

Progensa PCA3-määritys

In vitro -diagnostiseen käyttöön.

Ainoastaan vientiin Yhdysvalloista.

Yleistietoja	2
Aiottu käyttö	2
Testin yhteenveto ja kuvaus	2
Toimenpiteen periaatteet	2
Toimitetut reagenssit ja materiaalit	4
Materiaalit	8
Varoitukset ja varotoimet	10
Säilytys- ja käsittelyohjeet	12
Näytteen kerääminen, kuljetus ja säilytys	14
Testimenetelmä	16
Toimenpiteeseen liittyviä huomautuksia	22
Laadunvalvonta	25
Tulosten tulkinta	26
Rajoitukset	31
Suorituskyvyn ominaisuudet	32
Kirjallisuusluettelo	38

Yleistietoja

Aiottu käyttö

Progensa PCA3 -määritys on *in vitro* -nukleiinihappomonistustesti (NAAT), jolla miesten virtsanäytteistä todetaan eturauhassyöpägeeni 3:n (PCA3) ribonukleiinihappo (RNA) ja saadaan PCA3 Score (PCA3-arvo). PCA3 Score on tarkoitettu käytettäväksi yhdessä tavanomaisten hoitoa koskevien algoritmien kanssa apuna eturauhassyövän diagnoosissa.

Testin yhteenveto ja kuvaus

Eturauhassyövän seulonnassa käytetty seerumin prostataspesifisen antigeenin (PSA) testaus on johtanut entistä pienempien, aikaisemmin huomaamatta jääneiden kasvaimien biopsiadiagnooseihin (1) ja näin ollen saanut aikaan uuden diagnostisen ongelman: vain osalla miehistä, joilla on kohonneet seerumin PSA-arvot, on havaittavissa oleva eturauhassyöpä. Miehillä, joilla on ainakin yksi negatiivinen biopsia, on usein jatkuvasti koholla oleva seerumin PSA, mikä johtuu etusijassa laajenneesta eturauhasesta ja prostatan hyvänlaatuisesta liikakasvusta (BPH). Silti merkittäväällä osalla miehistä, joilla seerumin PSA on hieman koholla (2,5–4,0 µg/l), joko on tai sille kehittyy kliinisesti merkitsevä eturauhassyöpä (1). Vaikka biopsia on edelleen kultainen standardi eturauhassyövän havaitsemisessa, tarvitaan tarkempia, spesifisempiä testejä auttamaan eturauhasen biopsiaa koskevaa päätöksentekoa.

PCA3 (tunnetaan myös nimellä "PCA3^{DD3}" tai "DD3^{PCA3}") on ei-koodittava prostataspesifinen RNA, jonka ilmentyminen eturauhassyöpäsoluissa viereiseen hyvänlaatuiseen kudokseen verrattuna on rajusti runsastunut ylisäätelyn mediaanin ollessa 66-kertainen (2). Sitä vastoin PSA-geenin ilmentyminen on samanlainen kanserooseissa ja hyvänlaatuisissa eturauhassoluissa; PSA-RNA:n määriä voidaan näin ollen käyttää normalisoimaan molekulaaristen testinäytteiden prostataspesifisen ribonukleiinihapon (RNA) määrät. On osoitettu, että kvantitatiivinen PCA3-pohjainen molekulaarinen testaus virtsan sakoista (2) ja kokovirtsasta (3) on käyttökelpoinen.

Progensa PCA3 -määrityksessä käytetään kokovirtsaa, joka kerätään peräsuolen kautta tehtävän tuseerauksen (TPR) jälkeen, jossa kumpaakin eturauhaslohkoa sivellään kolme kertaa. TPR vapauttaa eturauhasen soluja eturauhasen tiehytjärjestelmän kautta virtsaputkeen, josta ne voidaan kerätä ensivirtsaan. Virtsa prosessoidaan lisäämällä virtsan siirtoliuosta (UTM), joka hajottaa solut ja stabiloi RNA:n. PCA3:n ja PSA:n RNA:t kvantifioidaan ja PCA3 Scoren määritys perustuu PCA3:n ja PSA:n RNA-suhteeseen. PCA3-signaalin normalisoinnin lisäksi PSA-RNA:n mittaaminen auttaa myös varmistamaan, että eturauhasspesifisen RNA:n saanto on riittävä validin tuloksen aikaansaamiseksi. Korkeammat PCA3 Scoret korreloivat positiivisen eturauhasbiopsian korkeamman todennäköisyyden kanssa.

Toimenpiteen periaatteet

Progensa PCA3 -määritys muodostuu kahdesta kvantitatiivisesta nukleiinihappomonistustestistä. Progensa PCA3 -määritys yhdistää kohteen sieppauksen (target capture), transkriptiovälitteisen monistuksen (TMA) ja hybridisaatiosuojelumäärityksen (HPA), jolloin vastaavasti virtsanäytteen prosessointi, kohde-RNA:n monistus ja amplikonin havaitseminen virtaviivaistetaan.

Kun Progensä PCA3 -määritys suoritetaan laboratoriossa, kohde-RNA-molekyylit eristetään virtsanäytteistä target capture -menetelmällä. Oligonukleotidit ("sieppausoligonukleotidit"), jotka ovat komplementaarisia kohteiden sekvenssispesifisten alueiden kanssa, hybridisoidaan virtsanäytteessä oleviin kohteisiin. Jokaista kohdetta varten käytetään erillistä sieppausoligonukleotidia. Hybridisoitunut kohde siepataan sitten magneettisten mikropartikkeleiden pinnalle, jotka erotetaan virtsanäytteestä magneettikentässä. Pesuvaiheiden avulla reaktioputkesta poistetaan ylimääräiset komponentit. Magneettinen erottaminen ja pesuvaiheet suoritetaan target capture -järjestelmällä.

Kohteen monistuminen tapahtuu TMA:n välityksellä, joka on transkriptiopohjainen nukleiinihappomonistusmenetelmä, jossa käytetään kahta entsyymiä, Moloneyn hiirileukemiaviruksen (MMLV) käänteistranskriptaasia ja T7 RNA-polymeraasia. Jokaista kohdetta varten käytetään ainutkertaista oligosettiä. Käänteistranskriptaasia käytetään tuottamaan kohdesekvenssin deoksiribonukleiinihappo (DNA) -kopio (joka sisältää T7 RNA-polymeraasin promoottorisekvenssin). T7 RNA-polymeraasi tuottaa useita kopioita RNA-amplikonista DNA:n kopioplaatista.

Havaitseminen saadaan aikaan HPA:lla käyttämällä yksijuosteisia, kemiluminesenssilla leimattuja nukleiinihappokoettimia, jotka ovat komplementaarisia amplikonille. Kutakin kohdeamplikonin varten käytetään eri koettimia. Leimatut nukleiinihappokoettimet hybridisoituvat erityisesti amplikoniin. Erotusreagenssi erottaa hybridisoidut ja hybridisoitumattomat koettimet toisistaan inaktivoimalla hybridisoitumattomien koettimien leiman. Havaitsemisvaiheen aikana hybridisoituneen koettimen tuottama kemiluminesenssisignaali mitataan luminometrissä ja se raportoidaan suhteellisina valoyksikköinä (RLU).

PCA3- ja PSA-RNA:t kvantifioidaan eri putkista ja PCA3 Score määritetään. Jokaiseen määritysajoon sisällytetään kalibraattoreita, jotka sisältävät tunnettuja määriä PCA3- tai PSA-RNA-transkriptiotuotteita, ja niistä muodostetaan standardikäyrä. PCA3- ja PSA-kontrollit sisällytetään myös mukaan, jotta standardikäyrästä interpoloitujen tulosten ulkoinen tarkkuus voidaan varmistaa.

Toimitetut reagenssit ja materiaalit

Huomautus: Katso tietoja reagensseihin mahdollisesti liittyvistä vaaroista ja varoituslausekkeista kohdasta Safety Data Sheet Library (turvallisuustiedotekirjasto) osoitteessa www.hologic.com/sds.

Alla luetellaan reagenssit ja materiaalit, jotka sisältyvät Progensa PCA3/PSA-määritystarvikesarjaan Progensa PCA3 -määritystä varten. Reagenssin tunnistussymbolit on myös lueteltu reagenssin nimen vieressä.

Progensa PCA3 -määritystarvikesarja, 2 x 100 reaktiota, luettelonumero 302355 (8 laatikkoa)

Progensa PCA3 100-reaktiotarvikesarja

Progensa PCA3 -kylmälaatikko — Säilytetään vastaanottamisen jälkeen 2 °C–8 °C:ssa aina etiketissä ilmoitettuun viimeiseen käyttöpäivään saakka

Symboli	Osa	Määrä
A	PCA3-monistusreagenssi <i>Ei-infektiivisiä nukleiinihappoja, jotka on kuivattu HEPES-puskuroidussa liuoksessa, joka sisältää <10 % täyteainetta.</i>	1 ampulli
E	PCA3/PSA-entsyymireagenssi <i>Käänteistranskriptaasi ja RNA-polymeraasi, kuivattu HEPES-puskuroidussa liuoksessa, joka sisältää <10 % täyteainetta.</i>	1 ampulli
P	PCA3-koetinreagenssi <i>Ei-infektiivisiä kemiluminesoivia DNA-koettimia, jotka on kuivattu sukkinatilla puskuroidussa liuoksessa, joka sisältää <5 % täyteainetta ja <5 % litiumlauryylisulfaattia.</i>	1 ampulli

Progensa PCA3 -määrityksen huoneenlämmössä pidettävä laatikko — Säilytetään vastaanottamisen jälkeen 15 °C–30 °C:ssa aina etiketissä ilmoitettuun viimeiseen käyttöpäivään saakka

Symboli	Osa	Määrä
AR	Liuos PCA3-monistusreagenssin liuotukseen <i>Säilöntäaineita sisältävä vesipohjainen liuos (<1 % parabeeneja).</i>	1 x 9,3 ml
ER	Liuos PCA3/PSA-entsyymireagenssin liuotukseen <i>HEPES-puskuroitu liuos, joka sisältää surfaktanttia (10 % Triton X-100:aa) ja 20 % glyserolia.</i>	1 x 3,3 ml
PR	Liuos PCA3/PSA-koettimen liuotukseen <i>Sukkinatilla puskuroitu liuos, joka sisältää <5 % litiumlauryylisulfaattia.</i>	1 x 12,4 ml
S	PCA3/PSA-erotusreagenssi <i>Boraatilla puskuroitu liuos, joka sisältää surfaktanttia (1 % Triton X-100).</i>	1 x 31 ml

TCR	PCA3 Target Capture -reagenssi <i>Ei-infektiivinen nukleiinihappo HEPES-puskuroidussa liuoksessa, joka sisältää kiinteän faasin.</i>	1 x 22 ml
	Suljentakortit	1 pakkaus
	Liuotukseen käytettävät pidikkeet	1 pakkaus

Progensa PCA3 -kalibraattorien ja -kontrollien tarvikesarja — Säilytetään vastaanottamisen jälkeen 2 °C–8 °C:ssa etiketissä ilmoitettuun viimeiseen käyttöpäivään saakka

Symboli	Osa	Määrä
CAL	PCA3-kalibraattori 1 <i>Fosfaatilla puskuroitu liuos, joka sisältää <5 % litiumlauryylisulfaattia.</i>	1 x 2,0 ml
CAL	PCA3-kalibraattorit 2–5 <i>Ei-infektiivinen PCA3-nukleiinihappo fosfaattipuskuroidussa liuoksessa, joka sisältää <5 % litiumlauryylisulfaattia.</i>	4 x 1,7 ml
PC	PCA3-positiiviset kontrollit <i>Ei-infektiivinen PCA3-nukleiinihappo fosfaattipuskuroidussa liuoksessa, joka sisältää <5 % litiumlauryylisulfaattia.</i>	2 x 1,7 ml
	PCA3-pitoisuuden tietoarkki	1 arkki

Progensa PSA 100-reaktiotarvikesarja

Progensa PSA -kylmälaatikko — Säilytetään vastaanottamisen jälkeen 2 °C–8 °C:ssa etiketissä ilmoitettuun viimeiseen käyttöpäivään saakka

Symboli	Osa	Määrä
A	PSA-monistusreagenssi <i>Ei-infektiivisiä nukleiinihappoja, jotka on kuivattu HEPES-puskuroidussa liuoksessa, joka sisältää <10 % täyteainetta.</i>	1 ampulli
E	PCA3/PSA-entsyymireagenssi <i>Käänteistranskriptaasi ja RNA-polymeraasi, kuivattu HEPES-puskuroidussa liuoksessa, joka sisältää <10 % täyteainetta.</i>	1 ampulli
P	PSA-koetinreagenssi <i>Ei-infektiivisiä kemiluminesoivia DNA-koettimia, jotka on kuivattu sukkiinaatilla puskuroidussa liuoksessa, joka sisältää <5 % täyteainetta ja <5 % litiumlauryylisulfaattia.</i>	1 ampulli

Progensa PSA:n huoneenlämmössä pidettävä laatikko — Säilytetään vastaanottamisen jälkeen 15 °C–30 °C:ssa aina etiketissä ilmoitettuun viimeiseen käyttöpäivään saakka

Symboli	Osa	Määrä
AR	Liuos PSA-monistusreagenssin liuotukseen <i>Säilöntäaineita sisältävä vesipohjainen liuos (<1 % parabeeneja).</i>	1 x 9,3 ml
ER	Liuos PCA3/PSA-entsyymireagenssin liuotukseen <i>HEPES-puskuroitu liuos, joka sisältää surfaktanttia (10 % Triton X-100:aa) ja 20 % glyserolia.</i>	1 x 3,3 ml
PR	Liuos PCA3/PSA-koettimen liuotukseen <i>Sukkinaatilla puskuroitu liuos, joka sisältää <5 % litiumlauryylisulfaattia.</i>	1 x 12,4 ml
S	PCA3/PSA-erotusreagenssi <i>Boraatilla puskuroitu liuos, joka sisältää surfaktanttia (1 % Triton X-100).</i>	1 x 31 ml
TCR	PSA Target Capture -reagenssi <i>Ei-infektiivinen nukleiinihappo HEPES-puskuroidussa liuoksessa, joka sisältää kiinteän faasin.</i>	1 x 22 ml
	Suljentakortit	1 pakkaus
	Liuotukseen käytettävät pidikkeet	1 pakkaus

Progensa PSA-kalibraattorien ja -kontrollien tarvikesarja — Säilytetään vastaanottamisen jälkeen 2 °C–8 °C:ssa aina etiketissä ilmoitettuun viimeiseen käyttöpäivään saakka

Symboli	Osa	Määrä
CAL	PSA-kalibraattori 1 <i>Fosfaatilla puskuroitu liuos, joka sisältää <5 % litiumlauryylisulfaattia.</i>	1 x 2,0 ml
CAL	PSA-kalibraattorit 2–5 <i>Ei-infektiivinen PSA-nukleiinihappo fosfaattipuskuroidussa liuoksessa, joka sisältää <5 % litiumlauryylisulfaattia.</i>	4 x 1,7 ml
PC	PSA-positiiviset kontrollit <i>Ei-infektiivinen PSA-nukleiinihappo fosfaattipuskuroidussa liuoksessa, joka sisältää <5 % litiumlauryylisulfaattia.</i>	2 x 1,7 ml
	PSA-pitoisuuden tietoarkki	1 arkki

Aptima-määritysneesteet — Säilytetään vastaanottamisen jälkeen 15 °C–30 °C:ssa (2 laatikkoa) etiketissä ilmoitettuun viimeiseen käyttöpäivään saakka

Symboli	Osa	Määrä
W	Pesuliuos <i>HEPES-puskuroitu liuos, joka sisältää <2 % natriumdodekyylisulfaattia.</i>	1 x 402 ml
DF	Deaktivointiliuoksen puskuri <i>Bikarbonaatilla puskuroitu liuos.</i>	1 x 402 ml
O	Öljyreagenssi <i>Silikonijöly.</i>	1 x 24,6 ml

Huomautus: Kaikki Progensa PCA3 -määritystarvikesarjaan sisältyvät materiaalit voidaan ostaa myös erikseen (katso yksityiskohtia osasta Materiaalit).

Materiaalit

Huomautus: Katso tietoja reagensseihin mahdollisesti liittyvistä vaaroista ja varoituslausekkeista kohdasta Safety Data Sheet Library (turvallisuustiedotekirjasto) osoitteessa www.hologic.com/sds.

Huomautus: Luetteloon on merkitty Hologic saatavien materiaalien luettelonumerot.

Tarvittavat materiaalit, jotka ovat saatavilla erikseen

	<u>Luettelo nro</u>
Progensa PCA3 Urine Specimen Transport -tarvikesarja	302352
Leader HC+ -luminometri	104747
Hologic Target Capture (TCS) -järjestelmä	104555
Aptima Auto Detect -tarvikesarja	301048
2 eppendorf Repeater Plus -pipettoria	105725
Toistopipettorin kärkiä (2,5 ml, 5,0 ml, 25,0 ml)	—
Joko:	—
2 vortex-sekoitinta moniputkiyksiköllä	102160F
3 kiertovesihaudetta (62 °C ± 1 °C, 42 °C ± 1 °C, 62 °C ± 1 °C)	104586F
3 vesihaudevälikkettä	104627
TAI:	
2 SB100 Dry Heat Bath/Vortexer -laitetta (yhd. lämpöhaude ja vortex-sekoitin) Muiden SB100-laitteiden tarve riippuu vaadittavasta suoritusohjelmasta	105524F
Mikropipettori, 1 000 µl RAININ PR1000	901715
Kärkiä, 1 000 µl P1000	105049
Pipettori, eppendorf 20–200 µl	105726
Pipetinkärkiä, 20–200 µl	—
5–7-prosenttinen (0,7–1,0 M) natriumhypokloriittiliuos	—
Isolla korkilla varustettu muovisäiliö	—
Tavanomaisia virtsankeruusäiliöitä, ilman säilöntäaineita	—
Kymmenen putken yksiköitä (TTU)	TU0022
Kymmenen kärjen kasetteja (TTC)	104578
SysCheck-kalibrointistandardi	301078

Valinnanvaraiset materiaalit

	<u>Luettelo nro</u>
Progensa PCA3 100-reaktiotarvikesarja	302354
Progensa PSA 100-reaktiotarvikesarja	302357
Progensa PCA3 -kalibraattorien ja -kontrollien tarvikesarja	302353

	<u>Luettelo nro</u>
Progensa PSA -kalibraattorien ja -kontrollien tarvikesarja	302356
Progensa PCA3/PSA Proficiency Panels (taitopaneelit)	302350
Progensa PCA3 -näytteenlaimennustarvikesarja	302351
Aptima-määrityksen nestetarvikesarja	302002C
Kertakäyttöisiä pipetinkärkiä, suodattimella varustettuja, (1 ml)	10612513 (Tecan)
TECAN Freedom EVO 100/4	900932
<i>PCA3-kansilevy-yksikkö, DTS 800</i>	902021
<i>Reagenssisäiliö (40 ml:n neljännesmoduuli)</i>	104765
<i>Jaettu reagenssisäiliö (19 ml x 2 neljännesmoduulia)</i>	901172
Siirtoputket	302521
Puhkaistavien korkkien vaihtokorkit	302520
Ei-puhkaistavien korkkien vaihtokorkit	103036A

Varoitukset ja varotoimet

- A. *In vitro* -diagnostiseen käyttöön.
- B. Ainoastaan vientiin Yhdysvalloista.

Laboratorioon liittyvää

- C. Käytä ainoastaan toimitettuja tai määriteltyjä kertakäyttöisiä laboratoriovälineitä.
- D. Käytä tavanomaisia laboratoriovarotoimia. Työskentelyyn varatuilla alueilla ei saa syödä, juoda eikä tupakoida. Näytteitä ja tarvikesarjan reagensseja käsiteltäessä käytetään talkittomia kertakäyttökäsineitä, silmänsuojainta ja laboratoriotakkia. Virtsanäytteiden ja tarvikesarjan reagenssien käsittelyn jälkeen kädet pestään huolellisesti.
- E. **Varoitus: Ärsyttäviä aineita, syövyttäviä aineita.** Vältä kosketusta Auto Detect 1:n tai Auto Detect 2:n ja ihon, silmien tai limakalvojen välillä. Jos nämä nesteet joutuvat kosketuksiin ihon tai silmien kanssa, pese kosketusalue vedellä. Jos näitä nesteitä roiskuu, laimenna roiskeet vedellä ennen niiden pyyhkimistä.
- F. Työtasot, pipettorit ja muut välineet on puhdistettava säännöllisesti 2,5–3,5 -prosenttisella (0,35–0,5 M) natriumhypokloriittiliuoksella (ks. *Toimenpiteeseen liittyviä huomautuksia*).
- G. Suosittelemme painokkaasti, että monistuksen jälkeiset työvaiheet suoritetaan erillisellä alueella. Tämä minimoi amplikonikontaminaation määrityksessä. Tämän tälle vaiheelle omistetun alueen on oltava etäällä monistusta edeltävästä alueesta, jossa reagenssin valmistus, target capture -vaihe ja monistus tapahtuvat.
- H. Jotta laboratorion tiloja estettäisiin kontaminoitumasta amplikonilla, laboratorioalue on järjestettävä niin, että työnkulku on yksisuuntainen reagenssin valmistuksesta aina monistuksen jälkeisiin työvaiheisiin asti. Näytteitä, laitteita ja reagensseja ei saa palauttaa alueelle, jossa aikaisempi vaihe suoritettiin. Henkilöt eivät saa siirtyä takaisin aikaisemmille työalueille ilman asianmukaisia kontaminaation vastaisia varotoimia.

Näytteisiin liittyvää

- I. Kun virtsa on lisätty, nestetason virtsanäytteen siirtoputkessa on oltava putken etiketissä näkyvien kahden mustan indikaattoriiviin välillä. Muuten näyte on hylättävä.
- J. Pidä yllä oikeita säilytysolosuhteita näytteen kuljetuksen aikana varmistaaksesi näytteen integriteetin. Näytteen stabiiliteettia muissa kuin suositelluissa kuljetusolosuhteissa ei ole arvioitu.
- K. Viimeiset käyttöpäivät, jotka on lueteltu keräämiseen tarkoitetuissa tarvikesarjoissa, koskevat keruupaikkaa, eivät testauslaitosta. Näytteet, jotka on kerätty ennen keräämiseen tarkoitettua tarvikesarjan viimeistä käyttöpäivää, ja kuljetettu ja säilytetty pakkausselosteen mukaisesti, ovat valideja testausta varten, vaikka keruuputken viimeinen käyttöpäivä olisikin mennyt.
- L. Säilytä kaikkia näytteitä erikseen mainituissa lämpötiloissa. Väärin säilytettyjen näytteiden käyttö saattaa haitata määrittämisen suorittamista. Yksityiskohtaiset ohjeet, ks. *Näytteen kerääminen, kuljetus ja säilytys*.

- M. Virtsanäytteet voivat olla infektiivisiä. Käytä yleisiä varotoimia tätä määrittystä suoritettaessa. Laboratorion johtajan on luotava oikeat käsittely- ja hävitysmenetelmät. Tämän menetelmän saa suorittaa vain henkilökunta, joka on riittävän pätevä Progensa PCA3 -määrittelyn käytössä ja joka on saanut riittävän koulutuksen infektiivisten materiaalien käsittelyssä.
- N. Vältä ristikontaminaatiota näytteen käsittelyvaiheiden aikana. Virtsanäytteet voivat sisältää suuria määriä kohde-RNA:ta. Varmista, että näytesäiliöt eivät kosketa toisiaan, ja hävitä käytetyt materiaalit viemättä niitä avoimien säiliöiden yli. Jos käsiin koskettavat näytettä, vaihda ne ristikontaminaation välttämiseksi.

Määrittelyyn liittyvää

- O. Älä käytä tätä tarvikesarjaa sen viimeisen käyttöpäivän jälkeen.
- P. **Kun käytetään Progensa PCA3 -määrittästarvikesarjaa, älä vaihda keskenään, sekoita tai yhdistä PCA3-määrittästarvikesarjoja, joilla on eri eränumerot** (so. jokaisen analyysin kohdalla kylmälaatikossa ja huoneenlämmössä pidettävässä laatikossa olevien määrittästarvikesarjojen on oltava peräisin samasta erästä). Määrittästarvikesarjoja voidaan käyttää eri eristä peräisin olevien kalibraattori ja kontrollit -tarvikesarjojen kanssa. Aptima-määrittästarvikesarjat ovat keskenään vaihtokelpoisia. PCA3- ja PSA-reagenssit -tarvikesarjojen ei tarvitse vastata toisiaan.
- Q. Säilytä kaikkia määrittelyn reagensseja erikseen mainituissa lämpötiloissa. Väärin säilytettyjen määrittästarvikesarjojen käyttö saattaa haitata määrittelyn suorittamista. Yksityiskohtaiset ohjeet, ks. *Säilytys- ja käsittelyohjeet ja Toimenpiteeseen liittyviä huomautuksia*.
- R. Määrittelyn deaktivaatiota varten (katso *Testimenetelmä*) natriumkloriittiliuoksen vähimmäispitoisuuden on oltava 2,5 % (0,35 M) natriumkloriittia **sen jälkeen kun** se on laimennettu deaktivaatiopuskurilla suhteessa 1:1. Niinpä lähtöliuoksen natriumhypokloriittipitoisuuden on oltava ainakin 5–7 % (0,7–1,0 M) natriumkloriittia, jotta saataisiin deaktivaatioon tarvittava loppupitoisuus.
- S. On käytettävä kärkiä, joissa on hydrofobiset filtit. Tähän määrittelyyn on varattava vähintään kaksi toistopipettoria: toista käytetään monistusta edeltävissä vaiheissa ja toista monistuksen jälkeisissä vaiheissa. Yhtä mikropipettoria on käytettävä yksinomaan näytteen siirtoon, ellei käytetä TECAN Freedom EVO 100/4 -laitetta. Kaikki pipettorit on puhdistettava säännöllisesti osassa kuvatulla tavalla *Toimenpiteeseen liittyviä huomautuksia*.
- T. Kun käytät toistopipettoreita reagenssien lisäämiseen, älä kosketa reaktioputkea pipettorin kärjellä. Näin estät jäänteiden siirtymisen yhdestä putkesta toiseen.
- U. Tarkkojen määrittästarvikesarjojen saamiseksi on välttämätöntä suorittaa riittävä sekoitus. Loput yksityiskohdat, ks. *Toimenpiteeseen liittyviä huomautuksia*.
- V. Määrittelyyn on omistettava erilliset vesihautteet määrittelyn monistusta edeltäviä, monistuksen aikaisia ja monistuksen jälkeisiä vaiheita varten.
- W. Jotkin tämän tarvikesarjan reagenssit on merkitty vaara- ja turvamärkeillä Euroopan unionin direktiivin 1999/45/EY mukaisesti ja niitä on käsiteltävä vastaavasti. Käyttöturvallisuustiedotteita voi tarkastella osoitteessa www.hologic.com ja ne ovat saatavilla pyydettyäessä.

Säilytys- ja käsittelyohjeet

A. Reagenssien säilytystiedot, ks. Taulukko 1.

Taulukko 1: Reagenssin säilytys

Reagenssi/neste	Säilytys avaamattomana	Avattu / liuotettu Stabiilius (viimeiseen käyttöpäivään asti)
Monistusreagenssit	2 °C–8 °C viimeiseen käyttöpäivään asti	30 päivää, 2 °C–8 °C*
Koetinreagenssit	2 °C–8 °C viimeiseen käyttöpäivään asti	30 päivää, 2 °C–8 °C*
Entsyymireagenssi	2 °C–8 °C viimeiseen käyttöpäivään asti	30 päivää, 2 °C–8 °C*
Target Capture -reagenssit	15 °C–30 °C viimeiseen käyttöpäivään asti	30 päivää, 15 °C–30 °C
Liuos monistusreagenssin liuotukseen	2 °C–30 °C viimeiseen käyttöpäivään asti	E/S (kertakäyttöinen)
Liuos koettimen liuotukseen	2 °C–30 °C viimeiseen käyttöpäivään asti	E/S (kertakäyttöinen)
Liuos entsyymien liuotukseen	2 °C–30 °C viimeiseen käyttöpäivään asti	E/S (kertakäyttöinen)
Erotusreagenssi	2 °C–30 °C viimeiseen käyttöpäivään asti	30 päivää, 15 °C–30 °C
Kalibraattorit	2 °C–8 °C viimeiseen käyttöpäivään asti	E/S (kertakäyttöinen)
Kontrollit	2 °C–8 °C viimeiseen käyttöpäivään asti	E/S (kertakäyttöinen)
Öljyreagenssi	15 °C–30 °C viimeiseen käyttöpäivään asti	30 päivää, 15 °C–30 °C
Pesuliuos	15 °C–30 °C viimeiseen käyttöpäivään asti	30 päivää, 15 °C–30 °C
Deaktivointiliuoksen puskuri	15 °C–30 °C viimeiseen käyttöpäivään asti	28 päivää, 15 °C–30 °C

*Voidaan käyttää uudelleen muita määritysajojen varten korkeintaan neljä kertaa, edellyttäen että kokonaisaika huoneenlämpötilassa ei ylitä 24:ää tuntia.

B. Älä säilytä Target Capture -reagenssia alle 15 °C :n lämpötiloissa.

C. Koetinreagenssi ja liuotettu koetinreagenssi ovat valoherkkiä. Suojaa näitä reagensseja pitkiltä valoaltistuksilta säilytyksen ja käyttöön valmistelun aikana.

D. Reagensseja ei saa jäädyttää.

E. Älä käytä reagensseja tai nesteitä viimeisen käyttöpäivän jälkeen.

F. Progensa PCA3- ja PSA-kalibraattorit ja -kontrollit ovat kertakäyttöisiä pulloja ja ne on hävitettävä käytön jälkeen.

G. Muutokset toimitetun reagenssin fyysisessä ulkonäössä voivat olla merkki näiden materiaalien epästabiiliudesta tai huononemisesta. Jos suspendoinnin jälkeen havaitaan muutoksia reagenssien fyysisessä ulkonäössä (esim. ilmeisiä muutoksia reagenssin värissä tai sameus, joka viittaa mikrobikontaminaatioon), ota yhteyttä Hologic tekniseen tukeen ennen käyttöä.

H. Heitä pois liuotettu reagenssi 30 päivän kuluttua tai viimeiseen käyttöpäivään mennessä, kumpi tahansa tulee ensin.

- I. Jäljelle jääneitä avattuja tai liuotettuja reagensseja voidaan käyttää myöhemmissä määrityksissä, jos ne on säilytetty oikein ensimmäisen käyttökerran jälkeen. Jäljelle jäänyt reagenssi voidaan yhdistää äsken valmistetun tai toisen jäljelle jääneen reagenssin kanssa, joilla on sama eränumero. **Eri eränumeroilla merkittyihin tarvikesarjoihin kuuluvia reagensseja ei saa vaihtaa, sekoittaa tai yhdistää keskenään** (ks. *Varoitukset ja varotoimet*). Yhdistetyn reagenssin mikään komponentti ei saa ylittää avatun tai liuotetun reagenssin säilytysrajoja. Varmista, että yhdistetty reagenssi on sekoitettu perusteellisesti ja että on valmistettu riittävä tilavuus, jotta reagenssia riittää koko määritysajoa varten.

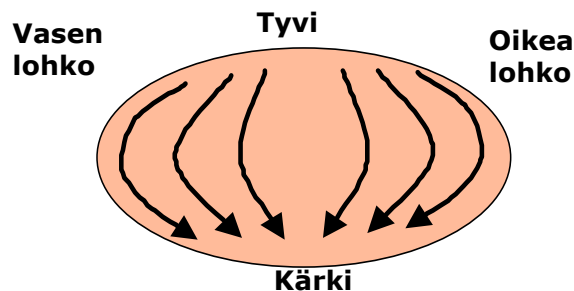
Näytteen kerääminen, kuljetus ja säilytys

Progensa PCA3 -määritys on suunniteltu kvantifioimaan PCA3- ja PSA-RNA ensivirtsasta, joka on kerätty TPR:n jälkeen, jossa kumpaakin eturauhaslohkoa sivellään kolme kertaa. Virtsa prosessoidaan käyttämällä Progensa PCA3 Urine Specimen Transport -tarvikesarjaa. PCA3- ja PSA-RNA:n stabiilius virtsassa ja prosessoidussa virtsassa määritettiin tarkkailemalla RNA-kopiomääriä virtsanäytteissä, jotka oli kerätty jäljempänä mainittujen ohjeiden mukaisesti.

A. Ohjeet virtsanäytteiden keräämiseksi ja prosessoimiseksi:

1. Pyydä potilasta juomaan suuri määrä vettä (noin 0,5 litraa), jotta virtsanäytettä saadaan riittävä määrä.
2. Suorita TPR alla annettujen ohjeiden mukaisesti välittömästi ennen virtsanäytteen keräämistä:

Paina eturauhasta niin, että eturauhasen pinta painuu noin 1 cm:n verran, ja etene kumpaakin lohkoa pitkin tyvestä kärkeen ja sivulta keskelle Kuva 1 mukaisesti. Sivele kumpaakin lohkoa täsmälleen kolme kertaa. Tämän ei ole tarkoitus olla eturauhashierontaa.



Kuva 1. Eturauhasen painelun oikea suunta

3. Pyydä TPR:n jälkeen potilasta keräämään ensivirtsa (noin 20–30 ml, kun virtsa alkaa virrata) asianmukaisesti merkittyyn virtsankeruuastiaan. Tämän on oltava ensimmäisestä TPR:n jälkeen virtsatusta virtsanäytteestä. Käytä keruuastiaa, jossa ei ole säilöntäainetta. Jos potilas ei voi lopettaa virtsaamista ja virtsanäytettä on yli 20–30 ml, käytä koko virtsamäärä. Jos potilas ei pysty virtsaamaan vaadittua määrää, Progensa PCA3 -määrityksen ajamiseen tarvitaan vähintään 2,5 ml virtsaa. Muuten näyte on hylättävä.

Huomautus: Hyvin suuret virtsamäärät voivat pienentää PCA3- ja PSA-analyysin pitoisuuksia ja saattavat joskus harvoin tuottaa epävalidin näytteen. Potilaan olisi siis pyrittävä välttämään virtsankeruuastian täyttämistä.

4. **Prosessoimattomia virtsanäytteitä, joita ei prosessoida välittömästi, on säilytettävä 2 °C–8 °C:ssa tai jäissä. Jäähdytetty, prosessoimaton virtsanäyte on siirrettävä virtsanäytteen siirtoputken 4 tunnin sisällä näytteenotosta. Muussa tapauksessa näyte täytyy hylätä ja kerätä uusi näyte. Prosessoimattomia virtsanäytteitä ei saa pakastaa.**
5. Prosessoi virtsanäytteet sulkemalla putken korkki kunnolla ja kääntämällä virtsanäyte viisi kertaa ylösalaisin solujen suspendoimiseksi. Poista virtsanäytteen siirtoputken korkki ja siirrä 2,5 ml virtsanäytettä putkeen pakkauksen mukana toimitetulla kertakäyttöisellä siirtopipetillä. Putkessa on oikea määrä näytettä, kun nestetaso on virtsanäytteen siirtoputkessa olevan etiketin kahden mustan täyttyviivan välissä.

6. Sulje virtsanäytteen siirtoputken korkki uudestaan tiiviisti ja sekoita virtsanäyte kääntämällä ylösalaisin 5 kertaa. Tämä on nyt prosessoitu virtsanäyte.

B. Näytteen kuljetus ja säilytys ennen testausta:

1. Prosessoidut virtsanäytteet on kuljetettava laboratorioon virtsanäytteen siirtoputkessa. Näytteet voidaan lähettää ympäristöoloissa (lämpötilaa ei ole säädetty) tai pakastettuina. Näytteiden lähetys on järjestettävä siten, että näytteet varmasti vastaanotetaan testauspaikassa 5 päivän sisällä näytteenotosta.

Lähetyksen vastaanotettuaan laboratorion pitäisi tarkistaa putkeen merkitty näytteenkeruun päivämäärä. Jos näytteet on lähetetty ympäristöoloissa ja vastaanotetaan yli 5 vuorokautta näytteenkeruun jälkeen, näyte on hylättävä ja pyydyttävä uusi näyte. Laboratorio voi säilyttää näytteet 2 °C–8 °C:ssa korkeintaan 14 vrk, ennen kuin ne on hävitettävä. Jos tarvitaan pitempiä säilytysaikoja, tarkista eri lämpötiloissa sallitut säilytysajat Taulukko 2.

Taulukko 2: Prosessoidun virtsanäytteen säilytysajat

Säilytyslämpötila	Aika
Prosessoidun näytteen säilyttäminen ja kuljettaminen:	Enintään 5 päivää*
Testipaikkaan tulon jälkeen:	
2 °C–8 °C	Enintään 14 päivää
-35 °C– -15 °C	Enintään 11 kuukautta**
-65 °C tai kylmemmässä	Enintään 36 kuukautta**

*Kuljetukseen sallittu aika ympäristöoloissa tai pakastettuna.

**Kylmäsäilytyksen jälkeinen sallittu aika.

2. Prosessoidut virtsanäytteet voidaan pakastaa ja sulattaa enintään 5 kertaa.

C. Näytteiden säilytys testauksen jälkeen:

1. Määritetyt näytteet on säilytettävä pystyasennossa telineessä.
2. Virtsanäytteen siirtoputket, jos niitä ei ole suljettu ehjällä korkilla, on peitettävä uudella, puhtaalla muovi- tai foliokääreellä.
3. Jos analysoituja näytteitä täytyy jäädyttää tai kuljettaa, poista puhkaistava korkki ja aseta virtsanäytteiden siirtoputkiin uudet, ei-puhkaistavat korkit. Jos näytteet täytyy lähettää toiseen laitokseen testausta varten, suositeltuja lämpötiloja on ylläpidettävä.
Vältä roiskahduksia tai ristikontaminaatiota.

Huomautus: *Näytteet on kuljetettava soveltuvien kansallisten ja kansainvälisten kuljetusmääräyksiä mukaisesti.*

Testimenetelmä

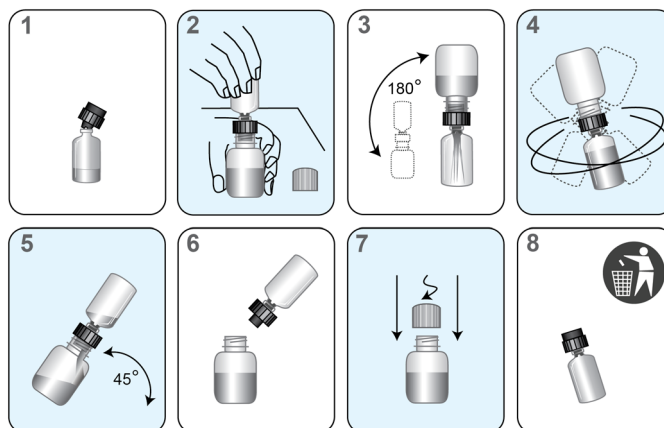
A. Työalueen valmistelu

1. Säädä yksi vesihaude $62\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$:n lämpötilaan monistusta edeltäviä toimia varten, toinen vesihaude $42\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$:n lämpötilaan monistusta varten ja kolmas vesihaude $62\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$:n lämpötilaan monistuksen jälkeisiä toimia varten. Varmista, että vesihauteissa on riittävästi vettä (ks. *Toimenpiteeseen liittyviä huomautuksia*). Jos käytät SB100 Dry Heat Bath/Vortexer -laitetta, ks. *SB100 Dry Heat Bath/Vortexer -laitteen sovellutuksen käyttöohjeet* Progensa PCA3-määritykselle (SB100-sovellutuksen käyttöohjeet).
2. Ennen kuin aloitat määrityksen, pyyhi työtasot ja pipettorit 2,5–3,5-prosenttisella (0,35–0,5 M) natriumhypokloriittiliuoksella. Anna natriumhypokloriittiliuoksen vaikuttaa tasoihin ja pipettoreihin vähintään 1 minuutin ajan ja huuhtelee pinnat sitten vedellä. Natriumhypokloriittiliuoksen ei saa antaa kuivua. Peitä laboratoriopöytä, jonka päällä reaktio suoritetaan, puhtailla, muovitaustaisilla ja imukykyisillä laboratoriopöydän suojapeitteillä.
3. Sijoita riittävä määrä kymmenen kärjen kasetteja Target Capture -järjestelmään (TCS). Varmista, että TCS-pesupullo on täytetty pesuliuoksella ja imulaite on kytketty alipainepumppuun. (Ks. *Target Capture -järjestelmän käyttäjän opas*.)

B. Reagenssin liuotus ja valmistelu

Reagenssin liuotus on suoritettava ennen näytteen siirron aloittamista.

1. Yhdistä pullo, jotka sisältävät lyofilisoituja reagensseja, reagenssia vastaavan liuoksen kanssa monistus-, entsyymi- ja koetinreagenssien liuottamiseksi. Jos liuoksia on säilytetty kylmässä, anna niiden palautua huoneenlämpöön ennen käyttöä.



Kuva 2. Liuotusmenetelmä

- a. Lisää kuivattuun reagenssiin sen liuottamiseen tarkoitettu liuos. Varmista, että pullojen etikettien värit täsmäävät sen varmistamiseksi, että ne on yhdistetty oikein.
- b. Avaa kuivattua reagenssia sisältävä ampulli ja työnnä liuotukseen käytettävän pidikkeen lovettu pää tiiviisti ampullin aukkoon (Kuva 2, vaihe 1).
- c. Avaa parina oleva liuotusneste ja aseta korkki puhtaalle, peitetulle työlustalle. Samalla kun pidät liuospulloa työpöydällä, työnnä liuotukseen käytettävän pidikkeen toinen pää tiiviisti pullon aukkoon (Kuva 2, vaihe 2).

- d. Käännä yhteenliitetyt pullo hitaasti ylösalaisin. Anna liuoksen valua pullosta lasiampulliin (Kuva 2, vaihe 3). Odota, että lyofilisoitu reagenssi liukenee ja pyöritä sitten varovasti lasipullossa olevaa liuosta sen sekoittamiseksi. Vältä vaahdon muodostumista, kun pyörität pulloa (Kuva 2, vaihe 4).
 - e. Käännä asetelma ylösalaisin ja pidä se 45°:n kulmassa vaahdon muodostumisen minimoimiseksi (Kuva 2, vaihe 5). Anna kaiken liuoksen valua takaisin muovipulloon.
 - f. Irrota liuotukseen käytettävä pidike ja lasiampulli (Kuva 2, vaihe 6).
 - g. Sulje muovipullo uudestaan korkilla (Kuva 2, vaihe 7). Merkitse kaikkiin liuotettua reagenssia sisältäviin pulloihin käyttäjän nimikirjaimet ja liuotuksen päivämäärä. Varmista, että merkitset analyytin (PCA3 tai PSA) koetinreagenssipulloihin.
 - h. Hävitä liuotukseen käytetty pidike ja lasiampulli (Kuva 2, vaihe 8).
2. Aiemmin liuotettujen koetin-, monistus- ja entsyymireagenssien on saavutettava huoneenlämpö (15 °C–30 °C) ennen määrittämisen aloittamista. Jäljelle jääneiden reagenssien yhdistäminen, ks. *Säilytys- ja käsittelyohjeet*. Jos liuotettu monistusreagenssi sisältää sakkaa, joka ei liukene huoneenlämmössä, lämmitä 62 °C ± 1 °C :n lämpötilassa 1–2 minuutin ajan monistusta edeltävällä alueella. Jos liuotettu koetinreagenssi sisältää sakkaa, joka ei liukene huoneenlämmössä, lämmitä 62 °C ± 1 °C :n lämpötilassa 1–2 minuutin ajan monistuksen jälkeisellä alueella. Näiden lämmitysvaiheiden jälkeen liuotettuja reagensseja voidaan käyttää, vaikka jäljelle olisikin jäänyt hieman sakkaa. Suspendoimisen jälkeen sekoita pullo kääntämällä niitä varovasti ylösalaisin.

C. Telineen valmistelu

Target capture -vaiheessa, näytteen siirrossa ja monistuksessa käytettävää toistopipettoria on käytettävä yksinomaan näissä vaiheissa (katso *Varoitukset ja varotoimet*).

1. Aseta yksi teline PCA3-analyyttille ja toinen teline PSA-analyyttille.

Huomautus: Jos näytteiden lukumäärä on tarpeeksi pieni, molemmat analyytit voidaan testata yhdessä telineessä. Jos käytetään TECAN Freedom EVO 100/4 -laitetta, erilliset telineet on pidettävä yllä kutakin analyyttiä varten. Kerrallaan ei voida testata kuin korkeintaan kaksi täyttä telinettä (20 TTU:ta).

2. Kymmenen putken yksikön (TTU) telineessä (telineissä), sijoita tarpeeksi TTU-yksiköitä, jotta niihin mahtuvat kunkin analyytin kalibraattorit, kontrollit ja näytteet.
3. Merkitse TTU:t näytetunnuksilla (sample ID). Taulukko 3 kuvaa kalibraattorien, kontrollien ja näytteiden lisäyksen. Aloita PSA-kalibraattorit uudella TTU:lla.

Huomautus: Kalibraattorit on ajettava kolmena replikaattina ja kontrollit kahtena replikaattina, ja ne on ajettava samassa telineessä kuin näytteet. Näytteet on ajettava duplikaatteina. Älä jätä tyhjiä reaktioputkia kalibraattorien, kontrollien ja näytteiden väliin. Jos käytät TECAN Freedom EVO 100/4 -laitetta, katso lisäohjeita TECAN Freedom EVO 100/4 -sovellutuksen käyttöohjeista Progensa PCA3 -määrittämiselle (TECAN Freedom EVO -sovellutuksen käyttöohjeet).

Taulukko 3: Esimerkki telineen valmistelusta

Sijainti telineessä	Näytteen kuvaus	*PCA3:n tavoitepitoisuus (kopioita/ml)	*PSA:n tavoitepitoisuus (kopioita/ml)
1–3	Kalibraattori 1	0	0
4–6	Kalibraattori 2	250	7 500
7–9	Kalibraattori 3	2 500	75 000
10–12	Kalibraattori 4	25 000	750 000
13–15	Kalibraattori 5	125 000	3 000 000
16–17	Kontrolli A	1 250	37 500
18–19	Kontrolli B	62 500	1 500 000
20–n	Näyte	tuntematon	tuntematon

*PCA3- ja PSA-positiivisten kalibraattorien ja kontrollien arvot on määritetty, joten kalibraattorien 2–5 ja kontrollien A ja B todelliset kopioita/ml-arvot poikkeavat hieman taulukossa luetelluista tavoitepitoisuuksista ja vaihtelevat erästä toiseen. Pitoisuustiedot ilmoitetaan kalibraattori- ja kontrollipullojen pakkaukseen sisältyvässä kortissa ja niitä käytetään kalibraatioon ja ajon validiteetin määrittämiseen.

D. Pitoisuustietojen varmistus

Varmista Progensa PCA3 -määritysohjelman järjestelmänvalvojan kanssa, että testattavien Progensa PCA3- ja PSA-kalibraattorien ja -kontrollien tarvikesarjojen erien pitoisuustiedot on syötetty. Lisätietoja, ks. *Progensa PCA3 -määrityksen pikaopas (Pikaopas)* tai *Progensa PCA3 -määritysohjelmiston järjestelmänvalvojan opas*.

Huomautus: Pitoisuustietojen syöttö on välttämätöntä ennen kunkin uuden kalibraattorien ja kontrollien tarvikesarjan erän **ensimmäistä käyttöä**. Tämä jälkeiset ajot, joissa käytetään samasta tarvikesarjan erästä peräisin olevia kalibraattoreita ja kontrolleja, eivät vaadi enää toimia.

E. Worklist Editorin valmistelu

Tee määrityksen ajon työlista käyttämällä Hologic Worklist Editoria tietokoneella, joka sijaitsee monistusta edeltävällä alueella. Worklist Editorin käyttö, ks. *Pikaopas* tai *Hologic Worklist Editorin käyttäjän opas*. Jos käytät TECAN Freedom EVO 100/4 -laitetta, ks. jatko-ohjeita myös *TECAN Freedom EVO -sovellutuksen käyttöohjeista*.

F. Näytteen valmistelu

1. Anna kalibraattorien ja kontrollien lämmitä huoneenlämpötilaan ennen testausta. Sekoita lasipullot kääntämällä niitä varovasti ylösalaisin.
2. Anna näytteiden lämmitä huoneenlämpötilaan ennen testausta. **Näytteitä ei saa vorteksoida**. Näytteet on sekoitettava lämmityksen aikana kääntämällä niitä varovasti ylösalaisin aika ajoin. Katso osasta *Toimenpiteeseen liittyviä huomautuksia* sakan liukenemattomuuteen ja pakastettujen näytteiden käsittelyyn liittyvät tiedot.

G. Monistusta edeltävät toimenpiteet

Monistusta edeltävän ympäristön lämpötilan tulee olla 15 °C–30 °C. Aja molemmat telineet rinnakkain. Jos käytät SB100 Dry Heat Bath/Vortexer -laitetta, katso *SB100-sovellutuksen käyttöohjeet*. Jos käytät TECAN Freedom EVO 100/4 -laitetta, katso lisäohjeita *TECAN Freedom EVO -sovellutuksen käyttöohjeista*.

1. Sekoita Target Capture -reagenssi (TCR) perusteellisesti pyörittämällä tai kääntämällä ylösalaisin. Lisää 100 µl analyyttispesifistä TCR:ää toistopipettorilla sopivaan reaktioputkeen.
2. Puhkaise kalibraattoripullon korkki mikropipettorilla ja lisää 400 µl kalibraattoria asianmukaisesti merkittyyn reaktioputkeen. Ota samalla pipetinkärjellä toistettuja lisäyksiä pullosta puhkaistun korkin kautta. Käytä uusia pipetinkärkiä kullekin kalibraattorin pullolle. Toista sama kontrollien ja näytteiden lisäyksen kanssa. Peitä ja säästä mahdollinen jäljelle jäänyt näyte ja säilytä korkeintaan 8 °C:ssa (lisätietoja, ks. *Näytteen kerääminen, kuljetus ja säilytys*) sen varalta, että testaus on uusittava.
3. Peitä TTU:t suljentakortilla (suljentakorteilla) ja ravistele telinettä varovasti käsin. **Älä vorteksoi**. Inkuboi telinettä 62 °C ± 1 °C :n vesihauteessa 30 ± 5 minuuttia.
4. Poista teline vesihauteesta ja kuivaa putkien pohjat imukykyisellä materiaalilla.
5. Varmista, että suljentakortit ovat lujasti paikallaan. Vaihda tarvittaessa uusiin suljentakortteihin ja sulje TTU:t tiukasti.
6. Vorteksoi telinettä 60 sekuntia moniputkiyksikön vortex-sekoittimella (ks. *Toimenpiteeseen liittyviä huomautuksia*). Aloita vorteksointi 2 minuutin sisällä siitä, kun olet poistanut telineen vesihauteesta.
7. Älä poista suljentakortteja. Inkuboi telinettä huoneenlämpötilassa 30 ± 5 minuuttia.
8. Sijoita teline Front-kieleke eteenpäin TCS-magneettialustalle 5–10 minuutiksi. Lataa TTC:t TTC-telineeseen.
9. Esitäytä työntöaseman pumpun letkut pumppaamalla pesuliuosta työntöputkiston läpi. Pumppaa tarpeeksi nestettä järjestelmän läpi, niin että letkussa ei ole ilmakuplia ja kaikista kymmenestä suuttimesta tulee tasainen nestevirta.
10. Käynnistä alipainepumppu ja kytke imulaitteen putkisto irti ensimmäisestä liittimestä imulaitteen putkiston ja loukkupullon välillä. Varmista, että alipainemittari täyttää vuototestin spesifikaation. Tämän lukeman saaminen voi viedä 15 sekuntia. Kytke putkisto takaisin ja varmista, että alipainemittari täyttää alipainetason spesifikaation. Jätä alipainepumppu päälle, kunnes kaikki target capture -vaiheet on suoritettu loppuun ja imulaitteen putkiston letkut ovat kuivia.
Katso Target Capture -järjestelmän alipainetiedot sisältävää korttia, joka sijaitsee *Target Capture -järjestelmän käyttäjän oppaan* loppupuolella tai ota yhteyttä Hologic tekniseen tukeen lisätietojen saamiseksi.
11. Kiinnitä imulaitteen putkisto lujasti ensimmäiseen kärkisettiin. Laske kärjet ensimmäiseen TTU:hun niin, että kärjet koskettavat nesteen pintaa. Pidä kärjet kosketuksessa nesteen pinnan kanssa kärkien liikkeessä alaspäin, kunnes kärjet koskettavat hetken putkien pohjia. Naputa kärjillä varovasti putkien pohjia, kunnes kaikki jäljellä oleva neste on poistettu. Älä pidä kärkiä pitkäaikaisessa kosketuksessa putkien pohjien kanssa tai naputa kärkiä nopeasti, koska alipaineloukkuun voi muodostua liikaa vaahtoa.
12. Sen jälkeen kun imuvaihe on suoritettu loppuun, työnnä kärjet niiden alkuperäiseen kärkikasettiin. Toista imuvaiheet muille TTU-yksiköille. Käytä jokaiselle reaktioputkelle yksinomaan sille omistettua kärkeä.

13. Sijoita työntöputkisto kunkin TTU:n yläpuolelle. Käytä työntöaseman pumppua ja jaa 1,0 ml pesuliuosta kuhunkin TTU:n putkeen.
14. Peitä putket suljentakortilla ja poista teline TCS:stä. Vorteksoi kerran moniputkiyksikön vortex-sekoittimella. Lisätietoja, ks. *Toimenpiteeseen liittyviä huomautuksia*.
15. Sijoita teline TCS-magneettialustalle 5–10 minuutiksi.
16. Ime kaikki neste kuten osassa Vaiheet 11 ja 12 on kuvattu.
17. Viimeisen imuvaiheen jälkeen poista teline TCS-alustalta ja tutki putket visuaalisesti sen varmistamiseksi, että kaikki neste on imetty pois ja kaikissa putkissa on magneettisista partikkeleista koostuva pelletti. Jos nestettä on yhtään jäljellä, sijoita teline takaisin TCS-alustalle 2 minuutiksi ja toista imuvaihe tälle TTU:lle käyttämällä samoja kärkiä, joita aikaisemmin käytettiin kunkin reaktioputken kanssa. Putki voidaan hyväksyä, jos imuvaiheen jälkeen näkyvissä on JONKINLAINEN magneettisista partikkeleista koostuva pelletti. Näyte on testattava uudelleen mikäli pellettiä ei näy lainkaan. Jos sama näyte ei sisällä seuraavan ajon tässä vaiheessa magneettipartikkeleista koostuvaa pellettiä, tämä voi olla merkki näytekohtaisesta ongelmasta. Tässä tilanteessa suositellaan virtsanäytteen keräämistä uudelleen.

H. Monistus

Huomautus: *Entsyymilisäys reaktiotelineeseen (Vaiheet 6 ja 7 jäljempänä) on suoritettava 90 sekunnin kuluessa.*

Suorita Vaiheet 6 ja 7 yhdellä telineellä ennen kuin toistat ne toisella telineellä. Jos käytät SB100 Dry Heat Bath/Vortexer -laitetta, katso *SB100-sovellutuksen käyttöohjeet*. Jos käytät TECAN Freedom EVO 100/4 -laitetta, katso lisäohjeita *TECAN Freedom EVO -sovellutuksen käyttöohjeista*.

1. Lisää 75 µl liuotettua, analyttispesifistä monistusreagenssia toistopipettorilla kuhunkin reaktioputkeen. Kaikkien telineen reaktioseoksien pitäisi olla nyt väriltään punaisia.
2. Lisää toistopipettorilla 200 µl öljyreagenssia.
3. Peitä putket suljentakortilla ja vorteksoi moniputkiyksikön vortex-sekoittimella.
4. Inkuboi telinettä monistusta edeltävän vaiheen $62\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$:n vesihauteessa 10 ± 5 minuuttia.
5. Siirrä teline $42\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$:n vesihauteeseen 5 ± 2 minuutiksi.
6. Pidä teline vesihauteessa ja poista varovasti suljentakortti. Lisää toistopipettorilla 25 µl liuotettua entsyymireagenssia kuhunkin reaktioseokseen. Kaikkien reaktioiden pitäisi olla nyt oranssin värisiä.
7. Peitä putket heti uudella suljentakortilla. Poista ne vesihauteesta ja sekoita reaktiot nopeasti ravistelemalla telinettä varovasti käsin.

Huomautus: *Pidä telinettä vesihauteen ulkopuolella mahdollisimman lyhyen aikaa, jotta putket eivät jäähdy.*

8. Inkuboi telinettä $42\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$:n lämpötilassa 60 ± 5 minuutin ajan.

I. Monistuksen jälkeiset toimenpiteet

Hybridisaatioissa ja erotuksessa käytettävää toistopipettoria on käytettävä yksinomaan näissä vaiheissa (ks. *Varoitukset ja varotoimet*). Monistuksen jälkeisen ympäristön lämpötilan, havaitseminen mukaan lukien, on oltava 15 °C–30 °C. Jos käytät SB100 Dry Heat Bath/Vortexer -laitetta, ks. *SB100-sovellutuksen käyttöohjeet*.

1. Hybridisaatio

- Poista teline monistusta edeltävästä vesihauteesta ja siirrä monistuksen jälkeiselle alueelle. Lisää toistopipettorilla 100 µl liuotettua, analyttispesifistä koetinreagenssia. Kaikkien reaktioseosten pitäisi olla nyt keltaisen värisiä.
- Peitä putket suljentakortilla ja vorteksoi 10 sekuntia, tai kunnes väri on yhtenäinen, moniputkiyksikön vortex-sekoittimella.
- Inkuboi telinettä 62 °C ± 1 °C :n vesihauteessa 20 ± 5 minuuttia.
- Poista teline vesihauteesta ja inkuboi huoneenlämpötilassa 5 ± 1 minuuttia.

2. Erotus

- Lisää toistopipettorilla 250 µl erotusreagenssia kuhunkin putkeen. Kaikkien reaktioiden pitäisi olla nyt vaaleanpunaisen värisiä.
- Peitä putket suljentakortilla, vorteksoi 10 sekuntia tai kunnes väri on yhtenäinen, ja inkuboi telinettä 62 °C ± 1 °C :n vesihauteessa 10 ± 1 minuuttia.
- Poista teline vesihauteesta. Inkuboi telinettä huoneenlämpötilassa 15 ± 3 minuuttia.

J. Havaitseminen

Leader HC+ -luminometrin käyttö, ks. *Leader HC+ luminometrin käyttäjän opas*.

Progensa PCA3 -määritysohjelmiston käyttö ks. *Pikaopas* tai *Progensa PCA3 -määritysohjelmiston järjestelmänvalvojan opas ja käyttäjän opas*.

- Valmistelee Leader HC+ -luminometri sijoittamalla yksi tyhjä TTU kasettiasemaan numero 1 ja suorita WASH-protokolla kerran.
- Varmista, että Auto Detect 1- ja 2 -tilavuudet riittävät reaktioiden loppuunsaamiseen.
- Lataa TTU:t luminometriin käyttämällä luminometrissa olevaa kaaviokuvaa oppaana. Jos testaat molemmat analyytit (määritysten suoritus peräkkäin -ajo), lataa kaikki PCA3 TTU:t ensin, ja heti tämän jälkeen kaikki PSA TTU:t.
- Kirjautu sisään tietokoneeseen. Napsauta **NEW RUN** ja valitse sopiva määritysprotokolla ja sopivat määrityspitoisuudet. Napsauta **NEXT** alkaaksesi ajon.
Huomautus: Ajo on suoritettava 2 tunnin kuluessa 62 °C:n erotusvaiheen inkubaation loputtua.
- Valmista deaktivointiliuos sekoittamalla yhtä suuret tilavuudet 5–7-prosenttista (0,7–1,0 M) natriumhypokloriittiliuosta ja deaktivointiliuoksen puskuria suurikorkkisessa muovisäiliössä. Merkitse muovisäiliö ja kirjoita siihen viimeinen käyttöpäivä. Deaktivointiliuos pysyy stabiilina huoneenlämmössä 4 viikkoa.
- Kun ajo on lopussa, määritysohjelmisto tuottaa kaksi ajoraporttia: Raw Run Report (raakatulosten raportti) ja Ratio Report (suhderaportti), jos ajot ovat määritysten suoritus peräkkäin -ajoja (ks. *Tulosten tulkinta* ja *Laadunvalvonta*).
- Kun ajo on lopussa, poista käytetyt TTU:t luminometrasta ja sijoita TTU:t säiliöön, joka sisältää deaktivointiliuosta. Anna TTU-yksiköiden olla säiliössä ainakin 15 minuuttia,

ennen kuin heität ne pois. Laboratorion johtajan on luotava oikeat käsittely- ja hävitysmenetelmät.

Toimenpiteeseen liittyviä huomautuksia

A. Näytteen valmistelu

1. Jos näytteissä on leijuvia sakkoja, lämmitä 37 °C:n lämpötilassa korkeintaan 5 minuuttia, jonka jälkeen käännä ylösalaisin varovasti. Mikäli sakka ei liukene, varmista että sakka ei estä näytteen pipetointia.
2. Pakastetut näytteet on sulatettava huoneenlämpötilassa (15 °C–30 °C, vesihaudetta voidaan käyttää). Liukenemattoman tulpan muodostumisen estämiseksi käännä näytteitä välillä ylösalaisin sulamisen aikana. Sekoita lasipulloja kääntämällä niitä varovasti ylösalaisin sen jälkeen kun lasipullon sisällä oleva jää on sulanut niin paljon, että se irtoaa ja voi liikkua vapaasti. Jatka lämmitystä, kunnes näyte on täysin sulanut ja sekoita lasipullot uudestaan kääntämällä niitä varovasti ylösalaisin.
 - a. Jos tulppa muodostuu ja näytteet pipetoidaan TECAN Freedom EVO 100/4 -laitteella, pakasta näyte uudelleen, noudata sulatusohjeita ja varmista, ettei tulppaa muodostu. Jos tulpan muodostumista ei voi välttää, näyte on pipetoitava käsin.
 - b. Jos tulppa muodostuu ja näytteet pipetoidaan käsin mikropipettorilla, muita toimenpiteitä ei tarvita, mutta varmista ettei tulppa estä näytteen pipetointia.

B. Kontrollin, kalibraattorin ja näytteen pipetointi

1. TTU-yksikköön lisätyn kalibraattorin, kontrollin tai näytteen tilavuuden tulee olla 400 µl. Suositellaan, että TTU-yksikköön pipetoitu tilavuus tutkitaan visuaalisesti oikean tilavuuden siirtymisen varmistamiseksi. Oikea tilavuus on tarpeen tarkkojen tulosten saamiseksi.
2. Varmista, että pipetinkärki sijaitsee oikein pipettorissa ja varmista, että tilavuus on asetettu oikein. Suositellaan, että tilavuusasetus tarkistetaan visuaalisesti jokaisen TTU:n jälkeen (joka 10. putki). Vapauta pipetin mäntä hitaasti tasaisella nopeudella kun vedät siihen näytettä. Näin vältät vaahdon ja kuplien muodostumisen.

C. Reagenssit

1. Koetinreagenssin liuotusneste (Probe Reconstitution Solution) voi saostua säilytyksen aikana. Lämmitä liuosta 62 °C ± 1 °C:n lämpötilassa 1–2 minuutin ajan. Tämän kuumennusvaiheen jälkeen koetinreagenssin liuotusnestettä voidaan käyttää, vaikka sakkaa olisikin jäljellä. Sekoita ampullia kääntämällä sitä hellävaroen ylösalaisin suspendoinnin jälkeen.
2. Kun pipetoit muita reagensseja kuin entsyymiä, tähtää hieman sivuun reaktioputken pohjasta (missä pohja kaareutuu kohti putken sivuja). Kun pipetoit entsyymireagenssia, tähtää suoraan reaktioputken keskelle. Vahvista visuaalisesti, että reagenssit jaetaan oikein (ei liikaa reagenssia putken sivuilla ja väri vaihtuu oikein).

D. Lämpötila

1. Target capture-, monistus-, hybridisaatio- ja erotusvaiheet ovat lämpötilasta riippuvaisia. On näin ollen välttämätöntä, että vesihauteet pidetään niiden ilmoitetuilla lämpötila-alueilla.
2. Huonelämpötila määritellään 15 °C–30 °C:ksi.

E. Aika

Target capture-, monistus-, hybridisaatio- ja erotusvaiheet ovat kaikki ajasta riippuvaisia. Noudata osassa *Testimenetelmä* annettuja spesifisiä aikoja.

F. Vorteksointi

Oikea vorteksointi on tärkeää Progensa PCA3 -määrityksen onnistuneelle suorittamiselle. Reaktioiden vorteksoimiseksi aseta moniputkiyksikön vortex-sekoitin alhaisimmalle asetukselle, kiinnitä teline ja käynnistä sekoitin. Lisää hitaasti nopeutta, kunnes neste menee putken puoliväliin asti. Vorteksoi 10 sekuntia, annettu aika, tai kunnes väri on yhtenäinen. Käännä nopeus alimpaan asentoon ennen kuin sammutat moniputkiyksikön vortex-sekoittimen ja poistat telineen. Reaktioseokset eivät saa koskaan koskettaa suljentakortteja.

G. Vesihauteet

1. Vedenkorkeuden vesihauteissa on oltava 3,8–5,0 cm (1,5–2,0 tuumaa) mitattuna metallialustasta (vesihautteen pohjassa) veden pintaan. Tämä varmistaa oikean lämmön siirtymisen.
2. Ristikontaminaation välttämiseksi vesihauteet on nimenomaisesti omistettava spesifiselle määrityksen vaiheelle.

H. Puhdistus

1. Pinnat ja pipettorit

Laboratoriopöytien pinnat ja pipettorit on puhdistettava säännöllisesti 2,5–3,5-prosenttisella (0,35–0,5 M) natriumhypokloriittiliuoksella. Anna natriumhypokloriittiliuoksen olla kosketuksissa pintoihin vähintään 1 minuutin ajan, ja huuhtelee pinnat sitten vedellä. **Natriumhypokloriittiliuoksen ei saa antaa kuivua.** Klooripitoiset liuokset voivat aiheuttaa laitteeseen ja metalliin pistemäistä syöpymistä. Huuhtelee laite perusteellisesti vedellä pistemäisen syöpymisen välttämiseksi.

2. TCS-imulaitteen putkisto

Jokaisen käytön jälkeen:

- a. Siirrä työntöputkisto pois tieltä.
- b. Sijoita uusi TTC TTC-telineeseen. Käynnistä alipainepumppu. Kiinnitä imulaitteen putkisto TTC:n kärkiin. Ime pois kaikki pesuliuos työntöaseman esitäyttöaltaasta.
- c. Kaada ainakin 100 ml 0,5–0,7-prosenttista (0,07–0,1 M), tai haluttaessa 2,5–3,5-prosenttista (0,35–0,5 M) natriumhypokloriittiliuosta esitäyttöaltaaseen. Ime kaikki liuos pois imulaitteen putkiston läpi.
- d. Kaada ainakin 100 ml deionisoitua vettä esitäyttöaltaaseen. Ime kaikki vesi pois imulaitteen putkiston läpi.
- e. Työnnä kärjet niiden alkuperäiseen TTC:hen.
- f. Jätä alipainepumppu käyntiin, kunnes imulaitteen putkiston letkut ovat kuivia, takaisinvirtauksen estämiseksi (noin 3 minuuttia).
- g. Puhdista imulaitteen putkiston pinnat osassa *TCS-yksikkö* kuvatulla tavalla.

3. TCS-jätesäiliö

Puhdista jätepullo ainakin kerran viikossa tai kun jätepullo on 25-prosenttisen täysi, kumpi tahansa tulee ensin.

- a. Sammuta alipainepumppu ja anna alipaineen tasoittua.
- b. Irrota pikaliittimet jätepullon ja ylivuotopullon välillä sekä jätepullon ja imulaitteen putkiston välillä.
- c. Poista jätepullo alipaineloukun kotelosta.
- d. Poista korkki ja lisää huolellisesti 400 ml 5–7-prosenttista (0,7–1,0 M) natriumhypokloriittiliuosta 4 litran jätepulloon.

Huomautus: Tämä voidaan tehdä vetokaapissa, jotta höyryä ei vapaudu laboratorioon.

- e. Sulje jätepullo korkilla ja sekoita sisältöä varovasti, kunnes se on täysin sekoittunut.
- f. Anna jätepullon seistä ainakin 15 minuuttia ja hävitä sitten sisältö (jäte).
- g. Huuhtelee jätepullo vedellä, jotta kaikki sisällä oleva jäte poistuu.
- h. Sulje tyhjä jätepullo korkilla ja pane se alipaineloukun koteloon. Kiinnitä pikaliittimet TCS-yksikköön. Hävitä varovasti molemmat käsiin.

4. TCS-yksikkö

Pyyhi TCS-yksikön, imulaitteen putkiston ja pesupuskurin suuttimien kärkien pinnat paperipyyhkeillä, jotka on kostutettu 2,5–3,5-prosenttisella (0,35–0,5 M) natriumhypokloriittiliuoksella. Natriumhypokloriittiliuosvaiheen jälkeen huuhtelee vedellä ja kuivaa sitten pinnat perusteellisesti paperipyyhkeillä.

5. Telineet

Upota telineet 2,5–3,5-prosenttiseen (0,35–0,5 M) natriumhypokloriittiliuokseen ja varmista, että ne ovat kokonaan liuoksen peitossa. Pidä telineitä upotettuina 10 minuutin ajan. Pitempi altistus vahingoittaa telineitä. Huuhtelee telineet perusteellisesti vedellä ja kuivaa sitten täydellisesti paperipyyhkeillä.

I. Määrityksen kontaminaatio

1. Jos määritysmenetelmän aikana ei olla riittävän huolellisia, siihen voi päästä kontaminoivia materiaaleja.
2. TTU:t on puhdistettava deaktivointiliuoksessa osassa *Testimenetelmä* kuvatulla tavalla. Älä käytä uudelleen TTU-yksikköjä.
3. Puhdista laite ja työtasot säännöllisesti edellä osassa kuvatulla tavalla *Puhdistus*.
4. Kuten muissakin reagenssijärjestelmissä, liika talkki käsiin saattaa aiheuttaa avattujen putkien kontaminaation. Talkittomien käsineiden käyttö on suositeltavaa.

Laadunvalvonta

A. Ajon validiteetti

1. Kalibraattorit ja kontrollit on ajettava kaikissa määrityksissä ja samassa telineessä kuin testinäytteet. Seuraavien kriteerien on täyttyvä, jotta ajoa pidetään validina:

Kalibraattori 2:n keskimääräinen RLU > RLU-raja-arvo (RLU-cutoff)

jossa RLU-raja-arvo = kalibraattori 1:n keskimääräinen RLU
+ 1,645 kalibraattori 1:n RLU-replikaattien keskihajontaa
+ 1,645 kalibraattori 2:n RLU-replikaattien keskihajontaa.

Keskimääräinen interpoloitu kalibraattori 5:n talteenotto = 100 ± 30 %

Keskimääräinen interpoloitu Kontrolli A:n talteenotto = 100 ± 60 %

Keskimääräinen interpoloitu Kontrolli B:n talteenotto = 100 ± 35 %

2. PCA3-ohjelmisto arvioi automaattisesti tulokset edellä mainittujen kriteerien mukaisesti ja ilmoittaa ajon tilaksi PASS (hyväksyty), jos validiteettikriteerit täyttyvät, ja FAIL (epäonnistui), jos validiteettikriteerit eivät täyty.
3. Jos ajon tila on FAIL (epäonnistui), kaikki saman ajon testitulokset ovat epävalideja tämän analyysin suhteen eikä niitä saa raportoida.
4. Jos ajo on epävalidi, ajo on toistettava tämän analyysin suhteen (ks. *Tulosten tulkinta*). Jos ajo on validi toisen analyysin suhteen, näitä tuloksia voidaan käyttää datan analyysissä ensimmäisen analyysin toistetun, validin ajon kanssa.

B. Näytteen validiteetti

Validiin ajoon saattaa sisältyä EPÄVALIDEIKSI katsottuja yksittäisiä näytetuloksia, jotka on tuotava esiin raakatulosten raportissa (ks. *Tulosten tulkinta*). Vaikka tietyn näytteen yksittäiset replikaatit voivat olla valideja, näyte todetaan epävalidiksi, jos replikaattien välinen interpoloitu kopioita/ml-ero ylittää 600 %. Näytteen testaus täytyy toistaa tämän analyysin suhteen.

Tulosten tulkinta

A. Raporttityypit

1. Raakatulosten raportti

Raakatulosten raportti antaa tietoja ajon validiteetista (PASS (hyväksytty) tai FAIL (epäonnistui); ks. *Laadunvalvonta*) ja yksittäisistä reaktioputkista, jotka on testattu Progensa PCA3 -määrityksellä. Jos ajo on epävalidi (FAIL (epäonnistui)), kaikki putket tässä ajossa merkitään epävalideiksi. Yksittäisiä putkia voidaan kuitenkin pitää epävalideina validin ajon sisällä (PASS (hyväksytty)). Määritysten suoritus peräkkäin -ajojen tapauksessa (eli sekä PCA3- että PSA-analyytit testataan samassa määritysajossa) yksi analyyttiajo voi olla epävalidi samalla kun toinen analyyttiajo on validi.

Raakatulosten raportin lopussa on yhteenveto poikkeuksista. Määritysten suoritus peräkkäin -ajoissa, joissa molemmat analyyttiajot ovat valideja, näytteet, jotka on lueteltu yhteenvedossa poikkeuksista, voivat vaatia yhden analyytin uudelleen testauksen. Vaikka PCA3 Score -tulos voidaan luetella yhteenvedossa poikkeuksista, tätä tulosta ei pidetä raportoitavana, ennen kuin manuaalinen täsmäytys on suoritettu ja tulos luetellaan suhderaportissa. Jos vain yksi analyytti testattiin tai jos yksi analyyttiajo on epävalidi, kaikki testatut näytteet luetellaan yhteenvedossa poikkeuksista.

2. Suhderaportti

Määrittäsohjelmisto tuottaa automaattisesti suhderaportin määritysten suoritus peräkkäin -ajolle, jossa molemmat analyyttiajot ovat valideja. Ohjelmisto laskee ja esittää luettelona näytteiden PCA3 Scoren suhderaportissa. Suhderaportissa luetellut näytteet joko eivät tarvitse lisätestausta tai molemmat analyytit on testattava uudelleen. Näytteet, joita ei luetella suhderaportissa, löytyvät raakatulosten raportin osassa yhteenveto poikkeuksista.

Suhderaportti voidaan tuottaa myös manuaalisen täsmäytyksen jälkeen (lisätietoja, ks. *Manuaalinen täsmäytys*).

3. QC-raportti (laadunvalvontaraportti)

QC-raportti esittää luettelona määritysajon validiteettikriteerit, määrättyt ja interpoloidut pitoisuudet ja kalibraattorien ja kontrollien talteenotot. Raportti esittää myös luettelona parametrit, jotka määrittävät neljän parametrin logistisen annosvastekalibraatiokäyrän (3). Lisätietoja, ks. *Progensa PCA3-määrittäsohjelmiston käyttäjän opas*.

B. Täsmäytys

1. Automaattinen täsmäytys

Määritysten suoritus peräkkäin -ajoissa, joissa molemmat analyyttiajot ovat valideja, ohjelmisto täsmäyttää automaattisesti näytteiden yksittäiset PCA3- ja PSA-analyyttitulokset ja määrittää PCA3 Scoren (jos se on laskettavissa). Tulokset luetellaan suhderaportissa tai raakatulosten raportin osassa yhteenveto poikkeuksista.

2. Manuaalinen täsmäytys

Kun PCA3- ja PSA-analyytit testataan eri ajoissa, ohjelmisto ei voi automaattisesti määrittää PCA3 Scorea. Analyyttitulosten manuaalinen täsmäytys on välttämätöntä PCA3 Scoren tai PCA3 Score -alueen määrittämiseksi (ks. *Pikaopas* tai *Progensa PCA3 -määrittäsohjelmiston käyttäjän opas*). Manuaalinen täsmäytys voi olla tarpeen myös tuloksille, jotka luetellaan raakatulosten raportin osassa yhteenveto

poikkeuksista. Manuaalisen täsmäytyksen jälkeen täsmäytettyjen näytteiden PCA3 Score(t) luetellaan uudessa suhderaportissa.

C. Tulosten tulkinta

1. PCA3 Score

Huomautus: Vain PCA3 Scoret ja PCA3 Score -alueet, jotka on lueteltu suhderaportissa, ovat raportoitavissa. Tulokset, jotka näkyvät yhteenvedossa poikkeuksista, voivat tarvita lisätoimia eivätkä ne ole raportoitavissa.

PCA3 Score lasketaan PCA3-RNA-kopioiden ja PSA-RNA-kopioiden välisenä suhteena, kerrottuna 1 000:lla. PCA3 Score -luvut voidaan laskea vain käyttämällä valideista ajoista ja näytteistä saatuja tuloksia. Epävalidit ajot ja epävalidit näytteet on testattava uudelleen vastaavan analyysin suhteen (lisätietoja, ks. *Uudelleen testaus*).

Jos raportoitu PCA3 Score on raja-arvon alapuolella, tulos on tulkittava NEGATIIVISEKSI. Jos PCA3 Score on vähintään raja-arvon suuruinen, tulos on tulkittava POSITIIVISEKSI. Laboratoriopäällikkö asettaa raja-arvon (lisätietoja, ks. *Suorituskyvyn ominaisuudet*).

Joissakin olosuhteissa on annettu PCA3 Score -alue ($>[\text{Laskettu PCA3 Score}]$ tai $<[\text{Laskettu Score}]$). Jos $<[\text{Laskettu PCA3 Score}]$ on pienempi kuin raja-arvo, tulos on tulkittava NEGATIIVISEKSI. Jos $>[\text{Laskettu PCA3 Score}]$ on suurempi kuin raja-arvo, tulos on tulkittava POSITIIVISEKSI. Jos tarvitaan numeerinen arvo, näytteen laimentaminen ja uudelleen testaus voi PCA3 Score -alueen sijasta tuottaa PCA3 Scoren (ks. *Uudelleen testaus – Vaihteluvälin ulkopuolella olevien korkeiden näytteiden laimentaminen*).

2. Tila- ja analyysikoodien tulkinta

Tila-sarake sekä raakatulosten raportissa että suhderaportissa luettelee tiedot formaatissa "s:a". Ajospesifiset tilakoodit ("s") luetellaan ennen kaksoispistettä (vasemmalla) ja analyttispesifiset analyysikoodit ("a") luetellaan kaksoispisteen jälkeen (oikealla). Analyttispesifiset koodit luetellaan pienillä kirjaimilla PCA3-tuloksille ja isoilla kirjaimilla PSA-tuloksille. Kukin raportti sisältää kuvaukset tila- ja analyysikoodeista, jotka ovat tässä raportissa. Koodeilla voidaan esimerkiksi osoittaa, että näyte tai replikaattitulos on validi tai vaihteluvälin ulkopuolella. Ks. *Pikaopas* tai *Progenssa PCA3 -määritysohjelmiston käyttäjän opas*, joissa on tila- ja analyysikoodien koko luettelo ja lisää yksityiskohtia.

Jos suhderaporttiin on merkitty PCA3 Score eikä PCA3:n tai PSA:n tilasarakkeissa näy tila- eikä analyysikoodeja, tarkoittaa se, että kumpikin analyysi on validi ja "vaihteluvälin sisällä". Näytetulos on raportoitavissa eikä lisätoimiin tarvitse ryhtyä.

Jos tila- tai analyysikoodi on yhteenvedossa poikkeuksista tai suhderaportissa, testaus on mahdollisesti uusittava (ks. *Tulosten tulkinta yhteenvedossa poikkeuksista* ja *Tulosten tulkinta suhderaportissa*). Jos analyysitulokset ovat peräisin eri ajoista ja niillä on analyysikoodi(t), hae kummankin analyysin yhdistelmä taulukoista Taulukko 4 tai Taulukko 5 päättääksesi jatkotoimien tarpeellisuudesta.

Huomautus: Tila- tai analyysikoodin läsnäolo ei tarkoita automaattisesti, että uusi testaus on tarpeen.

3. Tulosten tulkinta yhteenvedossa poikkeuksista

Yhteenvedo poikkeuksista ei kenties luettele yhtään poikkeusta. Näissä tapauksissa jatkotoimiin ei tarvitse ryhtyä.

Jos yhteenvedo poikkeuksista luettelee määritysten suoritus peräkkäin -ajojen näytteen (näytteitä), jonka molemmat analyyttiajot ovat valideja, ks. ohjeet taulukosta Taulukko 4.

Yksittäiset analyyttiajot, ks. *Tila- ja analyysikoodien tulkinta*. Jos määritysten suoritus peräkkäin -ajojen yksi analyyttiajo on epävalidi, testaa epävalidi ajo uudelleen (lisätietoja, ks. *Uudelleen testaus*) ja käsittele tuloksia ikään kuin suoritettujen analyyttiajot olisivat yksittäisiä. Manuaalinen täsmäytys voi olla tarpeen.

Näyte voidaan merkitä epävalidiksi, vaikka yksittäiset putket (replikaatit) voidaan merkitä valideiksi. Näytteen validiteetin määrää replikaattien kokonaistulos ja suuri ero replikaattien välillä tekee näytteestä epävalidin (lisätietoja, ks. *Laadunvalvonta*).

Taulukko 4: Progensa PCA3 -määrityksen yhteenvedon poikkeuksista olosuhteet

PCA3-tulos (Analyysikoodi*)	PSA-tulos (Analyysikoodi*)	Lueteltu PCA3 Score	Lisätestaus?	Toimenpide/kommentti
Vaihteluvälin sisällä (ei koodia)	Epävalidi** (A, B, E, H tai I)	--	Kyllä	Testaa PSA uudelleen (ks. <i>Uudelleen testaus</i>) ja täsmäytä tulokset manuaalisesti.
Alhainen ja vaihteluvälin ulkopuolella (g)	Epävalidi (A, B, E, H tai I)	--	Kyllä	Testaa PSA uudelleen (ks. <i>Uudelleen testaus</i>) ja täsmäytä tulokset manuaalisesti.
Epävalidi (a, b, e, h tai i)	Vaihteluvälin sisällä (ei koodia)	--	Kyllä	Testaa PCA3 uudelleen (ks. <i>Uudelleen testaus</i>) ja täsmäytä tulokset manuaalisesti.
Vaihteluvälin sisällä (ei koodia)	Korkea ja vaihteluvälin ulkopuolella (F)	<[Laskettu PCA3 Score]**	Valinnainen	1. Täsmäytä manuaalisesti saadaksesi <[Laskettu PCA3 Score] TAI 2. Laimenna näyte näytteen laimentimeen (ks. <i>Vaihteluvälin ulkopuolella olevien korkeiden näytteiden laimentaminen</i>), testaa PSA uudelleen ja täsmäytä tulokset manuaalisesti, jos PCA3 Score on tarpeen.
Korkea ja vaihteluvälin ulkopuolella (f)	Vaihteluvälin sisällä (ei koodia)	>[Laskettu PCA3 Score]	Valinnainen	1. Täsmäytä manuaalisesti saadaksesi >[Laskettu PCA3 Score] TAI 2. Laimenna näyte näytteen laimentimeen, testaa PCA3 uudelleen ja täsmäytä tulokset manuaalisesti, jos PCA3 Score on tarpeen.
Alhainen ja vaihteluvälin ulkopuolella (g)	Vaihteluvälin sisällä (ei koodia)	<[Laskettu PCA3 Score]	Ei	Täsmäytä manuaalisesti saadaksesi <[Laskettu PCA3 Score].
Alhainen ja vaihteluvälin ulkopuolella (g)	Korkea ja vaihteluvälin ulkopuolella (F)	<[Laskettu PCA3 Score]	Ei	Täsmäytä manuaalisesti saadaksesi <[Laskettu PCA3 Score].

*Analyysikoodien täydellinen luettelo löytyy *Progensa PCA3 -määritysohjelmiston käyttäjän oppaasta*.

**Koskee vain epävalideja näytteitä validin ajon sisällä.

***Vaihteluvälin ulkopuolisille arvoille laskettu PCA3 Score on laskettu käyttämällä lähimmän positiivisen kalibraattorin kopiomäärää.

4. Tulosten tulkinta suhderaportissa

Jos näyte luetellaan suhderaportissa PCA3 Scoren kanssa, tulos on raportoitavissa oleva PCA3 Score eikä jatkotoimiin tarvitse ryhtyä. Jos PCA3 Scorea ei ole lueteltu, eli PCA3 Score -sarakeessa on "--", katso ohjeita osasta Taulukko 5.

Taulukko 5: Progensa PCA3 -määrityksen suhderaportin olosuhteet

PCA3-tulos (Analyysikoodi*)	PSA-tulos (Analyysikoodi*)	Lueteltu PCA3 Score	Lisätestaus?	Toimenpide/kommentti
Vaihteluvälin sisällä (ei koodia)	Vaihteluvälin sisällä (ei koodia)	PCA3 Score	Ei	Ei lisätoimia; tulos on raportoitavissa.
Epävalidi** (a, b, e, h tai i)	Epävalidi (A, B, E, H tai I)	--	Kyllä	Testaa molemmat analyytit uudelleen (ks. <i>Uudelleen testaus</i>).
Epävalidi (a, b, e, h tai i)	Korkea ja vaihteluvälin ulkopuolella (F)	--	Kyllä	Laimenna näyte näytteen laimentimeen (ks. <i>Vaihteluvälin ulkopuolella olevien korkeiden näytteiden laimentaminen</i>), testaa uudelleen molemmat analyytit.
Korkea ja vaihteluvälin ulkopuolella (f)	Epävalidi (A, B, E, H tai I)	--	Kyllä	Laimenna näyte näytteen laimentimeen, testaa uudelleen molemmat analyytit.
Korkea ja vaihteluvälin ulkopuolella (f)	Korkea ja vaihteluvälin ulkopuolella (F)	--	Kyllä	Laimenna näyte näytteen laimentimeen, testaa uudelleen molemmat analyytit.
Epävalidi (a, b, e, h tai i)	Alhainen ja vaihteluvälin ulkopuolella (G)	--	Ei	Näytteessä ei ole riittävästi RNA:ta tarkkaa analyysiä varten. Potilaasta on kerättävä uusi näyte.
Vaihteluvälin sisällä (ei koodia)	Alhainen ja vaihteluvälin ulkopuolella (G)	--	Ei	Näytteessä ei ole riittävästi RNA:ta tarkkaa analyysiä varten. Potilaasta on kerättävä uusi näyte.
Korkea ja vaihteluvälin ulkopuolella (f)	Alhainen ja vaihteluvälin ulkopuolella (G)	--	Ei	Näytteessä ei ole riittävästi RNA:ta tarkkaa analyysiä varten. Potilaasta on kerättävä uusi näyte.
Alhainen ja vaihteluvälin ulkopuolella (g)	Alhainen ja vaihteluvälin ulkopuolella (G)	--	Ei	Näytteessä ei ole riittävästi RNA:ta tarkkaa analyysiä varten. Potilaasta on kerättävä uusi näyte.

*Analyysikoodien täydellinen luettelo löytyy Progensa PCA3 -määritysohjelmiston käyttäjän oppaasta.

**Koskee vain epävalideja näytteitä validin ajon sisällä. Jos näytteet olivat epävalideja, koska ajo oli epävalidi, tulokset luetellaan yhteenvedossa poikkeuksista (lisätietoja, ks. Tulosten tulkinta yhteenvedossa poikkeuksista).

D. Uudelleen testaus

1. Ohjeita uudelleen testausta varten

- a. Vaikka ei olekaan välttämätöntä, että molemmat analyytit testataan samassa ajossa, **molempien analyyttitulosten on tultava samasta näytepullosta, jotta PCA3 Score olisi raportoitavissa.**
- b. Kaikki epävalidit ajot on toistettava ja kaikki valideista ajoista peräisin olevat epävalidit näytteet on testattava uudelleen.
- c. Testaa näyte (näytteet) uudelleen käyttämällä uutta kalibraattori- ja kontrollisettiä.
- d. On välttämätöntä, että jäljelle jäänyt näyte säilytetään oikein ennen uudelleen testausta (lisätietoja, ks. *Näytteen kerääminen, kuljetus ja säilytys*).
- e. PCA3- ja PSA-analyyttien täsmäytys manuaalisesti voi olla välttämätöntä PCA3 Scoren määrittämiseksi (lisätietoja, ks. *Manuaalinen täsmäytys*).

2. Vaihteluvälin ulkopuolella olevien korkeiden näytteiden laimentaminen

- a. Jos näytteen pitoisuus ekstrapoloidaan kalibraattori 5:n yläpuolelle validin ajon sisällä, tulos on ”korkea ja vaihteluvälin ulkopuolella” ja tulos merkitään analyysikoodilla ”F” tai ”F” ajoraportissa (ajoraporteissa). Pitoisuus ilmaistaan >[kalibraattori 5:n pitoisuus].
- b. Käännä prosessoitu virtsanäyte ylösalaisin sen sekoittamiseksi ennen näytteen laimentamista. Suositeltu, mutta ei pakollinen, laimennoskerroin Progensa PCA3 näytteen laimennin -tarvikesarjaa (Specimen Diluent Kit) käyttäen on 1:10. Valitse sopiva pullo ja lisää 1 800 µl näytteen laimenninta ja 200 µl näytettä; sulje putken korkki ja sekoita perusteellisesti kääntämällä viisi kertaa ylösalaisin. Laimennoskerroin on ”10” ajon työlistassa. Jos molemmat analyytit on tarkoitus testata uudelleen, käytä kaksinkertaisia tilavuuksia (käytä 3 600 µl näytteen laimenninta ja 400 µl näytettä). Katso Progensa PCA3 näytteen laimennin -tarvikesarjan pakkausseloste. Testaa laimennettu näyte määrittäksessä.
- c. Jos uudelleen testauksen jälkeen näytteen tulos on taas korkea ja vaihteluvälin ulkopuolella, on tarpeen tehdä lisälaimennoksia kunnes näytteen tulos interpoloituu kalibraattorien vaihteluvälien sisälle. Alkuperäisen 1:10-laimennoksen jatkolaimennos on sallittua, edellyttäen että alkuperäistä 1:10-laimennosta on säilytetty oikein (lisätietoja, ks. *Näytteen kerääminen, kuljetus ja säilytys*).

Rajoitukset

- A. Progensä PCA3 -määrittystä ei saa käyttää potilaiden tapauksessa, jotka ottavat lääkkeitä, joiden tiedetään vaikuttavan seerumin PSA-määriin, kuten finasteridi (Proscar, Propecia), dutasteridi (Avodart), ja jotka saavat antiandrogeenihoitoa (Lupron). Näiden lääkkeiden vaikutusta PCA3-geenin ilmentymiseen ei ole vielä arvioitu.
- B. Tiedetyt terapeuttiset ja diagnostiset menetelmät kuten prostatektomia, säteilytys, eturauhasen biopsia ja muut voivat vaikuttaa eturauhaskudoksen viabiliteettiin ja täten vaikuttaa PCA3 Scoreen. Näiden menetelmien vaikutusta määrittelyn suorituskykyyn ei ole vielä arvioitu. Näytteet PCA3-testausta varten on kerättävä, kun klinikko uskoo eturauhaskudoksen palautuneen.
- C. Progensä PCA3 -määrittystä saa käyttää vain menetelmän käyttöön koulutettu henkilöstö. Tässä selosteessa annettujen ohjeiden noudattamatta jättäminen saattaa johtaa virheellisiin tuloksiin.
- D. Kunkin laboratorion on validoitava LIS-siirtoprosessi itsenäisesti.
- E. Tuloksien luotettavuus riippuu siitä, miten asianmukaista virtsanäytteen keruu on. Koska Progensä PCA3 -määrittelyssä käytettävä siirtojärjestelmä ei mahdollista virtsanäytteen adekvaattisuuden mikroskooppista arviointia, klinikot täytyy kouluttaa keräämään virtsanäytteet kunnon tekniikoilla. Katso *Näytteen kerääminen, kuljetus ja säilytys*. Yksityiskohtaisia tietoja saat Progensä PCA3 Urine Specimen Transport -tarvikesarjan pakkausselosteesta.
- F. Progensä PCA3 -määrittelystä saadut tulokset on tulkittava yhdessä muiden klinikon saatavilla olevien laboratorio- ja kliinisten tulosten kanssa. (Testituloksiin voivat vaikuttaa näytteen kerääminen väärin, tekninen virhe tai näytteiden sekoittuminen.)

Suorituskyvyn ominaisuudet

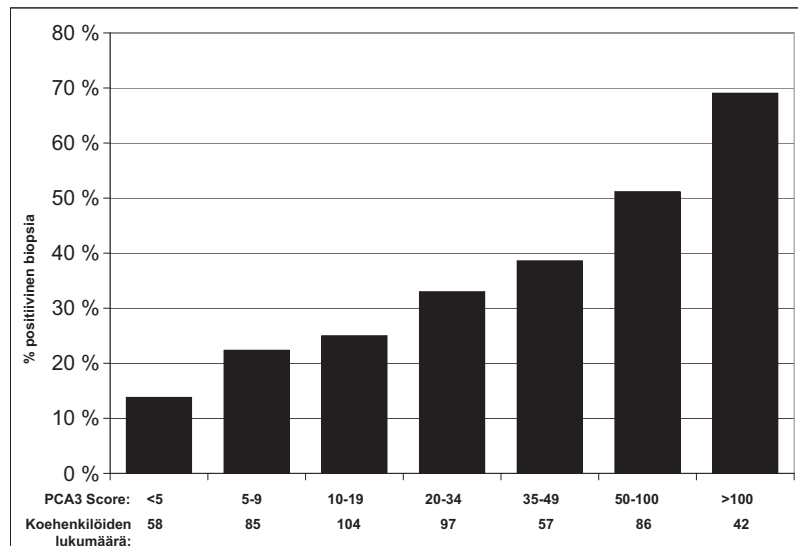
A. Kliiniset tulokset

1. Diagnostinen herkkyys ja spesifisyys

Progensa PCA3 -määrityksen suorituskyvyn ominaisuudet määritettiin käyttämällä sellaisilta koehenkilöiltä saatuja näytteitä, jotka olivat tulleet mukaan tutkimukseen neljässä maantieteellisesti erilaisessa Pohjois-Amerikan kliinisessä tutkimuskeskuksessa. Koehenkilöiden populaatio käsitti 529 miestä, joille oli määrä tehdä eturauhasen biopsia. Koehenkilöiden demografiset tiedot annetaan alla:

- Keskimääräinen ikä \pm keskihajonta = 64 ± 8 vuotta (mediaani 63, vaihteluväli 32–89)
- Keskimääräinen seerumin PSA-määrä = $7,9 \pm 21,9$ $\mu\text{g/l}$ (5,6, 0,3–484)
- Keskimääräinen eturauhasen tilavuus (määritetty transrektaalilla ultraäänitutkimuksella) = 44 ± 25 kuutiosenttimetriä (39, 5–225)
- 34 % (180/529) biopsiapositiivinen eturauhassyövän suhteen

Kuva 3 esittää PCA3 Scoren korrelaation positiivisen biopsian todennäköisyyden kanssa. Kun PCA3 Score kohosi, syöpäpositiivisen biopsian esiintymistiheys koehenkilöissä kohosi.



Kuva 3. PCA3 Scoren korrelaatio positiivisen biopsian todennäköisyyden kanssa

Receiver operating characteristic (ROC) -analyysi suoritettiin CLSI GP10-A:n mukaisesti (1995) käyttäen referenssimenetelmänä eturauhasen biopsiaa (4). Progensa PCA3 -määritykselle käyrän alapuolelle jäävä pinta-ala (AUC) oli 0,685 (95 % luottamusraja = 0,637–0,733). Taulukko 6 esittää diagnostisen herkkyuden ja spesifisyyden eri PCA3 Score raja-arvoilla. Kunkin laboratorion on määritettävä diagnostisen herkkyuden tai spesifisyyden raja-arvo (ks. *Tulosten tulkinta*).

Taulukko 6: Progensa PCA3 -määrityksen diagnostinen herkkyys ja spesifisyys eri PCA3 Score raja-arvoilla

PCA3 Score raja-arvo	5	10	15	25	35	50	95
Herkkyys	96 %	85 %	77 %	63 %	53 %	41 %	17 %
Spesifisyys	14 %	33 %	47 %	61 %	74 %	84 %	95 %

2. Näytteen stabiiliutta koskevat tutkimukset

- a. Stabiilius kokovirtsassa: Ensivirtsa kerättiin 10 koehenkilöstä ja säilytettiin 2 °C–8 °C:n lämpötilassa tai 30 °C:n lämpötilassa ennen kuin se prosessoitiin lisäämällä se virtsan siirtoliuokseen (UTM). Lämpötilassa 2 °C–8 °C joissakin näytteissä havaittiin 4 tunnin kuluttua merkitsevää PCA3- ja PSA-RNA:n hajoamista. Niinpä kokovirtsa on käsiteltävä 4 tunnin sisällä. 30 °C:n lämpötilassa merkittävää hajoamista havaittiin alle 1 tunnissa. Niinpä kokovirtsa on aina jäähdytettävä tai pidettävä jäissä ennen prosessointia.
- b. Stabiilius prosessoidussa virtsassa: Kahtatoista näytettä inkuboitiin lämpötilassa 4 °C tai 30 °C korkeintaan 38 päivän ajan. Lämpötilassa 4 °C PCA3- ja PSA-RNA olivat stabiileja 21 päivän ajan; 30 °C:ssa 5 päivää. Lämpötiloissa -20 °C ja -70 °C säilytettyjen näytteiden PCA3- ja PSA-RNA on osoittautunut stabiiliksi korkeintaan 90 päivän ajan.
- c. Pakastus-sulatus-stabiilius: Näytteitä kierrätettiin lämpötiloissa 37 °C ja -70 °C 6 kertaa. PCA3- tai PSA-RNA:n kopiomäärien ei havaittu vähenevän.

B. Analyttiset tulokset

1. Analyttinen herkkyys

Määrityksen herkkyyttä arvioitiin käyttämällä analyttistä herkkyyspaneelia, joka käsitti laimennetun *in vitro* -RNA-transkriptiotuotteen. Yksi käyttäjä testasi paneelin ajamalla viisi replikaattia kaksitoista kertaa, käyttämällä yhtä reagenssierää. Havaitsemisraja ja kvantifiointiraja laskettiin CLSI EP17-A:n mukaisesti (2004) (5). Havaitsemisraja PCA3-analyyttille oli 80 kopiota/ml, ja PSA-analyyttille se oli 1 438 kopiota/ml. Molempien analyttien kvantifiointiraja oli kalibraattori 2.

2. Analyttinen spesifisyys

- a. Silmukoitumaton transkriptiotuote: Progensa PCA3 -määritys on suunniteltu vain eturauhassyövälle spesifisen eksoni 3 -eksoni 4 -silmukoidun PCA3-RNA:n havaitsemiseen (2). Määritys ei havainnut silmukoitumattoman PCA3-RNA:n määrän 1 miljoona kopiota/ml olevan merkitsevästi taustan yläpuolella.
- b. Virtsasta todetun PCA3-RNA:n eturauhasspesifisyys: Koehenkilöiltä (n = 97) radikaaliprostatektomian jälkeen saadut näytteet testattiin Progensa PCA3 -määrityksellä ja PCA3-RNA-määriä verrattiin koehenkilöiltä (n = 464) ennen biopsiaa saatuihin näytteisiin. Koehenkilöiltä prostatektomian jälkeen saatujen näytteiden PCA3-RNA:n mediaani kopiota/ml alitti määrityksen havaitsemisrajan, kun taas koehenkilöiltä ennen biopsiaa saatujen näytteiden PCA3-RNA:n mediaani oli 7 243 kopiota/ml. Nämä tulokset vahvistavat sen, että virtsassa esiintyvä PCA3-RNA on peräisin eturauhasesta.
- c. Kudosspesifisyys: Totaali-RNA uutettiin kahden ainutkertaisen miesluovuttajan kudoksista per kudostyyppi, lisättiin näytteen laimentimeen (10 ng per reaktio), ja testattiin Progensa PCA3 -määrityksessä. Osassa luetelluista kudostyypeistä ainoastaan eturauhaskudoksen PCA3-RNA oli havaitsemisrajan yläpuolella Taulukko 7.

Taulukko 7: PCA3-RNA-testatut miehen kudostyyppit

Kudostyyppi	
Virtsarakko (normaali)	Munuainen
Virtsarakko (tuumori)	Penis
Luumydin	Eturauhanen
Siemenjohdin	Rakkularauhanen
Lisäkives	Kives

- d. Häiritsevät aineet: Osassa Taulukko 8 luetellut aineet lisättiin miehestä saadun yhdistetyn prosessoidun virtsan alikvootteihin. Näytteet testattiin Progensa PCA3 -määrityksellä CLSI EP7-A2:n (2005) mukaisesti (6). Luetelluilla pitoisuuksilla ei havaittu määrityksen häiriintymistä.

Taulukko 8: Aineet, joista testattiin, häiritsevätkö ne Progensa PCA3 -määritystä

Terapeuttiset aineet		Terapeuttiset aineet, jatkoa	
Aine	Testipitoisuus	Aine	Testipitoisuus
Parasetamoli/kodeiini	5,34 µmol/l	Uroksatraali	30 mg/l
Atorvastatiini	25 mg/l	Doksatsosiini	1,33 µmol/l
Lisinopriili	0,74 µmol/l	Teratsosiini	7,8 µmol/l
Amlodipiini	245 µmol/l	Finasteridi	15 mg/l
Atenololi	37,6 µmol/l	Tamsulosiini	1,2 µg/l
Sulfasalatsiini	754 µmol/l	Metformiini	310 µmol/l
Esomepratsoli	120 mg/l	Sildenafilfiili	12,9 pmol/l
Allopurinoli	294 µmol/l	Sahapalmu	1 600 mg/l
Difenhydramiini	19,6 µmol/l	Seleeni	0,275 mg/l
Parasetamoli	1 324 µmol/l		
Asetyyilisalisyylihappo	3,62 mmol/l	Virtsan ainesosat	
Ibuprofeeni	2 425 µmol/l	Aine	Testipitoisuus
Furosemiidi	181 µmol/l	Virtsahappo	1,4 mmol/l
Siprofloksasiini	30,2 µmol/l	Hemoglobiini	2 g/l
Levakiini	48,6 µmol/l	Valkosolut	4,56 x 10 ⁷ solua/l
Doksisykliini	67,5 µmol/l	Punasolut	3,06 x 10 ⁷ solua/l
Fluoksetiinihydrokloridi	11,2 µmol/l	Albumiini	50 g/l
Flutamidi	1 500 mg/l	Bilirubiini (konjugoimaton)	342 g/l
Dutasteridi	1,5 mg/l	IgG	60 g/l

3. Ulkoinen tarkkuus (accuracy)

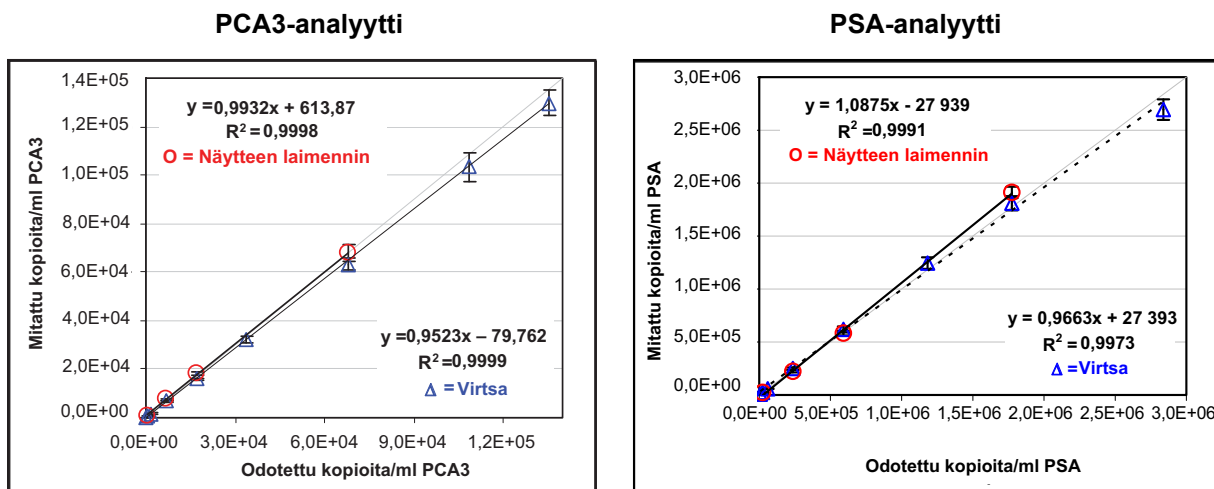
Progensa PCA3 -määrityksen ulkoinen tarkkuus arvioitiin CLSI EP15-A2:n mukaisesti (2005) (7). PCA3:n ja PSA:n RNA-transkriptiotuotteet kvantifioitiin UV-vis-spektrofotometrialla, lisättiin prosessoituun normaaliin naisen virtsaan (ei havaittavaa PCA3- tai PSA-RNA:ta) ja pitoisuudet mitattiin Progensa PCA3 -määrityksessä. Talteenottoprosentti (%) laskettiin mitatun kopioita/ml-arvon suhteesta lisättyyn kopioita/ml-arvoon kertomalla se sadalla.

Taulukko 9: Kopioiden talteenotto Progensa PCA3 -määrityksessä

Analyytti	Tunnettu pitoisuus, kopioita/ml	Mitattu pitoisuus, kopioita/ml	Talteenotto-prosentti
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. Lineaarisuus ja alue

Progensa PCA3 -määrityksen lineaarinen alue määritettiin CLSI EP6-A:n (2003) mukaisesti (8) lineaarisen regressioanalyysin perusteella (pienimmät neliösummat). Kaksi laimennossarjasettiä valmistettiin näytteistä, joiden sisältämät PCA3- ja PSA-RNA-pitoisuudet olivat suuria. Yksi setti laimennettiin prosessoituun naisen virtsaan ja toinen setti laimennettiin näytteen laimentimeen. Laimennokset kattoivat koko määrittämisalueen alhaisimmasta korkeimpaan positiiviseen kalibraattoriin kullekin analyyttille. Sekä PCA3- että PSA-analyytin määrittystulokset osoittivat testattujen laimennosten olevan suoraan verrannollisia analyytin kopioita/ml-pitoisuuteen. Merkittävää laimentimen matriisivaikutusta ei ollut. Katso Kuva 4.



Kuva 4. Progensa PCA3 -määrityksen lineaarisuus PCA3- ja PSA-analyyteille

5. Sisäinen tarkkuus ("precision")

Progensa PCA3 -määrityksen sisäinen tarkkuus määritettiin CLSI EP5-A2:n mukaisesti (2004) (9). Toistettavuus (repeatability) on sisäinen tarkkuus minimivaihtelevuuden olosuhteissa ja uusittavuus (reproducibility) on sisäinen tarkkuus maksimivaihtelevuuden olosuhteissa.

Toistettavuuden testaamiseksi valmistettiin 3-jäseninen testipaneeli, joka muodostui laimennetusta *in vitro* -RNA-transkriptiotuotteesta. Yksi käyttäjä yhdessä paikassa testasi paneelin ajamalla 5 replikaattia 20 kertaa 20 päivän aikana, käyttäen yksittäistä kalibraattoria ja kontrollierää, reagenssierää ja laitesettiä. Taulukko 10 esittää Progensa PCA3 -määrityksen toistotarkkuuden eri testipitoisuuksissa.

Taulukko 10: Progensa PCA3 -määrityksen toistettavuus

Analyytti	Paneeli Jäsen	Keskiarvo kopioita/ml	Toistettavuus SD	Toistettavuus 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 %

Uusittavuutta varten valmistettiin 8-jäseninen testipaneeli, joka käsitti yhdistetyt (pooled) näytteet (1–3) ja laimennettua *in vitro* -RNA-transkriptiotuotetta (4–8). Kolme operaattoria testasi paneelin 18 ajossa 3 päivän aikana, käyttämällä yksittäistä kalibraattori- ja kontrollierää, 3 reagenssierää ja 3 laitesettiä. Taulukot 11 ja 12 esittävät yhteenvetona Progensa PCA3 -määrityksen sisäisen tarkkuuden (precision) kokonaisuudessaan, ajon sisällä, ajojen välillä, operaattorien, laitteiden ja erien välillä muuttujille analyyttimäärä (kopioita/ml) ja PCA3 Score.

Ajon sisäinen, käyttäjien välinen ja ajojen välinen vaihtelevuus olivat laskevassa järjestyksessä suurimmat myötävaikuttajat määrityksen yleiseen varianssiin. Reagenssin erä ja laite näyttivät olevan vain vähäisiä myötävaikuttajia määrityksen yleiseen varianssiin. Nämä tulokset osoittavat, että Progensa PCA3 -määritys toimii uusittavasti ja vaihtelun päälähde on (ajon sisäinen) satunnaisvirhe.

Taulukko 11: Progensa PCA3-määrityksen uusittavuus: Kopio/ml-analyysi

Analyytti	Paneeli Jäsen	N	Mitattu kopioita/ml	Kokonais-CV	Ajon sisäinen CV	Ajojen välinen CV	CV, käyttäjien välinen	CV, laitteiden välinen	CV, erien välinen
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 %

Taulukko 12: Progensa PCA3 -määrityksen uusittavuus: PCA3 Score -analyysi

Paneeli Jäsen*	N	Keskimääräinen Score	Kokonais-CV	Ajon sisäinen CV	Ajojen välinen CV	CV, käyttäjien välinen	CV, laitteiden välinen	CV, erien välinen
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 %

*Paneelin jäsenet 4–6 sisälsivät vain PCA3:n tai PSA:n RNA-transkriptiotuotetta ja näin ollen niitä ei otettu mukaan tähän analyysiin.

Kirjallisuusluettelo

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

Asiakastuki: +1 800 442 9892
customersupport@hologic.com

Tekninen tuki: +1 888 484 4747
molecularsupport@hologic.com

Lisää yhteystietoja osoitteessa www.hologic.com.



Hologic N.V.
Da Vincilaan 5
1930 Zaventem
Belgium

Hologic, Aptima, DTS, Leader, Progensa, ja SB100 ovat tavaramerkkejä ja/tai rekisteröityjä tavaramerkkejä, jotka omistaa Hologic, Inc. ja/tai sen tytäryhtiöt Yhdysvalloissa ja/tai muissa maissa.
ependorf (tyylitelty) ja REPEATER ovat Eppendorf AG:n tavaramerkkejä.
RAININ on Rainin Instrument, LLC:n tavaramerkki.
TECAN ja FREEDOM EVO ovat Tecan Group AG:n tavaramerkkejä.

Muut tässä pakkauksen tuoteselosteessa mahdollisesti esiintyvät tavaramerkit ovat niiden vastaavien omistajiensa omaisuutta.

Tämä tuote voi olla suojattu yhdellä tai useammalla www.hologic.com/patents-sivustolla mainitulla US-patentilla.

©2006 – 2018 Hologic, Inc. Kaikki oikeudet pidätetään.

501377FI Rev 003

2018-03