtastes yderligere.

E. Klargøring af Worklist Editor

Opret en arbejdsliste til analysekørsel vha. Hologic Worklist Editor på en computer i præ-amplifikationsområdet. Anvisning i brug af Worklist Editor står i *Lynvejledningen* eller *Brugervejledningen til Hologic Worklist Editor*. Hvis TECAN Freedom EVO 100/4-instrumentet anvendes, henvises der til nærmere anvisning i *TECAN Freedom EVO-brugervejledningen*.

F. Prøveklargøring

1. Vent på, at kalibratore og kontroller når stuetemperatur, inden testningen påbegyndes. Bland hætteglassene ved at vende dem forsigtigt om.
2. Vent på, at prøverne får stuetemperatur, inden testningen påbegyndes. **Prøverne må ikke blandes i vortexmixer.** Prøverne skal blandes ved, at de lejlighedsvist vendes forsigtigt om under opvarmningsperioden. Se *Bemærkninger til fremgangsmåden* for information om bundfald, der ikke vil opløses, og om håndtering af frosne prøver.

G. Præ-amplifikation

Præ-amplifikationsmiljøet skal være 15 °C-30 °C. Kør begge stativer i parallelkørsel. Hvis der anvendes SB100 Dry Heat Bath/vortexmixer, henvises der til *SB100-brugervejledningen*. Hvis TECAN Freedom EVO 100/4-instrumentet anvendes, henvises der til nærmere anvisning i *TECAN Freedom EVO-brugervejledningen*.

1. Bland Target capture-reagenset (TCR) grundigt ved at dreje eller vende glasset om. Tilsæt 100 µl analytspecifikt TCR til det relevante reaktionsrør med gentagelsespipetten.
2. Gennembor hættten på kalibratorhætteglasset med mikropipetten, og tilsæt 400 µl kalibrator til det korrekt mærkede reaktionsrør. Brug samme pipettespids til at trække replikattilsætninger fra hætteglasset gennem den gennemborede hætte. Brug nye pipettespidser for hvert kalibratorhætteglas. Gentag dette ved tilsætning af kontroller og prøver. Tildæk og gem evt. resterende prøvemateriale ved højst 8 °C (se *Indsamling, transport og opbevaring af prøver*) i tilfælde af, at det er nødvendigt at gentage testen.
3. Tildæk TTU'erne med afdækningspapir, og ryst stativet forsigtigt med håndkraft. **Må ikke blandes i vortexmixer.** Inkubér stativet ved 62 °C ± 1 °C i vandbad i 30 ± 5 minutter.
4. Tag stativet op af vandbadet, og dup bunden af reagensglassene tørre med absorberende materiale.
5. Kontrollér, at afdækningspapiret sidder godt fast. Udskift evt. afdækningspapiret med nyt, og luk TTU'erne godt til.
6. Bland stativet i 60 sekunder i multireagensglas-vortexmixeren (se *Bemærkninger til fremgangsmåden*). Påbegynd blanding i vortexmixer i løbet af 2 minutter efter, at stativet er taget op af vandbadet.
7. Lad afdækningspapiret sidde på glassene, og inkubér stativet ved stuetemperatur i 30 ± 5 minutter.
8. Anbring stativet med Front-fremspringet foran på en TCS magnetisk sokkel i 5-10 minutter. Sæt TTC'er i TTC-stativet.
9. Prim slangerne på dispenseringsstationspumpen ved at pumpe vaskeopløsning gennem dispenseringsmanifolden. Pump så megen væsken gennem systemet, at der ikke er luftbobler i slangen, og der kommer en jævn væskestrøm ud af alle ti dyser.
10. Tænd vakuumpumpen, og tag aspirationsmanifolden af ved den første studs mellem aspirationsmanifolden og opfangningsflasken. Kontrollér, at vakuummeteret holder specifikationen for tæthedsafprøvning. Det kan tage 15 sekunder at få denne måling. Forbind manifolden igen, og kontrollér, at vakuummeteret holder specifikationen for vakuumniveau. Lad vakuumpumpen være slået til, indtil alle target-capture-trin er færdige, og aspirationsmanifoldens slange er tør.
Se specifikationerne for vakuum på Target Capture System, der står bag i *Brugervejledningen til Target Capture System*, eller kontakt teknisk rådgivning hos Hologic for at få nærmere oplysninger.
11. Sæt aspirationsmanifolden godt fast i det første sæt spidser. Sænk spidserne ned i den første TTU, til spidserne rører toppen af væsken. Bevar spidsernes kontakt med toppen af væsken, mens spidserne bevæger sig nedad, til spidserne kommer i kort kontakt med bunden af reagensglassene. Slå forsigtigt spidserne mod bunden af reagensglassene, til al resterende væske er fjernet. Spidserne må ikke holdes i langvarig kontakt med bunden af reagensglassene eller slås hurtigt, da der kan dannes for meget skum i vakuumlåsen.

12. Når aspirationen er færdig, kastes spidserne ud i den originale spidskassette. Gentag anvisningen i aspiration på de resterende TTU'er; der skal bruges en ny spids til hvert reaktionsrør.
13. Sæt dispenseringsmanifolden over hver TTU, og tilføj 1,0 ml vaskeopløsning i hvert glas i TTU'en vha. dispenseringsstationspumpen.
14. Dæk reagensglassene til med afdækningspapir, og tag stativet af TCS'et. Bland stativet én gang i multireagensglas-vortexmixer. Se *Bemærkninger til fremgangsmåden* for yderligere oplysninger.
15. Anbring stativet på en TCS magnetisk sokkel i 5-10 minutter.
16. Aspirér al væske som i Trin 11 og i 12.
17. Efter den sidste aspiration tages stativet af TCS-soklen, og reagensglassene ses efter for at sikre, at al væske er blevet aspireret, og alle glas indeholder magnetisk partikelpellet. Hvis der kan ses væske, sættes stativet tilbage i TCS-soklen i 2 minutter; gentag aspirationen for den TTU, idet de samme spidser, som tidligere blev brugt til hvert reaktionsrør, bruges igen. Hvis der er NOGET magnetisk partikelpellet synligt, når aspirationen er færdig, kan reagensglasset accepteres. Hvis der ikke er pellet synligt, skal prøven testes igen. Hvis den samme prøve ikke indeholder et magnetisk partikelpellet på dette trin i en efterfølgende kørsel, kan dette indicere et prøvespecifikt problem. Opsamling af en ny urinprøve anbefales i denne situation.

H. Amplifikation

Bemærk: Enzymtilsætning til et reaktionsrør (Trin 6 og 7 nedenfor) skal udføres i løbet af højst 90 sekunder.

Udfør Trin 6 og 7 på ét stativ, inden gentagelse på et andet stativ. Hvis der anvendes SB100 Dry Heat Bath/vortexmixer, henvises der til *SB100-brugervejledningen*. Hvis TECAN Freedom EVO 100/4-instrumentet anvendes, henvises der til nærmere anvisning i *TECAN Freedom EVO-brugervejledningen*.

1. Tilsæt 75 µl rekonstitueret analytspecifikt amplifikationsreagens til hvert enkelt reaktionsrør med gentagelsespipetten. Alle reaktionsblandinger i stativet skal nu blive røde.
2. Tilsæt 200 µl oliereagens med gentagelsespipetten.
3. Tildæk reagensglassene med afdækningspapir, og bland dem på multireagensglas-vortexmixeren.
4. Inkubér stativet i præ-amp vandbad ved $62\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ i 10 ± 5 minutter.
5. Overfør stativet til et vandbad ved $42\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ i 5 ± 2 minutter.
6. Med stativet i vandbadet fjernes afdækningspapiret forsigtigt, og der tilsættes 25 µl rekonstitueret enzymreagens til hver af reaktionsblandingerne med gentagelsespipetten. Alle reaktioner skal nu blive orangefarvede.
7. Tildæk omgående reagensglassene med nyt afdækningspapir, tag stativet op af vandbadet, og bland reaktionerne ved forsigtigt at ryste stativet med håndkraft.

Bemærk: Tidsrummet, stativet er uden for vandbadet, skal holdes mindst muligt for at forhindre, at reagensglassene køler af.

8. Inkubér stativet ved $42\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ i 60 ± 5 minutter.

I. Post-amplifikation

Den gentagelsespipette, der anvendes til hybridisering og selektion, må kun anvendes til disse trin i processen (se *Advarsler og forholdsregler*). Post-amplifikationsmiljøet, inklusive detektion, skal være 15 °C-30 °C. Hvis der anvendes SB100 Dry Heat Bath/ vortexmixer, henvises der til *SB100-brugervejledningen*.

1. Hybridisering

- a. Tag stativet op af præ-amplifikationsvandbadet, og overfør det til post-amplifikationsområdet. Tilsæt 100 µl rekonstitueret analytspecifikt proberegens med gentagelsespipetten. Alle reaktionsblandinger skal nu blive gule.
- b. Tildæk reagensglassene med afdækningspapir, bland i 10 sekunder på multireagensglas-vortexmixer, eller til farven er ensartet.
- c. Inkubér stativet ved 62 °C ± 1 °C i vandbad i 20 ± 5 minutter.
- d. Tag stativet op af vandbadet, og inkubér det ved stuetemperatur i 5 ± 1 minut.

2. Selektion

- a. Fyld 250 µl selektionsreagens i hvert reagensglas med gentagelsespipetten. Alle reaktioner skal nu blive pink.
- b. Tildæk reagensglassene med afdækningspapir, bland stativet i 10 sekunder på vortexmixer, eller til farven er ensartet, og inkubér stativet i et vandbad ved 62 °C ± 1 °C i 10 ± 1 minut.
- c. Tag stativet op af vandbadet. Inkubér stativet ved stuetemperatur i 15 ± 3 minutter.

J. Detektion

Anvisning i anvendelse af Leader HC+ luminometeret står i *Brugervejledning til Leader HC+ luminometer*. Anvisning i anvendelse af ProgenSA PCA3 Assay-softwaren står i *Lynvejledning* og *Systemadministratorvejledning og Brugervejledning til ProgenSA PCA3 Assay-software*.

1. Klargør Leader HC+ luminometeret ved at anbringe én tom TTU i kassetteposition nr. 1 og udføre vaskeprotokollen én gang.
2. Kontrollér, at der er tilstrækkelig mængde Auto Detect 1 og 2 til udførelse af reaktionerne.
3. Sæt TTU'erne i luminometeret med diagrammet i luminometeret som vejledning. Hvis begge analytter testes (ryg mod ryg-kørsel), isættes alle PCA3-TTU'er først, og dernæst omgående alle PSA-TTU'er.
4. Log på computeren. Klik på **NEW RUN (NY KØRSEL)**, og vælg den relevante analyseprotokol og koncentrationer. Klik på **NEXT (NÆSTE)** for at starte kørslen.

Bemærk: Kørslen skal være færdig i løbet af 2 timer efter slutningen af inkubationen i selektionstrinnet ved 62 °C.

5. Klargør deaktiveringsvæske ved at blande lige dele 5 %-7 % (0,7 M-1,0 M) natriumhypochloritopløsning og buffer til deaktiveringsvæske i en stor plastbeholder med låg. Sæt etiket på plastbeholderen, og skriv udløbsdatoen på den. Deaktiveringsvæsken er stabil i 4 uger ved stuetemperatur.
6. Når kørslen er færdig, genererer analysesoftwaren to kørselsrapporter, én kørselsrapport med rådata og én rapport med forholdsdata, hvis kørslerne er ryg mod ryg (se *Kvalitetskontrolprocedurer og Fortolkning af resultater*).
7. Når kørslen er færdig, tages de brugte TTU'er ud af luminometeret og sættes i beholderen med deaktiveringsvæske. Lad TTU'erne stå i beholderen i mindst 15

minutter, inden de kasseres. Korrekte håndterings- og bortskaffelsesmetoder bør etableres af laboratorielederen.

Bemærkninger til fremgangsmåden

A. Prøveklargøring

1. Hvis prøverne indeholder suspenderet bundfald, varmes de op ved 37 °C i op til 5 minutter og vendes derefter forsigtigt om. Hvis bundfaldet ikke bliver opløst, skal det sikres, at bundfaldet ikke forhindrer, at prøven overføres.
2. Frosne prøver skal optøs ved stuetemperatur (15 °C til 30 °C; der kan anvendes et vandbad) og lejlighedsvist vendes om under optøningen for at forhindre, at der dannes en uopløselig prop. Bland hætteglassene ved at vende dem forsigtigt om, når isen i glassene er optøet tilstrækkeligt til, at den har løsnet sig og kan bevæge sig frit. Fortsæt med at opvarme, indtil prøven er helt optøet, og bland igen glassene ved at vende dem forsigtigt om.
 - a. Hvis der dannes sig en prop, og prøverne skal pipetteres med TECAN Freedom EVO 100/4 instrumentet, fryses prøven igen, optøningsinstruktionerne gentages, og det sikres, at der ikke dannes sig nogen propper. Hvis proppen ikke kan fjernes, skal prøven pipetteres manuelt.
 - b. Hvis der dannes sig en prop, og prøverne skal pipetteres manuelt med en mikropipette, er det ikke nødvendigt at gøre andet end at sikre, at proppen ikke forhindrer, at prøven overføres.

B. Pipettering af kontrol, kalibrator og prøve

1. Mængden af kalibrator, kontrol eller prøve, der fyldes i TTU'en, skal være 400 µl. Det anbefales at foretage visuel inspektion af den mængde, der pipetteres i TTU'en, for at sikre overførsel af korrekt mængde. Korrekt mængde er nødvendig for at give korrekte resultater.
2. Kontrollér, at pipettespidsen sidder rigtigt på pipetten, og kontrollér, at mængdeindstillingen er korrekt. Det anbefales at kontrollere mængdeindstillingen visuelt i slutningen af hver TTU (for hver 10 reagensglas). Slip pipetestemplet langsomt med en jævn bevægelse, når der trækkes prøvemateriale, så der ikke dannes skum og bobler.

C. Reagenser

1. Proberekonstitutionsopløsning kan danne bundfald ved opbevaring. Varm opløsningen op til 62 °C ± 1 °C i 1-2 minutter. Efter sådan opvarmning kan proberekonstitutionsopløsningen anvendes, selv om der er rester af bundfald. Efter resuspension blandes hætteglasset ved at vende det forsigtigt om.
2. Når der pipetteres andre reagenser end enzymreagenser, skal pipetten vendes lidt mod siden af bunden af reaktionsrøret (der hvor bunden buer op og går sammen med siderne). Når der pipetteres enzymreagens, skal pipetten vendes direkte mod midten af reaktionsrøret. Bekræft visuelt, at reagenserne bliver dispenseret korrekt (så der ikke er for stor mængde reagens på siden af rørene, og farven skifter, som den skal).

D. Temperatur

1. Target capture-, amplifikations-, hybridiserings- og selektionstrinnene er temperaturafhængige. Derfor er det yderst vigtigt, at vandbadene holdes på deres specificerede temperaturområder.
2. Stuetemperatur vil sige 15 °C til 30 °C.

E. Tidsrum

Target capture-, amplifikations-, hybridiserings- og selektionstrinnene er tidsafhængige. De specifikke tider i *Fremgangsmåde ved testning* skal overholdes.

F. Blanding i vortexmixer

Korrekt blanding i vortexmixer er vigtig for at få et vellykket Progenssa PCA3 Assay. Til blanding i vortexmixer af reaktioner stilles multireagensglas-vortexmixeren på laveste hastighed; sæt stativet fast, og tænd for strømmen. Sæt langsomt hastigheden op, til væsken går halvvejs op i glasset. Lad vortexmixeren gå i 10 sekunder, det angivne tidsrum, eller til farven er ensartet. Dernæst stilles multireagensglas-vortexmixeren på laveste hastighed, inden den slukkes, og stativet tages ud. Reaktionsblandingerne bør aldrig røre ved afdækningspapiret.

G. Vandbade

1. Vandniveauet i vandbadene skal holdes i en dybde på 3,8-5,0 cm (1,5-2,0 tommer) målt fra den støttende metalbakke (i bunden af vandbadet) til vandoverfladen. Derved sikres der korrekt varmeoverførsel.
2. Vandbade må kun anvendes til et bestemt analysetrin for at undgå krydskontaminering.

H. Dekontaminering

1. Overflader og pipetter

Laboratoriebordflader og pipetter skal jævnlige dekontamineres med 2,5 %-3,5 % (0,35 M-0,5 M) natriumhypochloritopløsning. Lad natriumhypochloritopløsningen blive på kontaktoverfladerne i mindst 1 minut, og skyl dernæst efter med vand.

Natriumhypochloritopløsningen må ikke tørre. Klorinopløsninger kan lave huller i udstyr og metal. Skyl udstyret grundigt med vand for at undgå huller.

2. TCS-aspirationsmanifold

Efter hver anvendelse:

- a. Flyt dispenseringsmanifolden af vejen.
- b. Sæt en ny TTC i TTC-stativet. Tænd for vakuumpumpen. Sæt aspirationsmanifolden på spidserne i TTC'en. Aspirér al vaskeopløsning, der er tilbage i dispenseringsstationens primingkar.
- c. Hæld mindst 100 ml af 0,5 % til 0,7 % (0,07 M til 0,1 M), eller hvis det foretrækkes 2,5 % til 3,5 % (0,35 M til 0,5 M), natriumhypochloritopløsning ned i primingkarret. Aspirér al opløsningen gennem aspirationsmanifolden.
- d. Hæld mindst 100 ml deioniseret vand ned i primingkarret. Aspirér al vandet gennem aspirationsmanifolden.
- e. Kast spidserne ud i den originale TTC.
- f. Lad vakuumpumpen være slået til, indtil manifoldslangen er tør for at forhindre tilbageløb (ca. 3 minutter).

g. Dekontaminér overfladerne på aspirationsmanifolden som beskrevet i *TCS-apparatur*.

3. TCS-affaldsbeholder

Rengør affaldsflasken mindst én gang om ugen, eller når den er kvart fuld, alt efter hvad der sker først.

- Sluk vakuumpumpen og lad vakuumtrykket udligne sig.
- Løsn lynkoblingerne mellem affaldsflasken og overløbsflasken og mellem affaldsflasken og aspirationsmanifolden.
- Fjern affaldsflasken fra vakuumpfangningens indkapsling.
- Tag hættten af og tilsæt forsigtigt 400 ml af 5 % til 7 % (0,7 M til 1,0 M) natriumhypochloritopløsning til den 4 liters affaldsflaske.

Bemærk: Dette kan gøres i en røghætte for at undgå, at der slipper damp ud i laboratoriet.

- Sæt låg på affaldsflasken og rotér forsigtigt indholdet, indtil det er helt blandet.
- Lad affaldsflasken stå i mindst 15 minutter og bortskaf derefter indholdet (affald).
- Skyl affaldsflasken med vand for at fjerne alt affald, der sidder tilbage indeni.
- Sæt låg på den tomme affaldsflaske og anbring den i vakuumpfangningens indkapsling. Sæt lynkoblingerne på TCS-apparatet. Bortskaf forsigtigt begge handsker.

4. TCS-apparatur

Overfladerne på TCS-apparatet, aspirationsmanifolden og vaskebuffer-udløerspidserne tørres af med papirservietter fugtet med 2,5 %-3,5 % (0,35 M-0,5 M) natriumhypochloritopløsning. Efter trinnet med natriumhypochloritopløsning skylles fladerne med vand, og tørres helt tørre med papirservietter.

5. Stativer

Nedsænk stativerne i 2,5 %-3,5 % (0,35 M-0,5 M) natriumhypochloritopløsning; kontrollér, at de er helt dækket af opløsningen. Stativerne skal være nedsænket i opløsningen i 10 minutter. Længere tid i opløsningen kan skade stativerne. Skyl stativerne grundigt med vand, og tør dem dernæst helt tørre med papirservietter.

I. Analysekontaminering

- Der kan indføres kontaminerende materialer, hvis der ikke udvises tilstrækkelig omhu under analyseproceduren.
- TTU'er skal dekontamineres i deaktiveringsvæske som anvist i *Fremgangsmåde ved testning*. TTU'er må ikke genanvendes.
- Udstyr og arbejdsflader skal regelmæssigt dekontamineres som anvist ovenfor i *Dekontaminering*.
- Som i alle reagenssystemer kan for meget pudder på visse handsker forårsage kontaminering af åbnede reagensglas. Det anbefales, at operatørerne bruger handsker uden pudder.

Kvalitetskontrolprocedurer

A. Kørselsgyldighed

1. Kalibratorer og kontroller skal køres sammen med alle analyser og i samme stativ som testprøverne. Følgende kriterier skal opfyldes, for at en kørsel kan betragtes som gyldig:

Gennemsnitlig RLU for kalibrator 2 > RLU-cutoff

Hvor RLU-cutoff = Gennemsnitlig RLU for kalibrator 1
+ 1,645 standardafvigelser for kalibrator 1 RLU replikater
+ 1,645 standardafvigelser for kalibrator 2 RLU replikater.

Gennemsnitlig interpoleret kalibrator 5 genfinding = 100 ± 30 %

Gennemsnitlig interpoleret kontrol A genfinding = 100 ± 60 %

Gennemsnitlig interpoleret kontrol B genfinding = 100 ± 35 %

2. PCA3 Assay-softwaren evaluerer automatisk resultaterne efter ovenstående kriterier og rapporterer kørselsstatus som PASS (BESTÅET), hvis gyldighedskriterierne er opfyldt, og som FAIL (IKKE BESTÅET), hvis gyldighedskriterierne ikke er opfyldt.
3. Hvis kørselsstatus er FAIL (IKKE BESTÅET), er alle testresultater i den pågældende kørsel ugyldige og må ikke rapporteres.
4. Hvis en kørsel er ugyldig, skal kørslen gentages for den pågældende analyt (se *Fortolkning af resultater*). Hvis kørslen er gyldig for den anden analyt, kan de data anvendes til dataanalyse sammen med den nye, gyldige kørsel af den første analyt.

B. Prøvens gyldighed

I en gyldig kørsel kan individuelle prøver blive bedømt UGYLDIGE og opføres i rapporten med rådata (se *Fortolkning af resultater*). Skønt individuelle replikater for en prøve kan være gyldige, bliver en prøve ugyldiggjort, hvis den interpolerede c/ml-forskel mellem replikaterne er over 600 %. Testning af prøven for den analyt skal gentages.

Fortolkning af resultater

A. Rapporttyper

1. Rapport med rådata

Rapporten med rådata giver oplysninger om kørselsgyldighed (PASS [BESTÅET] eller FAIL [IKKE BESTÅET]; se *Kvalitetskontrolprocedurer*) og om de individuelle reaktionsrør, der testes med Progensa PCA3 Assay. Hvis en kørsel er ugyldig (FAIL [IKKE BESTÅET]), mærkes alle reagensglassene i den kørsel ugyldige. Men individuelle reagensglas kan blive bedømt ugyldige i en gyldig kørsel (PASS [BESTÅET]). Ved ryg mod ryg-kørsler (dvs. både PCA3- og PSA-analytter testes i samme analysekørsel), kan den ene analytkørsel være ugyldig, mens den anden analytkørsel er gyldig.

Oversigten over undtagelser findes i slutningen af rapporten med rådata. Når det drejer sig om ryg mod ryg-kørsler, hvor begge analytkørsler er gyldige, kan det være nødvendigt at gentage testen af en af analytterne for prøver, der står opført i oversigten over undtagelser. Selv om en PCA3 Score kan stå opført i oversigten over undtagelser, betragtes dette resultat ikke som rapporterbart, før der er udført en manuel match, og resultatet står opført i rapporten med forholdsdata. Hvis kun én analyt blev testet, eller hvis en analytkørsel er ugyldig, står alle testede prøver opført i oversigten over undtagelser.

2. Rapport med forholdsdata

Software genererer automatisk en rapport med forholdsdata i forbindelse med ryg mod ryg-kørsler, når begge analytkørsler er gyldige. Softwaren beregner og laver en liste over PCA3 Score for prøver i rapporten med forholdsdata. Prøver, der står opført i rapporten med forholdsdata, skal enten ikke testes mere, eller også skal begge analytter testes igen. Prøver, der ikke står opført i rapporten med forholdsdata, kan findes i oversigten over undtagelser i rapporten med rådata.

Der kan også genereres en rapport med forholdsdata efter manuel matchning (der er nærmere oplysninger i afsnittet *Manuel matchning*).

3. Kvalitetsrapport

I kvalitetsrapporten står opført kriterier for analysekørlens gyldighed, tildelte og interpolerede koncentrationer og genfindning af kalibratorer og kontroller. I rapporten står ligeledes opført de parametre, der definerer den logistiske dosisresponskalibreringskurve med fire parametre (3). Der er nærmere oplysninger i *Brugervejledning til Progensa PCA3 Assay-software*.

B. Matchning

1. Automatisk matchning

I ryg mod ryg-kørsler, hvor begge analytter er gyldige, matcher softwaren automatisk de individuelle PCA3- og PSA-analytresultater for prøver og fastsætter PCA3 Score (hvis den kan beregnes). Resultaterne står opført i rapporten med forholdsdata og oversigten over undtagelser i rapporten med rådata.

2. Manuel matchning

Når PCA3- og PSA-analytter testes i forskellige kørsler, kan softwaren ikke automatisk fastsætte PCA3 Score. Manuel matchning af analytresultaterne er nødvendig for at fastsætte PCA3 Score eller PCA3 Score-området (der henvises til *Lynvejledningen* eller *Brugervejledningen til Progensa PCA3 Assay-software*). Manuel matchning kan også være påkrævet for resultater, der står opført i oversigten over undtagelser i

kørselsrapporten med rådata. Efter manuel matchning bliver PCA3 Score(s) for den eller de matchede prøver opført i rapporten med forholdsdata.

C. Fortolkning af rapporter

1. PCA3 Score

Bemærk: Kun PCA3 Scores og PCA3 Score-områder, der står opført i rapporten med forholdsdata, kan rapporteres. Resultater, der står i oversigten over undtagelser, kræver muligvis yderligere undersøgelse og er ikke rapporterbare.

PCA3 Score beregnes for forholdet mellem PCA3 RNA-kopier og PSA RNA-kopier multipliceret med 1.000. PCA3 Scores kan kun beregnes ud fra resultater fra gyldige kørsler og prøver. Ugyldige kørsler og ugyldige prøver skal testes igen for den pågældende analyt (der er nærmere oplysninger i afsnittet *Gentagelse af testning*).

Hvis den rapporterede PCA3 Score er under cutoff, skal resultater fortolkes som værende NEGATIVT. Hvis PCA3 Score er over eller lig med cutoff, skal resultatet fortolkes som værende POSITIVT. Laboratorielederen skal fastsætte cutoff-værdien (der er nærmere oplysninger i afsnittet *Funktionskarakteristika*).

Under visse betingelser gives der et PCA3 Score-område ($>$ [Beregnet PCA3 Score] eller $<$ [Beregnet Score]). Hvis $<$ [Beregnet PCA3 Score] er under cutoff-værdien, skal resultatet fortolkes som værende NEGATIVT. Hvis $>$ [Beregnet PCA3 score] er over cutoff-værdien, skal resultatet fortolkes som værende POSITIVT. Hvis en talværdi er påkrævet, kan prøvefortynding og gentaget testning muligvis generere en PCA3 Score i stedet for et PCA3 Score-område (se *Gentagelse af testning - Fortynding af prøver over området*).

2. Fortolkning af status- og analysekoder

Kolonnen Status på en rapport med rådata og en rapport med forholdsdata viser oplysningerne i formatet "s:a". Kørselsspecifikke statuskoder ("s") står opført før (til venstre for) kolonet, og analytspecifikke analysekoder ("a") står opført efter (til højre for) kolonet. Analytspecifikke koder står med små bogstaver for PCA3-resultater og med store bogstaver for PSA-resultater. Hver enkelt rapport har beskrivelser af status- og analysekoderne, der findes i rapporten. Koderne kan f.eks. angive, om et prøve- eller replikatresultat er gyldigt eller uden for område. Der er en komplet liste over status- og analysekoder samt flere detaljer i *Lynvejledning* eller *Brugervejledning til ProgenSA PCA3 Assay-software*.

Hvis en PCA3 Score rapporteres i rapporten med forholdsdata, og der ingen status- eller analysekoder står i statuskolonnerne for PCA3 eller PSA, indikerer det, at resultatet af testen for begge analytter er gyldigt og "inden for område".

Prøveresultaterne er rapporterbare, og ingen yderligere tiltag er nødvendige.

Hvis der er en status- eller analysekode i oversigten over undtagelser eller i rapporten med forholdsdata, kan det være nødvendigt at gentage testen (se *Fortolkning af resultaterne i oversigten over undtagelser* og *Fortolkning af resultater i rapporten med forholdsdata*). Hvis analytresultaterne stammer fra separate kørsler og har en eller flere analysekoder, skal kombinationen for begge analytter findes i Tabel 4 eller Tabel 5 for at bestemme, om yderligere tiltag er nødvendige.

Bemærk: Tilstedeværelse af en status- eller analysekode betyder ikke automatisk, at testen skal gentages.

3. Fortolkning af resultaterne i oversigten over undtagelser

Der står muligvis ingen prøver opført i oversigten over undtagelser. I så fald skal der ikke foretages yderligere.

Hvis der i oversigten over undtagelser står en eller flere prøver fra ryg mod ryg-kørsler, hvor begge analytkørsler er gyldige, henvises der til anvisningerne i Tabel 4.

Når det drejer sig om individuelle analytkørsler, henvises der til *Fortolkning af status- og analysekoder*. I ryg mod ryg-kørsler, hvor én analytkørsel er ugyldig, skal den ugyldige kørsel gentages (der er nærmere oplysninger i afsnittet *Gentagelse af testning*), og resultaterne behandles, som om der er blevet foretaget individuelle analytkørsler. Der skal udføres manuel matchning.

En prøve kan blive mærket ugyldig, skønt individuelle reagensglas (replikater) er mærket gyldige. Det er det kombinerede resultat af replikaterne, der bestemmer prøvens gyldighed, og en stor forskel mellem replikater ugyldiggør en prøve (der er nærmere oplysninger under *Kvalitetskontrolprocedurer*).

Tabel 4: Betingelser for oversigt over undtagelser ved Progensa PCA3 Assay

PCA3-resultat (Analysekode*)	PSA-resultat (Analysekode*)	Anført PCA3 Score	Yderligere testning?	Handling/kommentar
Inden for område (ingen kode)	Ugyldig** (A, B, E, H eller I)	--	Ja	Test PSA igen (se <i>Gentagelse af testning</i>) og match resultaterne manuelt.
Under området (g)	Ugyldig (A, B, E, H eller I)	--	Ja	Test PSA igen (se <i>Gentagelse af testning</i>) og match resultaterne manuelt.
Ugyldig (a, b, e, h, eller i)	Inden for område (ingen kode)	--	Ja	Test PCA3 igen (se <i>Gentagelse af testning</i>) og match resultaterne manuelt.
Inden for område (ingen kode)	Over området (F)	<[Beregnet PCA3 Score]***	Valgfrit	1. Match resultaterne manuelt for at få <[Beregnet PCA3 Score] ELLER 2. Fortynd prøven med prøvefortynder (se <i>Fortynding af prøver over området</i>), test PSA igen, og match resultaterne manuelt, hvis en PCA3 Score er påkrævet.
Over området (f)	Inden for område (ingen kode)	>[Beregnet PCA3 Score]	Valgfrit	1. Match resultaterne manuelt for at få >[Beregnet PCA3 Score] ELLER 2. Fortynd prøven med prøvefortynder, test PCA3 igen, og match resultaterne manuelt, hvis en PCA3 Score er påkrævet.
Under området (g)	Inden for område (ingen kode)	<[Beregnet PCA3 Score]	Nej	Match resultaterne manuelt for at få <[Beregnet PCA3 Score].
Under området (g)	Over området (F)	<[Beregnet PCA3 Score]	Nej	Match resultaterne manuelt for at få <[Beregnet PCA3 Score].

*Der er en komplet liste over analysekoder i *Brugervejledningen til Progensa PCA3 Assay-software*.

**Gælder kun ugyldige prøver fra en gyldig kørsel.

***Med hensyn til værdier uden for området, beregnes den beregnede PCA3 Score ud fra kopiniveauet for den nærmeste positive kalibrator.

4. Fortolkning af resultater i rapporten med forholdsdata

Hvis en prøve står opført i rapporten med forholdsdata med en PCA3 Score, er resultatet en rapporterbart PCA3 Score, og der skal ikke foretages yderligere. Hvis der ikke står opført nogen PCA3 Score, dvs. der står "--" i kolonnen med PCA3 Score, henvises der til anvisningerne i Tabel 5.

Tabel 5: Betingelser for rapport med forholdsdata for ProgenSA PCA3 Assay

PCA3-resultat (Analysekode*)	PSA-resultat (Analysekode*)	Anført PCA3 Score	Yderligere testning?	Handling/kommentar
Inden for område (ingen kode)	Inden for område (ingen kode)	PCA3 Score	Nej	Ingen yderligere tiltag; Resultatet er rapporterbart.
Ugyldig** (a, b, e, h, eller i)	Ugyldig (A, B, E, H eller I)	--	Ja	Test begge analytter igen (se <i>Gentagelse af testning</i>).
Ugyldig (a, b, e, h, eller i)	Over området (F)	--	Ja	Fortynd prøven med prøvefortynder (se <i>Fortynding af prøver over området</i>), test begge analytter igen.
Over området (f)	Ugyldig (A, B, E, H eller I)	--	Ja	Fortynd prøven med prøvefortynder; test begge analytter igen.
Over området (f)	Over området (F)	--	Ja	Fortynd prøven med prøvefortynder; test begge analytter igen.
Ugyldig (a, b, e, h, eller i)	Under området (G)	--	Nej	Prøven har utilstrækkeligt RNA til nøjagtig analyse. Der skal tages en ny prøve fra patienten.
Inden for område (ingen kode)	Under området (G)	--	Nej	Prøven har utilstrækkeligt RNA til nøjagtig analyse. Der skal tages en ny prøve fra patienten.
Over området (f)	Under området (G)	--	Nej	Prøven har utilstrækkeligt RNA til nøjagtig analyse. Der skal tages en ny prøve fra patienten.
Under området (g)	Under området (G)	--	Nej	Prøven har utilstrækkeligt RNA til nøjagtig analyse. Der skal tages en ny prøve fra patienten.

*Der er en komplet liste over analysekoder i *Brugervejledningen til ProgenSA PCA3 Assay-software*.

**Gælder kun ugyldige prøver fra en gyldig kørsel. Hvis prøverne var ugyldige, fordi kørslen var ugyldig, står resultaterne opført i oversigten over undtagelser (der er nærmere oplysninger i *Fortolkning af resultaterne i oversigten over undtagelser*).

D. Gentagelse af testning

1. Retningslinjer for gentagelse af testning

- a. Selv om det ikke er absolut nødvendigt, at begge analytter testes i samme kørsel, **skal begge analytresultater komme fra samme prøvehætteglas for at få en rapporterbar PCA3 Score.**
- b. Alle ugyldige kørsler skal gentages, og alle ugyldige prøver fra gyldige kørsler skal testes igen.
- c. Den gentagne testning af prøven eller prøverne skal foretages med et nyt sæt kalibratorer og kontroller.
- d. Korrekt opbevaring af resterende prøvemateriale forud for gentagelse af testningen er meget vigtig (der er nærmere oplysninger i *Indsamling, transport og opbevaring af prøver*).
- e. Det kan være nødvendigt med en manuel matchning af PCA3- og PSA-analytterne for at bestemme PCA3 Score (der er nærmere oplysninger i *Manuel matchning*).

2. Fortynding af prøver over området

- a. Hvis en prøvekoncentration ekstrapoleres over kalibrator 5 i en gyldig kørsel, bliver resultatet "over området", og resultatet bliver mærket med analysekode "F" eller "F" i kørselsrapporten eller -rapporterne. Koncentrationen angives som >[kalibrator 5 koncentration].
- b. Den behandlede urinprøve skal vendes om, så den blandes inden den fortyndes. Det anbefales, men det er ikke påkrævet, at lave en fortynding i forholdet 1:10 vha. Progensa PCA3 Specimen Diluent Kit. I et egnet hætteglas tilsættes 1.800 µl prøvefortynder og 200 µl prøve; sæt hættens på, og vend glasset fem gange, så indholdet blandes grundigt. Fortyndingsfaktoren vil være "10" på arbejdslisten til kørslen. Hvis begge analytter skal testes igen, skal mængden fordobles (brug 3.600 µl prøvefortynder og 400 µl prøve). Der henvises til indlægssedlen til Progensa PCA3 Specimen Diluent Kit. Test den fortyndede prøve med analysen.
- c. Hvis prøven ved gentagen testning igen er over området, er yderligere fortynding påkrævet, indtil prøveresultaterne interpoleres inden for kalibratorområdet. Det er tilladeligt at fortynde den oprindelige 1:10 fortynding, hvis den har været opbevaret korrekt (der er nærmere oplysninger i *Indsamling, transport og opbevaring af prøver*).

Begrænsninger

- A. Progensa PCA3 Assay bør ikke anvendes til patienter, som tager medicin, der vides at indvirke på serum-PSA-niveauer, såsom finasterid (Proscar, Propecia), dutasterid (Avodart) og anti-androgenbehandling (Lupron). Disse lægemidlers virkning på PCA3-genekspressionen er endnu ikke blevet vurderet.
- B. Visse terapeutiske og diagnostiske procedurer, såsom prostatektomi, bestråling, prostatabiopsi m.m., kan indvirke på prostatavævs levedygtighed og efterfølgende indvirke på PCA3 Score. Indvirkningen af disse procedurer på analysepræstationen er endnu ikke blevet vurderet. Prøver til PCA3-testning bør opsamles, når klinikerer mener, at prostatavæv er i orden igen.
- C. Kun personale, som er oplært i fremgangsmåden til Progensa PCA3 Assay, må udføre analysen. Hvis anvisningerne i denne indlægsseddel ikke følges, kan det føre til fejlagtige resultater.
- D. Hvert enkelt laboratorium skal uafhængigt godkende en LIS-overførselsproces.
- E. Pålidelige resultater afhænger af korrekt opsamling af urinprøver. Da transportsystemet, der anvendes til Progensa PCA3 Assay, ikke tillader mikroskopisk vurdering af urinprøvens egnethed, er det nødvendigt at oplære klinikerne i de korrekte teknikker til opsamling af urinprøver. Se *Indsamling, transport og opbevaring af prøver*. Der henvises til detaljeret anvisning i indlægssedlen til Progensa PCA3 Urine Specimen Transport Kit.
- F. Resultater fra Progensa PCA3 Assay skal fortolkes sammen med andre laboratorie- og kliniske data, som klinikerer har til rådighed. (Testresultater kan være påvirket af forkert opsamling af prøver, tekniske fejl og sammenblanding af prøver.)

Funktionskarakteristika

A. Kliniske resultater

1. Diagnostisk sensitivitet og specificitet

Præstationskarakteristika for Progensa PCA3 Assay blev fastsat vha. prøver fra forsøgspersoner, der var tilmeldt fire forskellige kliniske centre i Nordamerika. Forsøgspopulationen bestod af 529 mænd, der skulle have foretaget prostatabiopsi. Demografien for forsøgspersonerne vises nedenfor:

- Gennemsnitsalder \pm SD = 64 ± 8 år (median 63, området 32-89)
- Gennemsnitligt serum-PSA-niveau = $7,9 \pm 21,9$ $\mu\text{g/l}$ (5,6, 0,3-484)
- Gennemsnitlig prostatavolumen (bestemt ved trans-rektal ultralyd) = 44 ± 25 cc (39, 5-225)
- 34 % (180/529) biopsi-positiv for prostatacancer

Figur 3 viser korrelationen mellem PCA3 Score og sandsynligheden for positiv biopsi. Forekomsten af cancer-positiv biopsi hos forsøgspersonerne forøgedes i takt med forøgelsen af PCA3 Score.

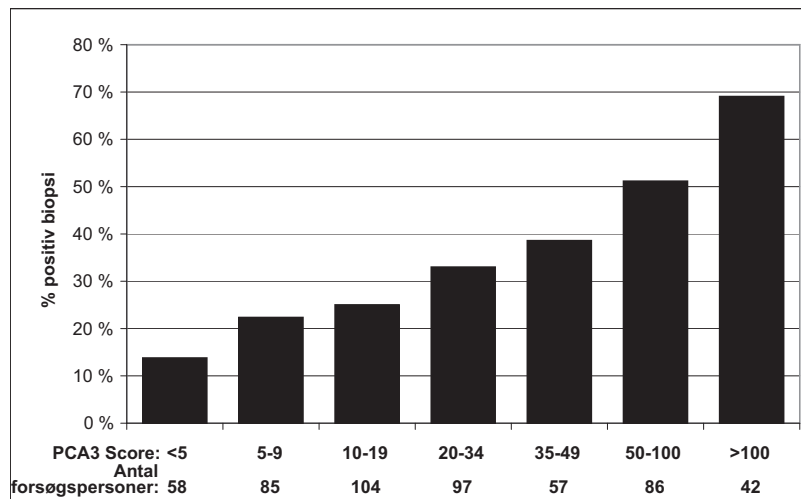


Fig. 3. Korrelation mellem PCA3 Score og sandsynligheden for positiv biopsi

ROC-analyse (Receiver operating characteristic) blev udført vha. prostatabiopsi som referencemetode iht. CLSI GP10-A (1995) (4). For Progensa PCA3 Assay var området under kurven (AUC) 0,685 (95 % konfidensinterval = 0,637-0,733). Tabel 6 viser diagnostisk sensitivitet og specificitet ved forskellige PCA3 Score-cutoffværdier. Hvert enkelt laboratorium bør fastsætte cutoff-værdien for diagnostisk sensitivitet eller specificitet (se *Fortolkning af resultater*).

Tabel 6: Progensa PCA3 Assay's diagnostiske sensitivitet og specificitet ved forskellige PCA3 Score-cutoffværdier

PCA3 Score-cutoff	5	10	15	25	35	50	95
Sensitivitet	96 %	85 %	77 %	63 %	53 %	41 %	17 %
Specificitet	14 %	33 %	47 %	61 %	74 %	84 %	95 %

2. Undersøgelser af prøvestabilitet

- a. Stabilitet i ubehandlet urin: Den første urin blev opsamlet fra 10 forsøgspersoner og opbevaret ved 2 °C-8 °C eller ved 30 °C inden den blev behandlet, dvs. den blev tilsat til urintransportmedium (UTM). Efter 4 timer ved 2 °C-8 °C blev væsentlig PCA3- og PSA RNA-nedbrydning konstateret i nogle af prøverne. Ubehandlet urin skal således behandles i løbet af 4 timer. Ved 30 °C blev væsentlig nedbrydning konstateret, inden der var gået 1 time. Derfor skal ubehandlet urin altid sættes i køleskab eller lægges på is inden behandling.
- b. Stabilitet i behandlet urin: Tolv prøver blev inkuberet ved 4 °C eller 30 °C i op til 38 dage. Ved 4 °C var PCA3 og PSA RNA stabil i 21 dage; ved 30 °C, 5 dage. Det er blevet påvist, at i prøver, der opbevares ved -20 °C og -70 °C, er PCA3 og PSA RNA stabil i op til 90 dage.
- c. Stabilitet ved frysning og optøning: Prøver blev skiftevis anbragt ved 37 °C og -70 °C 6 gange. Der blev ikke konstateret en reduktion i PCA3- eller PSA RNA-kopiniveauer.

B. Analytiske resultater

1. Analytisk sensitivitet

Der blev anvendt et analytisk sensitivitetspanel bestående af fortyndet *in vitro* RNA-transkript til vurdering af analysesensitivitet. En operatør testede panelet i tolv kørsler med fem replikater vha. ét reagenslot. Detektionsgrænsen og kvantificeringsgrænsen blev beregnet iht. CLSI EP17-A (2004) (5). Detektionsgrænsen for PCA3-analytten var 80 c/ml, og for PSA-analytten

1.438 c/ml. Kvantificeringsgrænsen for begge analytter var kalibrator 2.

2. Analytisk specificitet

- a. Usplejset transkript: Progensa PCA3 Assay er beregnet til kun at detektere prostatacancer-specifik exon 3-exon 4 splejset PCA3 RNA (2). Analysen detekterede ikke 1 million c/ml af usplejset PCA3 RNA, der var væsentligt over baggrunden.
- b. Prostataspecificitet for PCA3 RNA i urin: Prøver fra post-radikale prostatektomi-forsøgspersoner (n = 97) blev testet med Progensa PCA3 Assay, og PCA3 RNA-niveauer blev sammenlignet med niveauer fra forsøgspersoner før biopsi (n = 464). Median PCA3 RNA c/ml var under analysens detektionsgrænse for prøver fra forsøgspersoner efter prostatektomi, mens median PCA3 RNA c/ml for prøver fra forsøgspersoner før biopsi var 7.243 c/ml; disse data bekræfter, at PCA3 RNA i urin er fra prostata.
- c. Vævsspecificitet: Total RNA blev udtrukket fra væv fra to unikke mandlige donorer pr. vævstype, tilsat til prøvefortynding (10 ng pr. reaktion) og testet med Progensa PCA3 Assay. Prostatavæv var den eneste type, der blev detekteret over detektionsgrænsen for PCA3 RNA blandt de vævstyper, der står opført i Tabel 7.

Tabel 7: Mandlige vævstyper testet for PCA3 RNA

Vævstype	
Blære (normal)	Nyre
Blære (tumor)	Penis
Knoglemarv	Prostata
Ductus deferens	Sædblære
Epididymus	Testikler

- d. Interfererende stoffer: Stofferne, der står opført i Tabel 8, blev tilsat til alikvoter af poolede behandlede urinprøver fra mænd. Prøverne blev testet med Progensa PCA3 Assay iht. CLSI EP7-A2 (2005) (6). Ved de anførte koncentrationer blev der ikke observeret nogen interferens med analysen.

Tabel 8: Stoffer testet for interferens med Progensa PCA3 Assay

Terapeutiske stoffer		Terapeutiske stoffer, fortsat	
Stof	Testkoncentration	Stof	Testkoncentration
Acetaminophen/codein	5,34 µmol/l	Uroxatral	30 mg/l
Atorvastatin	25 mg/l	Doxazosin	1,33 µmol/l
Lisinopril	0,74 µmol/l	Terazosin	7,8 µmol/l
Amlodipin	245 µmol/l	Finasterid	15 mg/l
Atenolol	37,6 µmol/l	Tamsulosin	1,2 µg/l
Sulfasalazin	754 µmol/l	Metformin	310 µmol/l
Esomeprazol	120 mg/l	Sildenafil	12,9 pmol/l
Allopurinol	294 µmol/l	Savpalme	1.600 mg/l
Diphenhydramin	19,6 µmol/l	Selen	0,275 mg/l
Acetaminophen	1.324 µmol/l		
Acetylsalicylsyre	3,62 mmol/l	Urinbestanddele	
Ibuprofen	2.425 µmol/l	Stof	Testkoncentration
Furosemid	181 µmol/l	Urinsyre	1,4 mmol/l
Ciprofloxacin	30,2 µmol/l	Hæmoglobin	2 g/l
Levaquin	48,6 µmol/l	Leukocytter	4,56 x 10 ⁷ celler/l
Doxycyclin	67,5 µmol/l	Erytrocytter	3,06 x 10 ⁷ celler/l
Fluoxetinhydrochlorid	11,2 µmol/l	Albumin	50 g/l
Flutamid	1.500 mg/l	Bilirubin (ukonjugeret)	342 g/l
Dutasterid	1,5 mg/l	IgG	60 g/l

3. Nøjagtighed

Nøjagtigheden af Progensa PCA3 Assay blev vurderet iht. CLSI EP15-A2 (2005) (7). PCA3- og PSA RNA-transkripter blev kvantificeret ved UV-vis spektrofotometri, tilsat behandlet normal urin fra kvinder (uden detekterbart PCA3 eller PSA RNA), og koncentrationerne blev så målt i en Progensa PCA3 Assay. Procent (%) genfindning blev beregnet som forholdet mellem målt c/ml og tilsat c/ml multipliceret med 100.

Tabel 9: Progensa PCA3 Assay's kopigenfinding

Analyt	Kendt koncentration, c/ml	Målt koncentration, c/ml	% genfinding
PCA3	750	808	108 %
	7.500	7.618	102 %
	18.750	18.722	100 %
	75.000	70.287	94 %
PSA	20.000	23.684	118 %
	250.000	278.373	111 %
	500.000	599.941	120 %
	1.750.000	1.960.775	112 %

4. Linearitet og område

Det lineære område for Progensa PCA3 Assay blev bestemt iht. CLSI EP6-A (2003) (8) baseret på lineær regressionsanalyse (mindste kvadraters metode). To sæt fortyndingsserier blev klargjort af prøver med høje koncentrationer af PCA3 og PSA RNA. Et sæt blev fortyndet med behandlet urin fra kvinder, og et sæt blev fortyndet med prøvefortynder. Fortyndingerne spændte over hele analyseområdet fra de laveste til de højeste positive kalibratorer for hver analyt. For både PCA3- og PSA-analytterne viste analysemålte resultater et direkte proportionalt forhold mellem de testede fortyndinger og den rapporterede analyt c/ml. Der var ingen væsentlig fortyndermatrixeffekt. Se Figur 4.

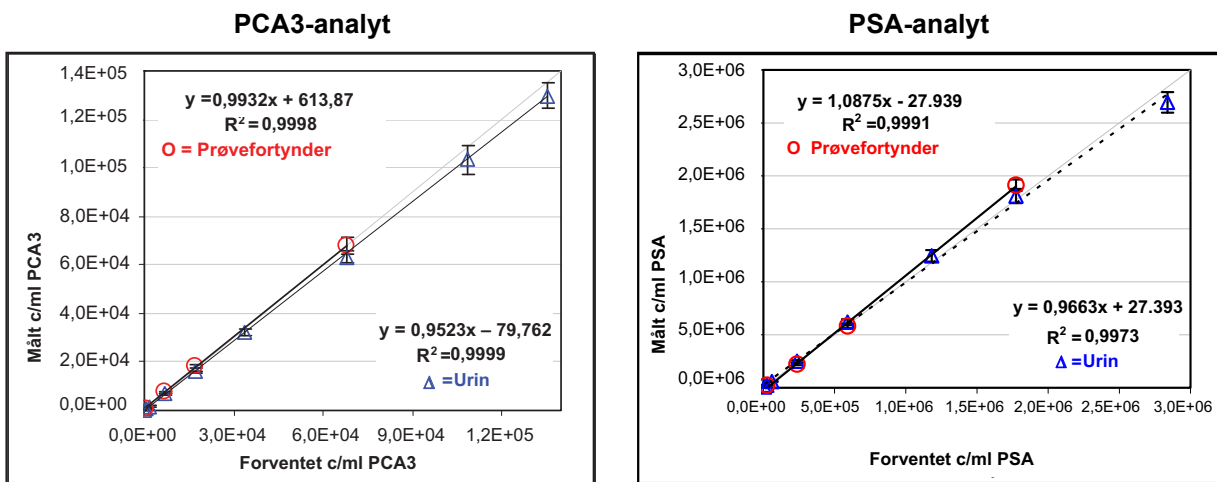


Fig. 4. Progensa PCA3 Assay's linearitet for PCA3- og PSA-analytter

5. Præcision

Præcisionen af Progensa PCA3 Assay blev vurderet iht. CLSI EP5-A2 (2004) (9). Gentagelighed er præcision på betingelse af minimum variabilitet, og reproducerbarhed er præcision på betingelse af maksimum variabilitet.

For gentagelighed blev der klargjort et testpanel med 3 medlemmer, der bestod af fortyndet *in vitro* RNA-transkript. En operatør på et forsøgscenter testede panelet i 20 kørsler med 5 replikater i løbet af 20 dage vha. et enkelt kalibrator- og kontrollot, reagenslot og udstyrssæt. Tabel 10 viser gentagelighedspræcisionen for Progensa PCA3 Assay ved diverse testkoncentrationsniveauer.

Tabel 10: Gentagelighed af Progensa PCA3 Assay

Analyt	Panel Element	Gennemsnitlig c/ml	Gentagelighed SD	Gentagelighed CV
PCA3	1	1.228	145	12 %
	2	12.020	809	7 %
	3	61.108	2.489	4 %
PSA	1	48.091	3.715	8 %
	2	484.457	41.026	8 %
	3	2.001.430	131.554	7 %

For reproducerbarhed blev der klargjort et testpanel med 8 medlemmer, der bestod af poolede prøver (1-3) og fortyndet *in vitro* RNA-transkript (4-8). Tre operatører testede panelet i 18 kørsler i løbet af 3 dage vha. et enkelt kalibrator- og kontrollot, 3 reagenslot og 3 udstyrssæt. Tabellerne 11 og 12 giver en oversigt over total præcision og præcision inden for en kørsel, mellem kørsler, for bruger, udstyr og lot ved Progensa PCA3 Assay for analyt c/ml og for PCA3 Score.

Variabilitet inden for en kørsel, mellem operatører og mellem kørsler var i faldende rækkefølge den største bidrager til generel analysevarians. Reagenslot og udstyr bidrog kun lidt til den generelle analysevarians. Disse resultater viser, at Progensa PCA3 Assay kan reproducere, og at den primære variationskilde er tilfældige fejl (inden for en kørsel).

Tabel 11: Reproducerbarhed af Progensa PCA3 Assay: Analyse af kopier/ml

Analyt	Panel Element	n	Målt c/ml	Total CV	CV inden for en kørsel	CV mellem kørsler	CV, mellem operatører	CV, mellem udstyr	CV, mellem lot
PCA3	1	36	248	27 %	24 %	7 %	15 %	11 %	0 %
	2	36	7.021	11 %	6 %	9 %	9 %	0 %	0 %
	3	36	31.469	8 %	6 %	5 %	9 %	0 %	4 %
	4	36	1.469	15 %	13 %	7 %	6 %	0 %	1 %
	5	36	14.844	7 %	5 %	2 %	6 %	0 %	4 %
	6	36	72.372	7 %	4 %	6 %	0 %	1 %	0 %
	7	36	430	26 %	26 %	0 %	11 %	0 %	1 %
	8	36	62.274	13 %	8 %	8 %	3 %	0 %	5 %
PSA	1	34	52.739	9 %	6 %	6 %	7 %	4 %	2 %
	2	34	218.789	10 %	6 %	7 %	7 %	4 %	0 %
	3	32	1.073.920	11 %	4 %	6 %	9 %	8 %	0 %
	4	34	37.185	9 %	5 %	7 %	3 %	0 %	1 %
	5	32	386.504	10 %	4 %	8 %	6 %	3 %	4 %
	6	34	1.518.748	12 %	5 %	8 %	4 %	3 %	7 %
	7	32	11.007	14 %	8 %	9 %	0 %	6 %	0 %
	8	34	1.694.404	11 %	7 %	7 %	0 %	1 %	6 %

Tabel 12: Reproducerbarhed af Progensa PCA3 Assay: Analyse af PCA3 Score

Panel Medlem*	n	Middelscore	Total CV	CV inden for en kørsel	CV mellem kørsler	CV, mellem operatører	CV, mellem udstyr	CV, mellem lot
1	34	5	27 %	26 %	5 %	23 %	8 %	0 %
2	34	32	14 %	9 %	10 %	12 %	0 %	2 %
3	32	30	12 %	7 %	5 %	17 %	7 %	6 %
7	32	39	28 %	24 %	2 %	8 %	11 %	7 %
8	34	37	21 %	14 %	12 %	0 %	0 %	9 %

*Panelmedlemmerne 4-6 indeholdt kun PCA3- eller PSA RNA-transkript og blev derfor ikke inkluderet i denne analyse.

Bibliografi

1. **Bussemakers, M.J.G., A. Van Bokhoven, G.W. Verhaegh, F.P. Smit, H.F.M. Karthaus, J.A. Schalken, F.M.J. Debruyne, N. Ru, and W.B. Isaacs.** 1999. DD3: A New Prostate-Specific Gene, Highly Overexpressed in Prostate Cancer. *Cancer Res.* **59**:5975-5979.
2. **Hessels, D., J.Mt. Klein Gunnewiek, I. van Oort, H.F.M. Karthaus, G.J.L. van Leenders, B. van Balken, L.A. Kiemeneij, J.A. Witjes, and J.A. Schalken.** 2003. DD3^{PCA3}-based Molecular Urine Analysis for the Diagnosis of Prostate Cancer. *European Urology.* **44**:8-16.
3. **Groskopf J., S.M. Aubin, I.L. Deras, A. Blase, S. Bodrug, C. Clark, S. Brentano, J. Mathis, J. Pham, T. Meyer, M. Cass, P. Hodge, M.L. Macairan, L.S. Marks, and H. Rittenhouse.** 2006. Aptima PCA3 Molecular Urine Test: Development of a Method to Aid in the Diagnosis of Prostate Cancer. *Clin Chem.* **52**:1089-95.
4. **CLSI.** 1995. CLSI document GP10-A, Assessment of the Clinical Accuracy of Laboratory Tests Using Receiver Operating Characteristic (ROC) Plots. CLSI, Wayne, PA.
5. **CLSI.** 2004. CLSI document EP17-A, Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation. CLSI, Wayne, PA.
6. **CLSI.** 2005. CLSI document EP7-A2, Interference Testing in Clinical Chemistry. CLSI, Wayne, PA.
7. **CLSI.** 2005. CLSI document EP15-A2, User Verification of Performance for Precision and Trueness. CLSI, Wayne, PA.
8. **CLSI.** 2003. CLSI document EP6-A, Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach. CLSI, Wayne, PA.
9. **CLSI.** 2004. CLSI document EP5-A2, Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods. CLSI, Wayne, PA.



Hologic, Inc.
10210 Genetic Center Drive
San Diego, CA 92121 USA

Kundesupport: +1 800 442 9892
customersupport@hologic.com
Teknisk rådgivning: +1 888 484 4747
molecularsupport@hologic.com

For yderligere kontaktoplysninger henvises til www.hologic.com.



Hologic N.V.
Da Vincilaan 5
1930 Zaventem
Belgium

Hologic, Aptima, DTS, Leader, Progensa, og SB100 er varemærker og/eller registrerede varemærker, der tilhører Hologic, Inc. og/eller deres datterselskaber i USA og/eller andre lande.

eppendorf (stiliseret) og REPEATER er varemærker, der tilhører Eppendorf AG.

RAININ er et varemærke, der tilhører Rainin Instrument, LLC.

TECAN og FREEDOM EVO er varemærker, der tilhører Tecan Group AG.

Alle andre varemærker, der måtte findes i denne indlægsseddel, tilhører de respektive ejere.

Dette produkt kan være dækket af et eller flere amerikanske patenter. Se www.hologic.com/patents.

©2006 – 2018 Hologic, Inc. Alle rettigheder forbeholdes.

501377DA Rev. 003

2018-03