

Progensa PCA3-analys

För *in vitro*-diagnostiskt bruk.

Endast för export från USA.

Allmän information	2
Avsedd användning	2
Sammanfattning och förklaring av analysen	2
Metodprinciper	2
Tillhandahållna reagenser och material	4
Material	8
Varningar och försiktighetsåtgärder	10
Förvarings- och hanteringskrav	12
Provtagning, -transport och -förvaring	13
Analysförfarande	15
Metodanmärkingar	20
Kvalitetskontrollförfaranden	24
Tolkning av resultat	25
Begränsningar	30
Prestandaegenskaper	31
Källförteckning	37

Allmän information

Avsedd användning

Progensa PCA3-analys är en *in vitro*-nukleinsyraamplifieringsanalys (NAAT) som detekterar prostatacancer-gen 3 (PCA3)-RNA (ribonukleinsyra) i urinprover från män för bestämning av PCA3 Score. PCA3 Score är avsett för användning tillsammans med vårdstandarddiagnostiska algoritmer som hjälp vid diagnos av prostatacancer.

Sammanfattning och förklaring av analysen

Användning av serumanalys av prostataspecifikt antigen (PSA) för prostatacancerscreening har resulterat i biopsidiagnos av mindre, tidigare upptäckta tumörer (1), och sålunda skapat ett nytt diagnostiskt dilemma: Endast en bråkdel av de män som har förhöjda serum-PSA-nivåer har påvisbar prostatacancer. Män med minst en negativ biopsi har ofta kvarstående förhöjt serum-PSA, främst p.g.a. förstörad prostata och godartad prostatahyperplasi (BPH). Det är dock så att en betydande andel män med något förhöjt serum-PSA (2,5-4,0 µg/L) har eller kommer att utveckla kliniskt signifikant prostatacancer (1). Även om biopsi fortfarande är den gyllene standarden för påvisande av prostatacancer, behövs noggrannare analyser med högre specificitet som vägledning vid beslut om huruvida prostatabiopsi ska utföras.

PCA3 (också kallat "PCA3^{DD3}" eller "DD3^{PCA3}") är ett icke-kodande, prostataspecifikt RNA som överuttrycks i prostatacancer-celler, med ett medianvärde på en 66-faldig uppreglering jämfört med omkringliggande godartad vävnad (2). Däremot är PSA-genuttrycket likartat i prostatacancer-celler och godartade prostata-celler; PSA-RNA-nivåer kan därför användas för att normalisera för mängden prostataspecifik ribonukleinsyra (RNA) i molekyllära analysprover. Lämpligheten av kvantitativ PCA3-baserad molekyllär analys av urinsediment (2) och helurin (3) har påvisats.

Vid Progensa PCA3-analys används helurin som samlats in efter prostatapalpation (DRE) vid vilken varje lob palperas tre gånger. Prostatapalpation medför utsöndring av prostata-celler genom prostatas gångsystem till urinvägarna, där de kan samlas in från förstaportionsurinen. Urinen behandlas genom tillsats av urintransportmedium (UTM), som lyserar cellerna och stabiliserar RNA. PCA3- och PSA-RNA kvantifieras och PCA3 Score fastställs baserat på kvoten PCA3-RNA/PSA-RNA. Förutom normalisering av PCA3-signalen, tjänar mätningen av PSA-RNA också till att bekräfta att utbytet av prostataspecifikt RNA är tillräckligt stort för att erhålla ett giltigt resultat. Högre PCA3 Score korrelerar med högre sannolikhet för en positiv prostatabiopsi.

Metodprinciper

Progensa PCA3-analys består av två kvantitativa nukleinsyraamplifieringsanalyser. Progensa PCA3-analys kombinerar teknikerna målinfångning, transkriptionsmedierad amplifiering (TMA) och hybridiserings-skyddsanalys (HPA) för att strömlinjeforma urinprovsbehandling, amplifiera mål-RNA samt detektera amplikon.

När Progensa PCA3-analys utförs i laboratoriet, isoleras mål-RNA-molekylerna från urinprovet genom målinfångning. Oligonukleotider ("infångningsoligonukleotider") som är komplementära till sekvensspecifika regioner hos målen hybridiseras till målen i urinprovet. För varje mål används en separat infångningsoligonukleotid. Det hybridiserade målet fångas sedan in på magnetiska mikropartiklar som sedan separeras från urinprovet i ett magnetfält.

Tvättsteg används för att avlägsna främmande komponenter från reaktionsröret. Magnetisk separation och tvättsteg utförs med ett målfångningssystem.

Målamplifiering sker via TMA, vilket är en transkriptionsbaserad nukleinsyreamplifieringsmetod som utnyttjar två enzymer, omvänt transkriptas från Moloney murint leukemivirus (MMLV) och T7-RNA-polymeras. En unik uppsättning primrar används för varje mål. Omvänt transkriptas används för att skapa en deoxyribonukleinsyrakopia (DNA-kopia) (innehållande en promotorsekvens för T7-RNA-polymeras) av målsekvensen. T7 RNA-polymeras producerar flera kopior av RNA-amplikon från DNA-mallen.

Detektion sker genom att HPA använder enkelsträngade, kemiluminiscensmärkta nukleinsyraprober som är komplementära till amplikonet. Separata prober används för varje målamplikon. De märkta nukleinsyraproberna hybridiserar specifikt till amplikonet. Selektionsreagenset differentierar mellan hybridiserade och icke hybridiserade prober genom att inaktivera märkningen på de icke hybridiserade proberna. I detekteringssteget mäts den kemiluminiscenssignal som avges av den hybridiserade proben i en luminometer och rapporteras som relativa ljusenheter (RLU).

PCA3- och PSA-RNA kvantifieras i separata rör och PCA3 Score bestäms. Kalibratorer som innehåller kända mängder PCA3- eller PSA-RNA-transkript inkluderas i varje analysomgång och användas för att skapa en standardkurva. PCA3- och PSA-kontroller inkluderas också för att verifiera noggrannheten hos de resultat som interpolerats från standardkurvan.

Tillhandahållna reagenser och material

Anteckning: Information om uttalanden om eventuella risker och försiktighetsåtgärder som kan förekomma i samband med reagenser finns i Safety Data Sheet Library (bibliotek med säkerhetsdatablad) på www.hologic.com/sds.

De reagenser och material som tillhandahålls i Progensa PCA3/PSA-analyssats för Progensa PCA3-analys listas nedan. Reagens-ID-symboler anges även bredvid respektive reagensnamn.

Progensa PCA3-analyssats, 2 x 100 reaktioner, art. nr 302355 (8 kartonger)**Progensa PCA3 100-reaktionssats**

Progensa PCA3 kyld kartong – Förvara vid 2 °C till 8 °C vid mottagandet fram till angivet utgångsdatum

Symbol	Komponent	Antal
A	PCA3-amplifieringsreagens <i>Ej smittförande nukleinsyror torkade i HEPES-buffrad lösning innehållande <10 % bulkmedel.</i>	1 ampull
E	PCA3/PSA-enzymreagens <i>Omvänt transkriptas och RNA-polymeras torkade i HEPES-buffrad lösning innehållande <10 % bulkmedel.</i>	1 ampull
P	PCA3-probreagens <i>Ej smittbärande kemiluminescenta DNA-prober torkade i succinatbuffrad lösning innehållande <5 % bulkmedel och <5 % litiumlaurylsulfat.</i>	1 ampull

Progensa PCA3 rumstempererad kartong – Förvara vid 15 °C till 30 °C vid mottagandet fram till angivet utgångsdatum

Symbol	Komponent	Antal
AR	PCA3-amplifieringsrekonstitutionslösning <i>Vattenhaltig lösning innehållande konserveringsmedel (<1 % parabener).</i>	1 x 9,3 mL
ER	PCA3/PSA-enzymrekonstitutionslösning <i>HEPES-buffrad lösning innehållande ett ytaktivt ämne (10 % Triton X-100) och 20 % glycerol.</i>	1 x 3,3 mL
PR	PCA3/PSA-probrekonstitutionslösning <i>Succinatbuffrad lösning innehållande <5 % litiumlaurylsulfat.</i>	1 x 12,4 mL
S	PCA3/PSA-selektionsreagens <i>Boratbuffrad lösning innehållande ytaktivt ämne (1 % Triton X-100).</i>	1 x 31 mL
TCR	PCA3 Target Capture-reagens <i>Ej smittbärande nukleinsyra i HEPES-buffrad lösning innehållande fast fas.</i>	1 x 22 mL
	Förslutningskort	1 förpackning
	Rekonstitutionskragar	1 förpackning

Progensa PCA3-kalibrator- och kontrollsatser – Förvara vid 2 °C till 8 °C vid mottagandet fram till angivet utgångsdatum

Symbol	Komponent	Antal
KAL	PCA3-kalibrator 1 <i>Fosfatbuffrad lösning innehållande <5 % litiumlaurylsulfat.</i>	1 x 2,0 mL
KAL	PCA3-kalibratorer 2-5 <i>Ej smittbärande PCA3-nukleinsyra i fosfatbuffrad lösning innehållande <5 % litiumlaurylsulfat.</i>	4 x 1,7 mL
PC	PCA3 positiva kontroller <i>Ej smittbärande PCA3-nukleinsyra i fosfatbuffrad lösning innehållande <5 % litiumlaurylsulfat.</i>	2 x 1,7 mL
	Informationsblad om PCA3-koncentration	1 blad

Progensa PSA 100-reaktionssats

Progensa PSA kyld kartong – Förvara vid 2 °C till 8 °C vid mottagandet fram till angivet utgångsdatum

Symbol	Komponent	Antal
A	PSA-amplifieringsreagens <i>Ej smittförande nukleinsyror torkade i HEPES-buffrad lösning innehållande <10 % bulkmedel.</i>	1 ampull
E	PCA3/PSA-enzymreagens <i>Omvänt transkriptas och RNA-polymeras torkade i HEPES-buffrad lösning innehållande <10 % bulkmedel.</i>	1 ampull
P	PSA-probreagens <i>Ej smittbärande kemiluminescenta DNA-prober torkade i succinatbuffrad lösning innehållande <5 % bulkmedel och <5 % litiumlaurylsulfat.</i>	1 ampull

ProgenSA PSA rumstempererad kartong – Förvara vid 15 °C till 30 °C vid mottagandet fram till angivet utgångsdatum

Symbol	Komponent	Antal
AR	PSA-amplifieringsrekonstitutionslösning <i>Vattenhaltig lösning innehållande konserveringsmedel (<1 % parabener).</i>	1 x 9,3 mL
ER	PCA3/PSA-enzymrekonstitutionslösning <i>HEPES-buffrad lösning innehållande ett ytaktivt ämne (10 % Triton X-100) och 20 % glycerol.</i>	1 x 3,3 mL
PR	PCA3/PSA-probrekonstitutionslösning <i>Succinatbuffrad lösning innehållande <5 % litiumlaurylsulfat.</i>	1 x 12,4 mL
S	PCA3/PSA-selektionsreagens <i>Boratbuffrad lösning innehållande ytaktivt ämne (1 % Triton X-100).</i>	1 x 31 mL
TCR	PSA-Target Capture-reagens <i>Ej smittbärande nukleinsyra i HEPES-buffrad lösning innehållande fast fas.</i>	1 x 22 mL
	Förslutningskort	1 förpackning
	Rekonstitutionskragar	1 förpackning

ProgenSA PSA-kalibrator- och kontrollsats – Förvara vid 2 °C till 8 °C vid mottagandet fram till angivet utgångsdatum

Symbol	Komponent	Antal
KAL	PSA-kalibrator 1 <i>Fosfatbuffrad lösning innehållande <5 % litiumlaurylsulfat.</i>	1 x 2,0 mL
KAL	PSA-kalibratorer 2-5 <i>Ej smittbärande PSA-nukleinsyra i fosfatbuffrad lösning innehållande <5 % litiumlaurylsulfat.</i>	4 x 1,7 mL
PC	Positiva kontroller för PSA <i>Ej smittbärande PSA-nukleinsyra i fosfatbuffrad lösning innehållande <5 % litiumlaurylsulfat.</i>	2 x 1,7 mL
	Informationsblad om PSA-koncentration	1 blad

Aptima-analysvätskor – Förvara vid 15 °C till 30 °C (2 kartonger) vid mottagandet fram till angivet utgångsdatum

Symbol	Komponent	Antal
W	Tvättlösning <i>HEPES-buffrad lösning innehållande <2 % natriumdodecylsulfat.</i>	1 x 402 mL
DF	Buffert för deaktiveringsvätska <i>Bikarbonatbuffrad lösning.</i>	1 x 402 mL
O	Oljereagens <i>Silikonolja.</i>	1 x 24,6 mL

Anm. Allt material som ingår i Progensa PCA3-analysset kan också köpas separat (se avsnittet Material för utförlig information).

Material

Anteckning: Information om uttalanden om eventuella risker och försiktighetsåtgärder som kan förekomma i samband med reagenser finns i Safety Data Sheet Library (bibliotek med säkerhetsdatablad) på www.hologic.com/sds.

Anm. Material tillgängligt från Hologic anges med artikelnummer.

Material som krävs men som införskaffas separat

	<u>Art. nr.</u>
Progensa PCA3 transportsats för urinprover	302352
Leader HC+-luminometer	104747
Hologic Target Capture-system (TCS)	104555
Aptima Auto Detect-sats	301048
2 eppendorf-pipetter Repeater Plus	105725
Repetitionspipettspetsar (2,5 ml, 5,0 ml, 25,0 ml)	—
Antingen:	—
2 vortexblandare för flera rör	102160F
3 cirkulerande vattenbad (62 °C ± 1 °C, 42 °C ± 1 °C, 62 °C ± 1 °C)	104586F
3 avskiljare för vattenbad	104627
ELLER	
2 SB100 Dry Heat Bath/vortexblandare	105524F
Ytterligare SB100-instrument kan behövas för större volymer	
Mikropipett, 1 000 µL RAININ PR1000	901715
Spetsar, 1 000 µL P1000	105049
Eppendorfpipett, 20 till 200 µL	105726
Pipettspetsar, 20 till 200 µL	—
Blekmedel, 5 till 7 % (0,7 till 1,0 M) natriumhypokloritlösning	—
Plastbehållare med stort lock	—
Urinprovbehållare av standardtyp, utan konserveringsmedel	—
Enheter med 10 rör (TTU)	TU0022
Kassetter med tio spetsar (TTC)	104578
SysCheck-kalibreringsstandard	301078

Valfritt material

	<u>Art. nr.</u>
Progensa PCA3 100-reaktionssats	302354
Progensa PSA 100-reaktionssats	302357
Progensa PCA3-kalibrator- och kontrollsats	302353
Progensa PSA-kalibrator- och kontrollsats	302356

	<u>Art. nr.</u>
Progensa PCA3/PSA-kvalifikationspaneler	302350
Progensa PCA3-provutspädningssats	302351
Aptima-analysvätskesats	302002C
Pipettspetsar med filter, för engångsbruk (1 mL)	10612513 (Tecan)
TECAN Freedom EVO 100/4	900932
<i>PCA3 däckplattenshet, DTS 800</i>	902021
<i>Reagensbehållare (40 mL kvartsmodul)</i>	104765
<i>Delad reagensbehållare (19 mL x 2 kvartsmodul)</i>	901172
Transportrör	302521
Genomträngliga utbyteslock	302520
Ogenomträngliga utbyteslock	103036A

Varningar och försiktighetsåtgärder

- A. För *in vitro*-diagnostiskt bruk.
- B. Endast för export från USA.

Laboratorierelaterad information

- C. Använd endast tillhandahållet eller specificerat laboratoriemateriel för engångsbruk.
- D. Iaktta sedvanliga säkerhetsrutiner för laboratorier. Ät, drick och rök inte i områden som är avsedda för laboratoriearbete. Bär puderfria engångshandskar, skyddsglasögon och laboratorierock vid hantering av urinprover och satsreagenser. Tvätta händerna ordentligt efter hantering av urinprover och satsreagenser.
- E. **Varning: Irritanter och frätande medel.** Undvik hud-, ögon- och slemhinnekontakt med Auto Detect 1 och Auto Detect 2. Om dessa vätskor kommer i kontakt med huden eller ögonen ska de påverkade områdena tvättas med vatten. Om du spiller ut dessa vätskor, späder du spillet med vatten innan du torkar torrt.
- F. Arbetsytor, pipetter och annan utrustning måste regelbundet dekontamineras med 2,5 till 3,5 % (0,35 till 0,5 M) natriumhypokloritlösning (se *Metodanmärkning*).
- G. Ett separat ställe för post-amplifiering rekommenderas starkt för att minimera amplikonkontamination av analysen. Detta separata ställe ska vara avskilt från pre-amplifieringsområdet, där reagensberedning, målinfångning och amplifiering utförs.
- H. För att minska risken för att laboratorieutrymmet förorenas med amplikon ska arbetsområdet ordnas så att arbetsflödet är enkelriktat från reagensförberedelse till och med post-amplifiering. Prover, utrustning och reagenser ska inte ställas tillbaka på det ställe där föregående steg utfördes. Personal ska inte heller gå tillbaka till föregående arbetsområde utan att vidta lämpliga skyddsåtgärder mot kontamination.

Provrelaterad information

- I. Efter urintillsats måste urinprovets vätskenivå i transportröret initialt ligga mellan de två svarta indikatorstrecken på rötetiketten. Annars måste provet underkännas.
- J. Upprätthåll korrekta förvaringsförhållanden vid transport av prover för att säkerställa provernas integritet. Provernas stabilitet under andra transportförhållanden än de som rekommenderas har inte utvärderats.
- K. Utgångsdatumerna som anges på provtagningsattsarna avser provtagningsplatsen och inte analysplatsen. Prover som samlats in vid tidpunkt före provtagningsattsens utgångsdatum, och som transporterats och förvarats i enlighet med bipacksedeln, är giltiga för analys även om utgångsdatumet för provtagningsröret har passerats.
- L. Förvara alla prover vid angivna temperaturer. Analysens prestanda kan påverkas om felaktigt förvarade prover används. Se *Provtagning, -transport och -förvaring* för specifika anvisningar.
- M. Urinprover kan vara smittförande. Använd allmänt vedertagna försiktighetsåtgärder vid utförande av denna analys. Metoder för korrekt hantering och kassering ska fastställas av laboratoriechefen. Endast kvalificerad personal med färdigheter i användningen av

ProgenSA PCA3-analys och som har lämplig utbildning i hantering av smittförande material ska utföra detta förfarande.

- N. Undvik korskontamination under provhanteringen. Urinprover kan innehålla höga nivåer av mål-RNA. Se till att provbehållare inte kommer i kontakt med varandra och kassera använt material utan att förflytta det över öppna behållare. Om handskar kommer i kontakt med ett prov, ska nya handskar användas för att undvika korskontamination.

Analysrelaterad information

- O. Använd inte denna sats efter dess utgångsdatum.
- P. **När det gäller ProgenSA PCA3-analyssatsen får inte PCA3-analysreagens med olika partinummer bytas ut mot varandra, blandas eller kombineras** (dvs. för varje analyt måste analysreagenserna i den "kylda" kartongen och den "rumstempererade" kartongen komma från samma parti). Analysreagenserna kan användas med kalibratorer och kontrollsatser från olika partier. Aptima-analysvätskesatser är utbytbara sinsemellan. PCA3- och PSA-reagenssatser behöver inte matcha varandra.
- Q. Förvara alla analysreagenser vid angivna temperaturer. Analysens prestanda kan påverkas om felaktigt förvarade analysreagenser används. Se *Förvarings- och hanteringskrav* och *Metodanmärkningar* för specifika anvisningar.
- R. För analysdeaktivering (se *Analysförfarande*) måste natriumhypokloritlösningens koncentration vara minst 2,5 % (0,35 M) **efter** 1:1-spädning med deaktiveringsbuffert. Därför måste den ursprungliga natriumhypokloritlösningen vara på 5 till 7 % (0,7 till 1,0 M) för att uppnå den slutkoncentration som krävs för deaktivering.
- S. Spetsar med hydrofoba pluggar måste användas. Minst två repetitionspipetter måste reserveras för denna analys: den ena för att användas till pre-amplifieringsstegen och den andra för att användas till post-amplifieringsstegen. En separat mikropipett måste användas för provöverföring såvida inte ett TECAN Freedom EVO 100/4-instrument används. Alla pipetter måste rengöras regelbundet enligt beskrivning i *Metodanmärkningar*.
- T. När repetitionspipetter används för reagenstillats får pipettspetsen inte komma i kontakt med reaktionsröret, så att överföring från ett rör till ett annat undviks.
- U. Ordentlig blandning krävs för att erhålla korrekta analysresultat. För fullständig information, se *Metodanmärkningar*.
- V. Separata vattenbad för pre-amplifierings-, amplifierings- och post-amplifieringsstegen i analysen måste finnas.
- W. Vissa reagenser i denna sats är märkta med risk- och säkerhetssymboler enligt europadirektiv 1999/45/EC och ska hanteras i enlighet därmed. Materialäkerhetsdatablad finns på www.hologic.com och kan erhållas på begäran.

Förvarings- och hanteringskrav

A. Se Tabell 1 för information om reagensförvaring.

Tabell 1: Reagensförvaring

Reagens/Vätska	Förvaring oöppnade	Stabilitet öppnade/rekonstituerade (fram till utgångsdatum)
Amplifieringsreagenser	2 °C till 8 °C till utgångsdatumet	30 dagar vid 2 °C till 8 °C*
Probreagenser	2 °C till 8 °C till utgångsdatumet	30 dagar vid 2 °C till 8 °C*
Enzymreagens	2 °C till 8 °C till utgångsdatumet	30 dagar vid 2 °C till 8 °C*
Target Capture-reagenser	15 °C till 30 °C till utgångsdatumet	30 dagar vid 15 °C till 30 °C
Amplifieringsrekonstitutionslösning	2 °C till 30 °C till utgångsdatumet	Ej tillämpligt (engångsbruk)
Probrekonstitutionslösning	2 °C till 30 °C till utgångsdatumet	Ej tillämpligt (engångsbruk)
Enzymrekonstitutionslösning	2 °C till 30 °C till utgångsdatumet	Ej tillämpligt (engångsbruk)
Selektionsreagens	2 °C till 30 °C till utgångsdatumet	30 dagar vid 15 °C till 30 °C
Kalibratorer	2 °C till 8 °C till utgångsdatumet	Ej tillämpligt (enstaka analysomgång)
Kontroller	2 °C till 8 °C till utgångsdatumet	Ej tillämpligt (enstaka analysomgång)
Oljereagens	15 °C till 30 °C till utgångsdatumet	30 dagar vid 15 °C till 30 °C
Tvättlösning	15 °C till 30 °C till utgångsdatumet	30 dagar vid 15 °C till 30 °C
Buffert för deaktiveringsvätska	15 °C till 30 °C till utgångsdatumet	28 dagar vid 15 °C till 30 °C

*Kan återanvändas för andra analysomgångar upp till fyra gånger, under förutsättning att den totala tiden vid rumstemperatur inte överstiger 24 timmar.

B. Förvara inte Target Capture-reagens vid temperaturer under 15 °C.

C. Probreagens och rekonstituerad probreagens är ljuskänsliga. Skydda dessa reagenser från långvarig exponering för ljus vid förvaring och beredning för användning.

D. Frys inte reagensen.

E. Använd inte reagenser eller vätskor efter utgångsdatum.

F. Progensa PCA3- och PSA-kalibratorer och -kontroller är ampuller för enstaka analysomgångar och de måste kasseras efter användning.

G. Förändringar i de tillhandahållna reagensernas utseende kan vara tecken på instabilitet eller försämring av dessa material. Om förändringar i reagensernas utseende observeras efter resuspension (t.ex. uppenbara förändringar i reagensfärgen eller grumlighet som tyder på mikrobiell kontaminering), ska teknisk support på Hologic kontaktas före användning.

H. Kassera rekonstituerad reagens efter 30 dagar eller, om detta inträffar först, på utgångsdatumet.

I. Återstående öppnade eller rekonstituerade reagenser kan användas i ytterligare analyser om de har förvarats på rätt sätt efter den första användningen. Den återstående reagensen kan poolas med nyligen beredd eller annan återstående reagens i samma parti. **Byt inte ut, blanda eller kombinera reagenser från satser med olika partinummer (se Varningar och försiktighetsåtgärder).** Inga komponenter i de poolade reagenserna får överskrida förvaringsgränserna för de öppnade eller rekonstituerade reagenserna. Se till att den poolade reagensen har blandats ordentligt och att tillräckligt stor volym har beretts så att reagens finns för en hel analysomgång.

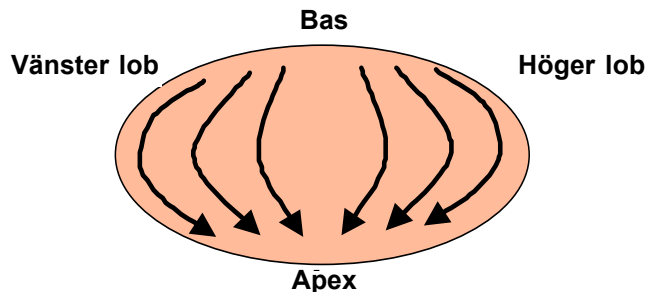
Provtagning, -transport och -förvaring

Progensa PCA3-analysen är avsedd att kvantifiera PCA3- och PSA-RNA i förstaportionsurin insamlad efter prostatapalpation vid vilken varje lob palperas tre gånger. Urinprov behandlas med Progensa PCA3 transportsats för urinprover. Stabiliteten hos PCA3- och PSA-RNA i urin och behandlad urin fastställdes genom övervakning av RNA-kopienivåerna i urinprover insamlade enligt anvisningarna nedan.

A. Anvisningar för urinprovtagning och -behandling:

1. Be patienten att dricka rikligt med vatten (cirka 500 mL) för att säkerställa tillräcklig urinmängd för provtagning.
2. Utför prostatapalpation enligt nedanstående beskrivning omedelbart före urinprovtagningen:

Palpera prostatan tillräckligt kraftigt så att ytan trycks in ca 1 cm, från basen till apex och från den laterala linjen till medianlinjen på varje lob enligt figur 1. Palpera varje lob exakt tre gånger. Detta är inte avsett som prostatamassage.



Figur 1. Korrekt riktning vid tryck mot prostatan

3. Efter prostatapalpationen anvisas patienten att lämna ca 20 till 30 mL förstaportionsurin i en lämplig märkt urinbägare. Detta måste vara den första kastade urinen efter prostatapalpationen. Använd en urinbägare helt fri från konserveringsmedel. Om en patient inte kan stoppa urinstrålen och lämna mer urin än 20 till 30 mL, ska all urin behållas. Om patientens inte kan lämna önskad urinvolymer, krävs åtminstone 2,5 mL för Progensa PCA3-analys. Annars måste provet underkännas.

Anm. Väldigt stora urinvolymer kan ge sänkta koncentrationer av PCA3- och PSA-analyter och kan ibland resultera i ogiltiga prov. Därför ska patienten försöka undvika att fylla urinbägaren.

4. **Obehandlade urinprover måste, om de inte omedelbart behandlas, förvaras vid 2 °C till 8 °C eller på is. Det kylda, obehandlade urinprovet måste överföras till transportröret för urinprover inom 4 timmar efter provtagningen. Annars måste provet kasseras och ett nytt prov samlas in. Frys inte obehandlade urinprover.**
5. För behandling av urinprover ska ett tätt lock sättas på och urinproverna inverteras 5 gånger för resuspendering av celler. Avlägsna locket på transportröret för urinprover och överför 2,5 mL av urinen till röret med hjälp av den tillhandahållna överföringspipetten för engångsbruk. Korrekt urinvolymer har tillsatts när vätskenivån ligger mellan de svarta påfyllningslinjerna på etiketten på transportröret för urinprover.
6. Sätt tillbaka locket på transportröret för urinprover ordentligt och invertera urinprovet 5 gånger för att blanda det. Detta kallas nu det behandlade urinprovet.

B. Transport och förvaring av prover före analys:

1. Behandlade urinprover måste transporteras till laboratoriet i transportröret för urinprov. De kan transporteras vid normala omgivningsförhållanden (utan temperaturkontroll) eller i fruset tillstånd. Transporten måste ske så att proverna med säkerhet når analysinrättningen inom 5 dagar efter provtagningen.

Vid mottagning av leveransen ska laboratoriet verifiera provtagningsdatumet på röret. Om proverna har transporterats vid normala omgivningsförhållanden och mottagits mer än 5 dagar efter provtagningen, måste provet kasseras och en ny provtagning begäras. Laboratoriet kan förvara prover vid 2 °C till 8 °C i upp till 14 dagar innan de måste kasseras. Om längre tidsperioder behövs, se Tabell 2 för tillåtna förvaringstider vid olika temperaturer.

Tabell 2: Förvaringstider för behandlade urinprover

Förvaringstemperatur	Tid
Förvaring och transport av behandlade prover:	Upp till 5 dagar*
Efter mottagning på analysinrättningen:	
2 °C till 8 °C	Upp till 14 dagar
-35 °C till -15 °C	Upp till 11 månader**
Vid eller under -65 °C	Upp till 36 månader**

*Tillåten tid för transport vid normala omgivningsförhållanden eller i fruset tillstånd.

**Tillåten tid efter kyld förvaring.

2. Behandlade urinprover kan utsättas för upp till 5 frysningar/upptiningar.

C. Provförvaring efter analys:

1. Prover som har analyserats måste förvaras stående i ett ställ.
2. Om transportrören för urinprover inte återförsluts med ett intakt lock, ska de täckas med en ny, ren plast- eller foliebarriär.
3. Om analyserade prover behöver frysas eller fraktas, ska de genomträngliga locken tas av, och nya, ogenomträngliga lock sättas på transportrören med urinproverna. Om prover måste skickas till ett annat laboratorium för analys måste de rekommenderade temperaturerna upprätthållas. **Undvik stänk och korskontamination.**

Anm. Prover måste skickas i enlighet med gällande nationella och internationella transportföreskrifter.

Analysförfarande

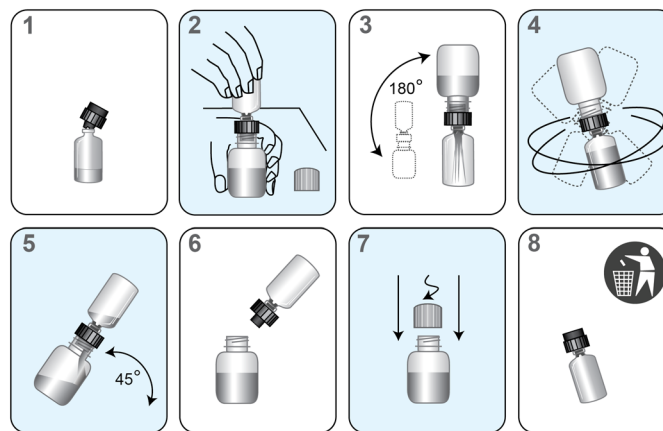
A. Förberedelse av arbetsyta

1. Ställ in ett vattenbad på $62\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ för pre-amplifiering, ett andra vattenbad på $42\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ för amplifiering och ett tredje vattenbad på $62\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ för post-amplifiering. Se till att vattenbaderna innehåller tillräckligt med vatten (se *Metodanmärkingar*). Om SB100 Dry Heat Bath/vortexblandare används, hänvisas till *Tillämpningsbladet för SB100 Dry Heat Bath/vortexblandare för Progensa PCA3-analys (Tillämpningsblad SB100)*.
2. Innan analysarbetet påbörjas ska arbetsytor och pipetter torkas av med 2,5 till 3,5 % (0,35 till 0,5 M) natriumhypokloritlösning. Låt natriumhypokloritlösningen vara i kontakt med ytorna och pipetterna i minst 1 minut och skölj sedan med vatten. Låt inte natriumhypokloritlösningen torka. Täck bänkytan där analysen ska utföras med rena, plastfodrade, absorberande laboratoriebänkskydd.
3. Sätt tillräckligt många tiospetskassetter i Target Capture-systemet (TCS). Se till att TCS-tvättflaskan är fylld med tvättlösning och att sugen är ansluten till vakuumpumpen. (Se *användarmanualen för Target Capture-systemet*.)

B. Reagensrekonstitution och -beredning

Reagensrekonstitution ska utföras innan man börjar överföra prover.

1. För att rekonstituera amplifierings-, enzym- och probreagenser, ska flaskorna med frystorkad reagens kombineras med rekonstitutionslösningen. Om rekonstitutionslösningarna är kylskåpskalla ska de få uppnå rumstemperatur före användning.



Figur 2. Rekonstitutionsprocess

- a. Para ihop korrekt rekonstitutionslösning och torkat reagens. Kontrollera att ampullernas etikettfärger matchar så att de paras ihop korrekt.
- b. Öppna ampullen med det torkade reagentet och sätt in rekonstitutionskragens skårade ände ordentligt i ampullöppningen (figur 2, steg 1).
- c. Öppna motsvarande rekonstitutionslösning och lägg locket på en ren, täckt arbetsyta. Håll lösningsflaskan på bänken och sätt samtidigt in rekonstitutionskragens andra ände ordentligt i flaskans öppning (figur 2, steg 2).
- d. Invertera långsamt de hopsatta flaskorna. Låt lösningen rinna ur flaskan ned i glasampullen (figur 2, steg 3). Vänta tills det frystorkade reagentet löses upp och

- virvla sedan försiktigt lösningen i glasampullen för att blanda. Undvik att skapa skum när flaskan virvlas (figur 2, steg 4).
- e. Invertera enheten med en lutning på 45° för att minimera skumning (figur 2, steg 5). Låt all vätska rinna tillbaka i plastflaskan.
 - f. Avlägsna rekonstitutionskragen och glasampullen (figur 2, steg 6).
 - g. Sätt tillbaka locket på plastflaskan (figur 2, steg 7). Notera operatörens initialer och rekonstitutionsdatumet på alla ampuller med rekonstituerad reagens. Var noga med att notera analyten (PCA3 eller PSA) på probreagensampullerna.
 - h. Kassera både rekonstitutionskragen och glasampullen (figur 2, steg 8).
2. Tidigare rekonstituerade prob-, amplifierings- och enzymreagenser måste uppnå rumstemperatur (15 °C till 30 °C) innan analysen påbörjas. Se *Förvarings- och hanteringskrav* vid poolning av överblivna reagenser. Om rekonstituerad amplifieringsreagens innehåller utfällning som inte löses upp vid rumstemperatur, ska den värmas vid 62 °C ± 1 °C i 1 till 2 minuter i pre-amplifieringsområdet. Om rekonstituerad probreagens innehåller utfällning som inte löses upp vid rumstemperatur, ska den värmas vid 62 °C ± 1 °C i 1 till 2 minuter i post-amplifieringsområdet. Efter dessa uppvärmningssteg kan de rekonstituerade reagenserna användas även om restutfällning kvarstår. Efter resuspendering ska ampullerna blandas genom försiktig inversion.

C. Förberedelse av ställ

Repetitionspipetten som används vid målinfångning, provöverföring och amplifiering ska endast användas i dessa steg (se *Varningar och försiktighetsåtgärder*).

1. Iordningställ ett ställ för PCA3-analyten och ett annat ställ för PSA-analyten.

Anm. Om antalet prover är tillräckligt litet, kan båda analyterna testas i samma ställ. Om TECAN Freedom EVO 100/4-instrumentet används, måste separata provställ användas för varje analyt. Inte fler än två fulla provställ (20 TTU:er) i taget kan analyseras.

2. I tiorörsenhetens (TTU:ns) ställ placeras tillräckligt antal TTU:er för kalibratorerna, kontrollerna och proverna för varje analyt.
3. Märk TTU:erna med prov-ID. I Tabell 3 beskrivs tillsats av kalibratorerna, kontrollerna och proverna. Starta PSA-kalibratorerna på en ny TTU.

Anm. Kalibratörer ska köras i vardera tre replikat, och kontroller i vardera två replikat, och de måste köras på samma ställ som prover. Prover måste köras i duplikat. Lämna inte tomma reaktionsrör mellan kalibratörer, kontroller och prover. Vid användning av TECAN Freedom EVO 100/4-instrumentet hänvisas till Tillämpningsblad för TECAN Freedom EVO 100/4 för Progensa PCA3-analys (Tillämpningsblad för TECAN Freedom EVO) för ytterligare anvisningar.

Tabell 3: Exempel på uppställning av ställ

Ställ Läge	Prov Beskrivning	*Mål-PCA3- koncentration (kopior/mL)	*Mål-PSA- koncentration (kopior/mL)
1 till 3	Kalibrator 1	0	0
4 till 6	Kalibrator 2	250	7 500
7 till 9	Kalibrator 3	2 500	75 000
10 till 12	Kalibrator 4	25 000	750 000
13 till 15	Kalibrator 5	125 000	3 000 000
16 till 17	Kontroll A	1 250	37 500
18 till 19	Kontroll B	62 500	1 500 000
20 till n	Prov	Okänt	Okänt

*PCA3- och PSA-positiva kalibratörer och kontroller har fastställda värden, så det faktiska antalet kopior/mL för kalibratörerna 2 till 5 och kontrollerna A och B kommer att vara något olika de målkoncentrationer som finns i tabellen och de kommer att variera från parti till parti. Koncentrationsinformationen tillhandahålls på ett kort i förpackningen med kalibrator- och kontrollampuller och används för kalibrering och fastställande av analysomgångsgiltighet.

D. Verifiering av koncentrationsinformation

Kontrollera med systemadministratören för Progensa PCA3-analysprogram att koncentrationsinformationen för partierna med de Progensa PCA3- och PSA-kalibratorsatser och -kontrollsatser som analyserats har förts in. För ytterligare information hänvisas till *Snabbguide för Progensa PCA3-analys (Snabbguide)* eller *Handledning för systemadministratörer för Progensa PCA3-analysprogram*.

Anm. Inmatning av koncentrationsinformation krävs **före första användning** av varje nytt kalibrator- och kontrollsatsparti. Efterföljande analysomgångar med användning av kalibratörer och kontroller från samma satsparti kräver inga ytterligare åtgärder.

E. Inställning av Worklist Editor

Skapa en arbetslista för analysomgång med Hologic Worklist Editor på en dator i pre-amplifieringsområdet. För användning av Worklist Editor hänvisas till *Snabbguide* eller *Användarhandledning för Hologic Worklist Editor*. Om TECAN Freedom EVO 100/4-instrumentet används, hänvisas också till *Tillämpningsbladet för TECAN Freedom EVO* för ytterligare anvisningar.

F. Provberedning

1. Låt kalibratörerna och kontrollerna uppnå rumstemperatur före analys. Blanda ampullerna genom att försiktigt invertera dem.
2. Låt proverna uppnå rumstemperatur före analys. **Vortexblanda inte proverna.** Proverna ska blandas genom att de inverteras försiktigt och sporadiskt under uppvärmningsperioden. Se *Metodanmärkningar* för information om olösliga utfällningar och för hantering av frysta prover.

G. Pre-amplifiering

Pre-amplifieringstemperaturen måste vara 15 °C till 30 °C. Kör båda ställen parallellt. Om SB100 Dry Heat Bath/vortexblandaren används, hänvisas till *Tillämpningsbladet SB100*. Om TECAN Freedom EVO 100/4-instrumentet används, hänvisas också till *Tillämpningsbladet för TECAN Freedom EVO* för ytterligare anvisningar.

1. Blanda Target Capture-reagenset (TCR) ordentligt genom virvling eller inversion. Tillsätt 100 µL av det analytspecifika TCR:et i korrekt reaktionsrör med repetitionspipetten.
2. Gör hål i locket på kalibratorampullen med mikropipetten och tillsätt 400 µL av kalibratoren till det korrekt märkta reaktionsröret. Dra upp replikattillsatser från ampullen genom hålet i locket med användning av samma pipettspets. Använd en ny pipettspets för varje kalibratorampull. Upprepa för tillsats av kontroller och prover. Täck över och spara eventuellt överblivna prov och förvara dem vid eller under 8 °C (se *Provtagning, -transport och -förvaring* för ytterligare information) om en omanalys skulle behövas.
3. Täck TTU:erna med förslutningskort och skaka stället försiktigt för hand.
Vortexblanda inte. Inkubera stället vid 62 °C ± 1 °C i ett vattenbad i 30 ± 5 minuter.
4. Ta upp stället ur vattenbadet och torka bort vattnet på rörens undersida med ett absorberande material.
5. Se till att förslutningskortet sitter ordentligt. Byt vid behov ut mot nya förslutningskort och förslut TTU:erna ordentligt.
6. Vortexblanda stället i 60 sekunder med vortexblandaren för flera rör (se *Metodanmärkingar*). Påbörja vortexblandning inom 2 minuter efter att stället tagits upp ur vattenbadet.
7. Låt förslutningskortet sitta kvar och inkubera stället vid rumstemperatur i 30 ± 5 minuter.
8. Placera stället med fronttabben framåt på TCS-enhetens magnetiska bas i 5 till 10 minuter. Ladda TTC-stället med TTC:er.
9. Flöda dispenseringsstationens pumpledningar genom att pumpa tvättlösning genom dispenseringsgrenröret. Pumpa tillräckligt med vätska genom systemet så att det inte finns några luftbubblor i slangarna och alla tio munstyckena levererar ett stadigt vätskeflöde.
10. Slå på vakuumpumpen och koppla loss suggrenröret vid den första kopplingen mellan suggrenröret och ventilklaftsflaskan. Se till att vakuumanometern motsvarar läcktestspecifikationen. Det kan ta 15 sekunder att uppnå denna avläsning. Anslut grenröret igen och se till att vakuumanometern uppfyller vakuumnivåspecifikationen. Låt vakuumpumpen vara på tills alla steg för målinfångningen är slutförda och suggrenrörets slang är torr.
Se bladet med vakuumspecifikationer för Target Capture-systemet i slutet av *Användarhandledningen för Target Capture-systemet* eller kontakta Hologic teknisk support för ytterligare information.
11. Anslut suggrenröret ordentligt till den första uppsättningens spetsar. Sänk ned spetsarna i den första TTU:n tills spetsarna är i kontakt med vätskans övre skikt. Behåll spetsarnas kontakt med vätskans övre skikt medan spetsarna förflyttas nedåt tills de kommer i kortvarig kontakt med rörens botten. Knacka spetsarna försiktigt mot rörens botten tills all kvarvarande vätska har avlägsnats. Håll inte spetsarna i långvarig kontakt med rörens botten och knacka dem inte snabbt mot rörens botten eftersom det kan bildas ett skumöverskott i vakuumfällan.
12. Efter att aspirationen avslutats ska spetsarna matas ut i den ursprungliga spetskassetten. Upprepa aspirationsstegen för de återstående TTU:erna med en separat spets för varje reaktionsrör.

13. Placera dispenseringsgrenröret över varje TTU och använd dispenseringsstationens pump för att tillsätta 1,0 mL tvättlösning i varje TTU-rör.
14. Täck rören med ett förslutningskort och avlägsna stället från TCS. Vortexblanda en gång med vortexblandaren för flera rör. Se *Metodanmärkningar* för ytterligare information.
15. Sätt stället på TCS-enhetens magnetiska bas i 5 till 10 minuter.
16. Aspirera all vätska enligt Steg 11 och 12.
17. Efter den sista aspirationen ska stället avlägsnas från TCS-basen och rören kontrolleras visuellt för att säkerställa att all vätska har aspirerats och att alla rör innehåller magnetpartikelpellets. Om någon vätska syns ska stället sättas tillbaka på TCS-basen i 2 minuter och aspirationen upprepas för TTU:n i fråga med samma spetsar som användes tidigare för varje reaktionsrör. Om någon som helst magnetpartikelpellet syns efter att aspirationen är klar, kan röret godkännas. Om ingen pellet syns ska provet analyseras igen. Om samma prov inte innehåller någon magnetpartikelpellet i detta steg i en efterföljande analysomgång, kan det bero på ett provspecifikt problem. Ett nytt urinprov rekommenderas i detta fall.

H. Amplifiering

Anm. Enzymtillsats till ett reaktionsställ (Steg 6 och 7 nedan) måste utföras inom högst 90 sekunder.

Utför Steg 6 och 7 för ett ställ före upprepning på nästa ställ. Om SB100 Dry Heat Bath/vortexblandaren används, hänvisas till *Tillämpningsbladet SB100*. Om TECAN Freedom EVO 100/4-instrumentet används, hänvisas också till *Tillämpningsbladet för TECAN Freedom EVO* för ytterligare anvisningar.

1. Använd repetitionspipetten för att tillsätta 75 µL rekonstituerad analytspecifikt amplifieringsreagens i varje reaktionsrör. Alla reaktionsblandningar i stället ska nu vara röda.
2. Tillsätt 200 µL oljereagens med repetitionspipetten.
3. Täck rören med ett förslutningskort och vortexblanda med vortexblandaren för flera rör.
4. Inkubera stället i ett pre-amplifieringsvattenbad vid $62\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ i 10 ± 5 minuter.
5. Överför stället till ett vattenbad vid $42\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ i 5 ± 2 minuter.
6. Med stället i vattenbadet avlägsnas förslutningskortet försiktigt och 25 µL rekonstituerad enzymreagens tillsätts med repetitionspipetten i var och en av reaktionsblandningarna. Alla reaktioner ska nu vara orange.
7. Täck omedelbart rören med ett nytt förslutningskort, avlägsna stället från vattenbadet och blanda snabbt reaktionerna genom att försiktigt skaka stället för hand.

Anm. Minimera tiden som stället är utanför vattenbadet för att förhindra avkyllning av rören.

8. Inkubera stället vid $42\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ i 60 ± 5 minuter.

I. Post-amplifiering

Den repetitionspipett som används vid hybridisering och selektion ska endast användas i dessa steg (se *Varningar och försiktighetsåtgärder*). Temperaturen i post-amplifieringssteget, inklusive detektion, måste vara 15 °C till 30 °C . Om SB100 Dry Heat Bath/vortexblandaren används, hänvisas till *Tillämpningsbladet SB100*.

1. Hybridisering
 - a. Avlägsna stället från pre-amplifieringsvattenbadet och överför det till området för post-amplifieringssteget. Tillsätt 100 µL rekonstituerad, analytspecifik probeagens med repetitionspipetten. Alla reaktionsblandningar ska nu vara gula.
 - b. Täck rören med ett förslutningskort och vortexblanda i 10 sekunder, eller tills färgen är enhetlig, med vortexblandaren för flera rör.
 - c. Inkubera stället i ett 62 °C ± 1 °C vattenbad i 20 ± 5 minuter.
 - d. Ta upp stället ur vattenbadet och inkubera vid rumstemperatur i 5 ± 1 minuter.
2. Selektion
 - a. Använd repetitionspipetten för att tillsätta 250 µL selektionsreagens i varje rör. Alla reaktioner ska nu vara rosa.
 - b. Täck rören med ett förslutningskort, vortexblanda stället i 10 sekunder eller tills färgen är enhetlig och inkubera stället i ett vattenbad vid 62 °C ± 1 °C i 10 ± 1 minuter.
 - c. Ta upp stället ur vattenbadet. Inkubera stället vid rumstemperatur i 15 ± 3 minuter.

J. Detektion

För användning av luminometern Leader HC+ hänvisas till *Användarhandledningen för luminometern Leader HC+*. För användning av ProgenSA PCA3-analysprogram hänvisas till *Snabbguide* eller *Handledning för systemadministratörer och användarhandledning för ProgenSA PCA3-analysprogram*.

1. Förbered Leader HC+-luminometern genom att placera en tom TTU i kassetlläge nummer 1 och utför protokollet TVÄTT en gång.
2. Se till att det finns tillräcklig volym Auto Detect 1 och 2 för att kunna slutföra reaktionerna.
3. Sätt in TTU:erna i luminometern och använd diagrammet i luminometern som vägledning. Vid analys av båda analyterna (analysomgång med på varandra följande analyser) sätts alla PCA3-TTU:er in först, och omedelbart därefter alla PSA-TTU:er.
4. Logga in på datorn. Klicka på **NY ANALYSOMGÅNG** och välj korrekt analysprotokoll och korrekta koncentrationer. Klicka på **NÄSTA** för att påbörja analysomgången.

Anm. *Analysomgången måste slutföras inom 2 timmar efter att 62 °C-inkubationen i selektionssteget avslutats.*
5. Bered deaktiveringsvätska genom att blanda lika delar 5 till 7 % (0,7 till 1,0 M) natriumhypokloritlösning och buffert för deaktiveringsvätska i en plastbehållare med stort lock. Etikertera och skriv utgångsdatumet på plastbehållaren. Deaktiveringsvätska är stabil i 4 veckor vid rumstemperatur.
6. När analysomgången är färdig genererar analysprogrammet två rapporter, en råkörningsrapport och en kvotrapport, om det gäller på varandra följande analyser (se *Kvalitetskontrollförfaranden* och *Tolkning av resultat*).
7. När analysomgången är färdig ska de använda TTU:erna avlägsnas från luminometern och placeras i behållaren med deaktiveringsvätska. Låt TTU:erna stå i behållaren i minst 15 minuter innan de kasseras. Metoder för korrekt hantering och kassering ska fastställas av laboratorieförfaren.

Metodanmärkingar

A. Provberedning

1. Om proverna innehåller suspenderade utfällningar, skall de värmas vid 37 °C i upp till 5 minuter och sedan inverteras försiktigt. Om utfällningen inte löses upp, måste man se till att den inte hindrar överföring av provet.
2. Frysta prover skall tinas i rumstemperatur (15 °C till 30 °C, vattenbad kan användas) och inverteras sporadiskt under upptiningen för att förhindra att en olöslig plugg bildas. Blanda ampullerna genom att invertera dem försiktigt så fort isen inuti ampullen har tinat så mycket att den är lös och rör sig fritt. Fortsätt uppvärmningen tills provet är helt tinat och blanda ampullerna igen genom att invertera dem försiktigt.
 - a. Om en plugg bildas och proverna ska pipetteras med TECAN Freedom EVO 100/4-instrumentet, skall proverna frysas igen och upptiningsförfarandet genomföras på nytt. Säkerställ att ingen plugg bildas. Om pluggen inte kan elimineras, måste provet pipetteras för hand.
 - b. Om en plugg bildas och proverna ska pipetteras för hand med en mikropipett behövs inga vidare åtgärder, men se till att pluggen inte hindrar överföringen av provet.

B. Kontroll, kalibrator och provpipettering

1. Den kalibrator-, kontroll- eller provvolym som tillsätts TTU:n ska vara 400 µL. Visuell inspektion av pipetterad volym i TTU:n rekommenderas för att säkerställa överföring av korrekt volym. Korrekt volym är nödvändig för att korrekta resultat ska erhållas.
2. Se till att pipettspetsen sitter korrekt på pipetten och kontrollera att volyminställningen är korrekt. Visuell kontroll av volyminställningen i slutet av varje TTU (vart 10:e rör) rekommenderas. Släpp pipettkolven långsamt och i jämn takt vid uppdragning av provet för att undvika bildning av skum och bubblor.

C. Reagenser

1. Probrekonstitutionslösning kan utfällas vid förvaring. Värm lösningen vid 62 °C ± 1 °C i 1 till 2 minuter. Efter detta uppvärmningssteg kan probrekonstitutionslösningen användas även om utfällningsrester finns kvar. Efter resuspendering ska ampullen blandas genom försiktig invertering.
2. Vid pipettering av andra reagenser än enzym ska du sikta något till sidan av reaktionsrörets botten (där botten svänger uppåt mot sidorna). Vid pipettering av enzymreagens ska du sikta direkt mot mitten av reaktionsröret. Bekräfta visuellt att reagenser dispenserar korrekt (inte för mycket reagens på rörens sidor och korrekt färgändring).

D. Temperatur

1. Målinfångnings-, amplifierings-, hybridiserings- och selektionsstegen är alla temperaturberoende. Det är därför absolut nödvändigt att vattenbadens temperaturer hålls inom angivna temperaturintervall.
2. Rumstemperatur definieras som 15 °C till 30 °C.

E. Tid

Målinfångnings-, amplifierings-, hybridiserings- och selektionsreaktionerna är alla tidsberoende. Iaktta de specifika tiderna i *Analysförfarande*.

F. Vortexblandning

Korrekt vortexblandning är viktig för att ProgenSA PCA3-analys ska utföras korrekt. För vortexblandning av reaktioner ställs vortexblandaren för flera rör in på lägsta hastighet,

stället säkras och blandaren slås på. Öka hastigheten långsamt tills vätskan är halvvägs uppe i röret. Vortexblanda i 10 sekunder, angiven tid eller tills färgen är enhetlig. Sänk sedan hastigheten till lägsta hastighet innan vortexblandaren slås av och stället tas bort. Reaktionsblandningarna får aldrig komma i kontakt med förslutningskorten.

G. Vattenbad

1. Vattennivån i vattenbadet måste hållas vid 3,8 till 5,0 cm (1,5 till 2,0 tum) djup, mätt från den stödjande metallbrickan (på vattenbadets botten) till vattenytan. Detta säkerställer korrekt värmeöverföring.
2. För att undvika korskontamination ska vattenbadet bara användas i ett specifikt analyssteg.

H. Dekontaminering

1. Ytor och pipetter

Laboratoriebänkytor och pipetter måste dekontamineras regelbundet med 2,5 till 3,5 % (0,35 till 0,5 M) natriumhypokloritlösning. Låt natriumhypokloritlösningen vara i kontakt med ytorna i minst 1 minut och skölj sedan med vatten. **Låt inte natriumhypokloritlösningen torka.** Klorlösningar kan punktkorrodera utrustning och metall. Skölj utrustning noggrant med vatten för att undvika punktkorrosion.

2. TCS-suggrenrör

Efter varje användning:

- a. Flytta dispenseringsgrenröret ur vägen.
- b. Sätt en ny TTC i TTC-stället. Slå på vakuumpumpen. Anslut suggrenröret till spetsarna i TTC:n. Aspirera all kvarvarande tvättlösning i dispenseringsstationens flödningstråg.
- c. Häll minst 100 mL 0,5 till 0,7 % (0,07 till 0,1 M) eller, om så önskas, 2,5 till 3,5 % (0,35 till 0,5 M) natriumhypokloritlösning i flödningstråget. Aspirera all lösning genom suggrenröret.
- d. Häll minst 100 mL avjoniserat vatten i flödningstråget. Aspirera allt vatten genom suggrenröret.
- e. Mata ut spetsarna till deras ursprungliga TTC.
- f. Låt vakuumpumpen vara på tills grenrörsslangen är torr, så att backflöde undviks (ca 3 minuter).
- g. Dekontaminera suggrenrörets ytor enligt beskrivningen i *TCS-enheten*.

3. TCS-avfallsbehållare

Rengör avfallsflaskan minst en gång i veckan eller närhelst avfallsflaskan är 25 % full, beroende på vilket som inträffar först.

- a. Stäng av vakuumpumpen och låt vakuumtrycket utjämnas.
- b. Lös ut snabbkopplingsfattningarna mellan avfallsflaskan och överrinningsflaskan, och mellan avfallsflaskan och suggrenröret.
- c. Ta bort avfallsflaskan från vakuumfällans hölje.
- d. Ta av locket och tillsätt försiktigt 400 mL 5 till 7 % (0,7 till 1,0 M) natriumhypokloritlösning till 4 L-avfallsflaskan.

Anm. Detta kan göras i en ångkåpa för att undvika ångor i laboratoriet.

- e. Sätt på ett lock på avfallsflaskan och virvla innehållet försiktigt tills det är helt blandat.
- f. Låt avfallsflaskan stå i minst 15 minuter och kassera sedan innehållet (avfallet).

- g. Skölj avfallsflaskan med vatten för att avlägsna allt avfall inuti flaskan.
 - h. Sätt på ett lock på den tomma avfallsflaskan och placera den i vakuumfällans hölje. Anslut snabbkopplingsfattningarna till TCS-enheten. Kassera båda handskarna noga.
4. TCS-enheten

Torka av TCS-enhetens ytor, suggrenröret och spetsarna i tvättbuffertejektorn med pappershanddukar fuktade med natriumhypokloritlösning på 2,5 till 3,5 % (0,35 till 0,5 M). Skölj med vatten efter natriumhypokloritlösningssteget och torka sedan av ytorna ordentligt med pappershanddukar.
 5. Ställ

Sänk ned ställen i natriumhypokloritlösning på 2,5 till 3,5 % (0,35 till 0,5 M) och se till att de täcks av lösningen. Låt ställen stå nedsänkta i 10 minuter. Vid längre exponering tar ställen skada. Skölj ställen noga med vatten och torka dem sedan helt torra med pappershanddukar.
- I. Analyskontamination
 1. Kontamination kan ske om tillräcklig försiktighet inte iakttas under analysförfarandet.
 2. TTU:erna måste dekontamineras med deaktiveringsvätska enligt beskrivningen i *Analysförfarande*. Återanvänd inte TTU:erna.
 3. Utför regelbunden dekontaminering av utrustning och arbetsytor enligt beskrivningen ovan i *Dekontaminering*.
 4. Som med alla reagenssystem kan för mycket puder på vissa handskar orsaka kontamination av öppna rör. Det rekommenderas att operatörer använder puderfria handskar.

Kvalitetskontrollförfaranden

A. Analysomgångsgiltighet

1. Kalibratorer och kontroller måste köras med alla analyser och på samma ställ som analysprover. Följande kriterier måste vara uppfyllda för att en analysomgång ska betraktas som giltig:

Genomsnittligt RLU för kalibrator 2 > RLU-gränsvärde

Där RLU-gränsvärde = Genomsnittligt RLU för kalibrator 1
+ 1,645 standardavvikelse för RLU-replikat för kalibrator 1
+ 1,645 standardavvikelse för RLU-replikat för kalibrator 2.

Genomsnittligt interpolerat kalibrator 5-utbyte = $100 \pm 30 \%$

Genomsnittligt interpolerat kontroll A-utbyte = $100 \pm 60 \%$

Genomsnittligt interpolerat kontroll B-utbyte = $100 \pm 35 \%$

2. PCA3-programmet utvärderar automatiskt resultaten mot kriterierna ovan och rapporterar analysomgångsstatus som GODKÄND om giltighetskriterierna uppfylls och som ICKE GODKÄND om giltighetskriterierna inte uppfylls.
3. Om analysomgångsstatus är ICKE GODKÄND, är alla analysresultat i samma analysomgång ogiltiga för analyten ifråga och får inte rapporteras.
4. Om en analysomgång är ogiltig, måste analysomgången upprepas för analyten ifråga (se *Tolkning av resultat*). Om analysomgången är giltig för den andra analyten, får dessa resultat användas i dataanalys med den upprepade, giltiga analysomgången med den första analyten.

B. Provgiltighet

Inom en giltig analysomgång kan individuella provresultat bedömas som OGILTIGA och anges då i råkörningsrapporten (se *Tolkning av resultat*). Även om individuella replikat för ett prov kan vara giltiga, ogiltigförklaras ett prov om den interpolerade differensen i koncentration (kopior/mL) mellan replikaten överskrider 600 %. Analys av proven för sådan analyt måste upprepas.

Tolkning av resultat

A. Rapporttyper

1. Råkörningsrapport

Råkörningsrapporten ger information om analysomgångsgiltighet (GODKÄND eller ICKE GODKÄND; se *Kvalitetskontrollförfaranden*) och om individuella reaktionsrör analyserade med Progensä PCA3-analysen. Om en analysomgång är ogiltig (ICKE GODKÄND), märks alla rör i denna analysomgång som ogiltiga. Individuella rör kan emellertid bedömas som ogiltiga inom en giltig analysomgång (GODKÄND). För analysomgångar med på varandra följande analyser (d.v.s. både PCA3 och PSA-analyter analyseras i samma analysomgång), kan en analytanalysomgång vara ogiltig medan den andra analytanalysomgången är giltig.

Undantagssammanfattningen återfinns i slutet av råkörningsrapporten. I analysomgångar med på varandra följande analyser då båda analytanalysomgångarna är giltiga, kan prover listade i undantagssammanfattningen kräva omanalys av en analyt. Även om ett PCA3 Score-resultat är listat i undantagssammanfattningen, betraktas detta resultat inte som rapporterbart förrän manuell matchning har utförts och resultatet är listat i en kvotrapport. Om endast en analyt analyserades eller om en analytanalysomgång är ogiltig, listas alla analyserade prover i undantagssammanfattningen.

2. Kvotrapport

Analysprogrammet genererar automatiskt en kvotrapport för en analysomgång med på varandra följande analyser om båda analytanalysomgångarna är giltiga. Programmet beräknar och listar PCA3 Score för proverna i kvotrapporten. Prover listade i kvotrapporten kräver antingen ingen ytterligare analys eller så måste båda analyterna analyseras om. Prover som inte är listade i kvotrapporten återfinns i avsnittet "Undantagssammanfattning" i råkörningsrapporten.

En kvotrapport kan också genereras efter manuell matchning (se *Manuell matchning* för ytterligare information).

3. Kvalitetskontrollrapport

Kvalitetskontrollrapporten listar giltighetskriterier för analysomgångar, fastställda och interpolerade koncentrationer samt kalibrator- och kontrollutbyte. Rapporten listar också de parametrar som definierar den fyrparametriska logistiska dosresponskalibreringskurvan (3). För ytterligare information hänvisas till *Användarhandledning för Progensä PCA3-analysprogram*.

B. Matchning

1. Automatisk matchning

I analysomgångar med på varandra följande analyser i vilka båda analytanalysomgångarna är giltiga, matchar programmet automatiskt de individuella PCA3- och PSA-analytresultaten för prover och bestämmer PCA3 Score (om det kan beräknas). Resultaten listas i kvotrapporten eller i undantagssammanfattningen i råkörningsrapporten.

2. Manuell matchning

När PCA3- och PSA-analyter analyseras i olika analysomgångar, kan programmet inte automatiskt bestämma PCA3 Score. Manuell matchning av analytresultaten krävs för bestämning av PCA3 Score eller PCA3 Score-intervall (se *Snabbguide* eller *Användarhandledningen för Progensä PCA3-analysprogram*). Manuell matchning kan

också krävas för resultat som är listade i råkörningsrapportens undantagssammanfattning. Efter manuell matchning listas PCA3 Score för matchade prover i en ny kvotrapport.

C. Tolkning av rapporter

1. PCA3 Score

Anm. Endast PCA3 Score och PCA3 Score-intervall listade i kvotrapporten är rapporterbara. Resultat som visas i undantagssammanfattningen kan kräva ytterligare åtgärder och är inte rapporterbara.

PCA3 Score beräknas som kvoten PCA3-RNA-kopior/PSA-RNA-kopior multiplicerat med 1 000. PCA3 Score kan endast beräknas utifrån resultat från giltiga analysomgångar och prover. Ogiltiga analysomgångar och ogiltiga prover måste omanalyseras för analyten ifråga (se *Omanalys* för ytterligare information).

Om det rapporterade PCA3 Score ligger under gränsvärdet, ska resultatet tolkas som NEGATIVT. Om PCA3 Score ligger över eller är lika med gränsvärdet, ska resultatet tolkas som POSITIVT. Laboratoriechefen fastställer gränsvärdet (se *Prestandaegenskaper* för ytterligare information).

Under vissa förhållanden tillhandahålls ett PCA3 Score-intervall ($>[\text{Beräknat PCA3 Score}]$ eller $<[\text{Beräknat PCA3 Score}]$). Om $<[\text{Beräknat PCA3 Score}]$ ligger under gränsvärdet, ska resultatet tolkas som NEGATIVT. Om $>[\text{Beräknat PCA3 Score}]$ ligger över gränsvärdet, ska resultatet tolkas som POSITIVT. Om ett numeriskt värde krävs, kan provspädning och omanalys generera ett PCA3 Score i stället för ett PCA3 Score-intervall (se *Omanalys - Utspädning av prover över gränsvärdesintervallet*).

2. Tolkning av status- och analyskoder

I statuskolumnen i både råkörningsrapporten och kvotrapporten anges informationen i formatet "s:a". Analysomgångsspecifika statuskoder ("s") anges före (till vänster om) kolonet och analyspecifika analyskoder ("a") anges efter (till höger om) kolonet. Analyspecifika koder anges med gemener för PCA3-resultat och versaler för PSA-resultat. Varje rapport innehåller beskrivningar av status och analyskoder som förekommer i rapporten. Exempelvis kan koder ange om ett prov- eller replikatresultat är giltigt eller utanför gränsvärdena. Se *Snabbguide* eller *Användarhandledningen för ProgenSA PCA3-analysprogram* för en full lista över status- och analyskoder och mer utförlig information.

Om ett PCA3 Score listas i kvotrapporten och ingen status- eller analyskod finns i PCA3- eller PSA- statuskolumnerna, visar detta att båda analyterna är giltiga och "inom intervallet". Provresultatet är rapporterbart och inga ytterligare åtgärder krävs.

Om en status- eller analyskod finns i undantagssammanfattningen eller i kvotrapporten, kan omanalys vara nödvändig (se *Tolkning av resultaten i undantagssammanfattningen* och *Tolkning av resultat i kvotrapporten*). Om analytresultat kommer från separata analysomgångar och har en analyskod/ analyskoder, ska kombinationen för båda analyterna sökas i Tabell 4 eller Tabell 5 för att bestämma om ytterligare åtgärder krävs.

Anm. Förekomsten av en status- eller analyskod innebär inte automatiskt att omanalys krävs.

3. Tolkning av resultaten i undantagssammanfattningen

Eventuellt listas inga undantag i undantagssammanfattningen. I dessa fall krävs inga ytterligare åtgärder.

Om undantagssammanfattningen listar ett prov/prover från analysomgångar som körts i följd och där båda analytanalysomgångarna är giltiga, hänvisas till Tabell 4 för anvisningar.

För individuella analytanalysomgångar hänvisas till *Tolkning av status- och analyskoder*. För analysomgångar som körts i följd och där en analytanalysomgång är ogiltig, ska den ogiltiga analysomgången köras om (se *Omanalys* för ytterligare information) och resultaten behandlas som om individuella analytanalysomgångar hade utförts. Manuell matchning krävs.

Ett prov kan märkas som ogiltigt även om de individuella rören (replikat) märks som giltiga. Det är det sammantagna resultatet av replikaten som avgör provgiltigheten och en stor skillnad mellan replikaten gör ett prov ogiltigt (se *Kvalitetskontrollförfaranden* för ytterligare information).

Tabell 4: Scenario för undantagssammanfattning för Progensa PCA3-analys

PCA3-resultat (Analyskod*)	PSA-resultat (Analyskod*)	Listad PCA3 Score	Ytterligare analys?	Åtgärd/Kommentar
Inom gränsvärdesinterval let (ingen kod)	Ogiltigt** (A, B, E, H eller I)	--	Ja	Omanalysera PSA (se <i>Omanalys</i>) och matcha resultaten manuellt.
Under gränsvärdesinterval let (g)	Ogiltigt (A, B, E, H eller I)	--	Ja	Omanalysera PSA (se <i>Omanalys</i>) och matcha resultaten manuellt.
Ogiltigt (a, b, e, h eller i)	Inom gränsvärdesinterval let (ingen kod)	--	Ja	Omanalysera PCA3 (se <i>Omanalys</i>) och matcha resultaten manuellt.
Inom gränsvärdesinterval let (ingen kod)	Över gränsvärdesinterval let (F)	<[Beräknat PCA3 Score]***	Valfritt	1. Matcha manuellt för att erhålla <[Beräknat PCA3 Score] ELLER 2. Späd ut provet i provspädningsmedel (se <i>Utspädning av prover över gränsvärdesintervallet</i>), omanalysera PSA och matcha resultaten manuellt om ett PCA3 Score krävs.
Över gränsvärdesinterval let (f)	Inom gränsvärdesinterval let (ingen kod)	>[Beräknat PCA3 Score]	Valfritt	1. Matcha manuellt för att erhålla >[Beräknat PCA3 Score] ELLER 2. Späd ut provet i provspädningsmedel, omanalysera PCA3 och matcha resultaten manuellt om ett PCA3 Score krävs.
Under gränsvärdesinterval let (g)	Inom gränsvärdesinterval let (ingen kod)	<[Beräknat PCA3 Score]	Nej	Matcha manuellt för att erhålla <[Beräknat PCA3 Score].
Under gränsvärdesinterval let (g)	Över gränsvärdesinterval let (F)	<[Beräknat PCA3 Score]	Nej	Matcha manuellt för att erhålla <[Beräknat PCA3 Score].

*För en fullständig lista på analyskoder hänvisas till *Användarhandledningen för Progensa PCA3-analysprogram*.

**Gäller endast ogiltiga prover inom en giltig analysomgång.

***För värden utanför gränsvärdesintervallet beräknas "Beräknat PCA3 Score" genom att använda kopianivån för närmaste positiva kalibrator.

4. Tolkning av resultat i kvotrapporten

Om ett prov är listat i kvotrapporten med ett PCA3 Score, är resultatet ett rapporterbart PCA3 Score och inga ytterligare åtgärder krävs. Om inget PCA3 Score är listat, angivet som "--" i PCA3 Score-kolumnen, hänvisas till Tabell 5 för anvisningar.

Tabell 5: Scenario för kvotrapport för Progensa PCA3-analys

PCA3-resultat (Analyskod*)	PSA-resultat (Analyskod*)	Listad PCA3 Score	Ytterligare analys?	Åtgärd/Kommentar
Inom gränsvärdesinterval let (ingen kod)	Inom gränsvärdesinterval let (ingen kod)	PCA3 Score	Nej	Inga ytterligare åtgärder; resultatet är rapporterbart.
Ogiltigt** (a, b, e, h eller i)	Ogiltigt (A, B, E, H eller I)	--	Ja	Omanalysera båda analyterna (se <i>Omanalys</i>).
Ogiltigt (a, b, e, h eller i)	Över gränsvärdesinterval let (F)	--	Ja	Späd ut provet i provspädningsmedel (se <i>Utspädning av prover över gränsvärdesintervallet</i>), omanalysera båda analyterna.
Över gränsvärdesinterval let (f)	Ogiltigt (A, B, E, H eller I)	--	Ja	Späd ut provet i provspädningsmedel, omanalysera båda analyterna.
Över gränsvärdesinterval let (f)	Över gränsvärdesinterval let (F)	--	Ja	Späd ut provet i provspädningsmedel, omanalysera båda analyterna.
Ogiltigt (a, b, e, h eller i)	Under gränsvärdesinterval let (G)	--	Nej	Provet har otillräcklig mängd RNA för korrekt analys. Ett nytt prov måste tas från patienten.
Inom gränsvärdesinterval let (ingen kod)	Under gränsvärdesinterval let (G)	--	Nej	Provet har otillräcklig mängd RNA för korrekt analys. Ett nytt prov måste tas från patienten.
Över gränsvärdesinterval let (f)	Under gränsvärdesinterval let (G)	--	Nej	Provet har otillräcklig mängd RNA för korrekt analys. Ett nytt prov måste tas från patienten.
Under gränsvärdesinterval let (g)	Under gränsvärdesinterval let (G)	--	Nej	Provet har otillräcklig mängd RNA för korrekt analys. Ett nytt prov måste tas från patienten.

*För en fullständig lista på analyskoder hänvisas till *användarhandledningen för Progensa PCA3-analysprogram*.

**Gäller endast ogiltiga prover inom en giltig analysomgång. Om prover varit ogiltiga p.g.a. att analysomgången varit ogiltig kommer resultaten att anges i undantagssammanfattningen (se *Tolkning av resultaten i undantagssammanfattningen* för ytterligare information).

D. Omanalys

1. Riktlinjer för omanalys

- a. Trots att det inte är nödvändigt att båda analyterna analyseras i samma analysomgång, **måste båda analytresultaten härröra från samma provampull för att PCA3 Score ska vara rapporterbart.**
- b. Alla ogiltiga analysomgångar måste upprepas och alla ogiltiga prover från giltiga analysomgångar måste omanalyseras.
- c. Omanalysera prov/prover med användning av en ny uppsättning kalibratorer och kontroller.
- d. Korrekt förvaring av överblivna prover före omanalys är nödvändig (se *Provtagning, -transport och -förvaring* för ytterligare information).
- e. Manuell matchning av PCA3- och PSA-analyter kan krävas för att bestämma PCA3 Score (se *Manuell matchning* för ytterligare information).

2. Utspädning av prover över gränsvärdesintervallet

- a. Om en provkoncentration extrapoleras över kalibrator 5 inom en giltig analysomgång, är resultatet "över gränsvärdesintervallet" och resultatet kommer att märkas med analyskoden "F" eller "F" i analysomgångsrapporten/-rapporterna. Koncentrationen kommer att uttryckas som >[Kalibrator 5-koncentration].
- b. Invertera det behandlade urinprovet för att blanda det före utspädning av provet. Rekommenderad, men ej nödvändig, utspädning är 1:10 med användning av Progensa PCA3-provutspädningssats. I en lämplig ampull tillsätts 1 800 µL provspädningsmedel och 200 µL prov; sätt på locket och invertera fem gånger för att blanda ordentligt. Spädningsfaktorn kommer att anges som "10" i analysomgångens arbetslista. Om båda analyterna ska omanalyseras, ska volymerna dubblas (använd 3 600 µL provspädningsmedel och 400 µL prov). Se bipacksedeln för Progensa PCA3-provutspädningssats. Analysera det utspädda provet med analysen.
- c. Om provresultatet vid omanalys är över gränsvärdesintervallet igen, krävs ytterligare utspädning tills det interpolerade provresultatet ligger inom intervallet för kalibratorerna. Ytterligare spädning av den första 1:10-spädningen är tillåten, förutsatt att den första 1:10-spädningen förvarats korrekt (se *Provtagning, -transport och -förvaring* för ytterligare information).

Begränsningar

- A. Progensa PCA3-analys ska inte användas för patienter som tar läkemedel som man vet påverkar serum-PSA-nivåer, t.ex. finasterid (Proscar, Propecia), dutasterid (Avodart) eller som behandlas med antiandrogener (Lupron). Effekten av dessa läkemedel på PCA3-genuttryck har ännu inte utvärderats.
- B. Vissa behandlingar och diagnostiska undersökningar, t.ex. prostatektomi, strålning och prostatabiopsi, kan påverka prostatavävnadens viabilitet och sålunda påverka PCA3 Score. Effekten av dessa förfaranden på analysprestanda har ännu inte utvärderats. Prover för PCA3-analys ska tas när klinikern anser att prostatavävnaden har återhämtat sig.
- C. Användning av Progensa PCA3-analysen förbehålls personal som har utbildning i förfarandet. Underlåtenhet att följa anvisningarna i denna bipacksedel kan ge felaktiga resultat.
- D. Varje laboratorium måste utföra oberoende validering av en LIS-överföringsprocess.
- E. Pålitliga resultat är beroende av korrekt urinprovtagning. Eftersom transportsystemet som används för Progensa PCA3-analysen inte medger att mikroskopi används för att bedöma om urinprovet är adekvat, är det nödvändigt att kliniker utbildas i korrekt urinprovtagningsteknik. Se *Provtagning, -transport och -förvaring*. För utförlig information hänvisas till bipacksedeln i Progensa PCA3 transportsats för urinprover.
- F. Resultat från Progensa PCA3-analysen ska tolkas tillsammans med andra laboratoriedata och kliniska data som klinikern har tillgång till. (Analysresultat kan påverkas av olämplig provtagning, tekniska fel eller provsammanblandning.)

Prestandaegenskaper

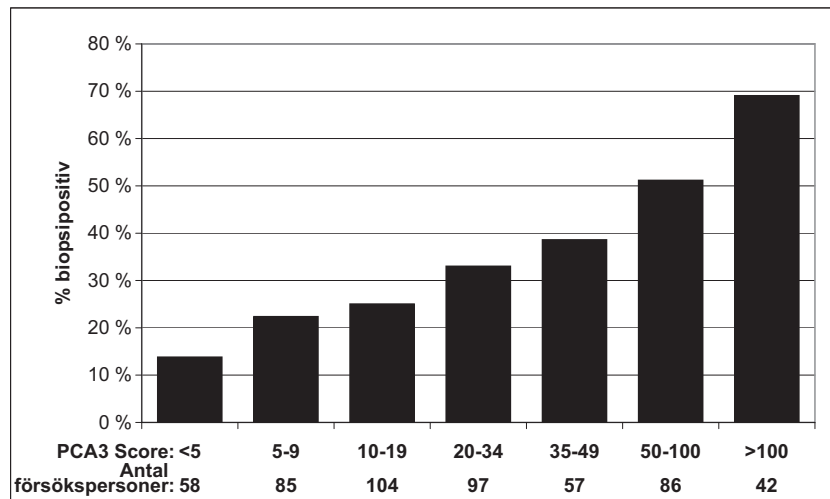
A. Kliniska resultat

1. Diagnostisk sensitivitet och specificitet

Prestandaegenskaper för Progensa PCA3-analys fastställdes med användning av prover från försökspersoner vid fyra geografiskt spridda, nordamerikanska kliniska inrättningar. Studiepopulationen bestod av 529 män för vilka prostatabiopsi var planerad. Försökspersonernas demografiska data visas nedan:

- Genomsnittsålder \pm SD = 64 ± 8 år (medianvärde 63, intervall 32 till 89)
- Genomsnittlig serum-PSA-nivå = $7,9 \pm 21,9$ $\mu\text{g/L}$ (5,6, 0,3 till 484)
- Genomsnittlig prostatavolym (mätt med transrektalt ultraljud) = 44 ± 25 cm^3 (39,5 till 225)
- 34 % (180/529) biopsi positiva för prostatacancer

Figur 3 visar korrelationen mellan PCA3 Score och sannolikheten för positivt biopsiresultat. Med ökande PCA3 Score ökade förekomsten av cancerpositiva biopsiresultat hos försökspersonerna.



Figur 3. Korrelationen mellan PCA3 Score och sannolikheten för positivt biopsiresultat

Receiver operating characteristic (ROC)-analys utfördes, med prostatabiopsi som referensmetod, enligt CLSI GP10-A (1995) (4). För Progensa PCA3-analysen var ytan under kurvan (AUC) 0,685 (95 % konfidensintervall = 0,637 till 0,733). Tabell 6 visar diagnostisk sensitivitet och specificitet vid olika PCA3 Score-gränsvärden. Varje laboratorium ska fastställa gränsvärdet för diagnostisk sensitivitet eller specificitet (se *Tolkning av resultat*).

Tabell 6: Diagnostisk sensitivitet och specificitet vid olika PCA3 Score-gränsvärden för Progensa PCA3-analys

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

2. Provstabilitetsstudier

- a. Stabilitet i helurin: Förstaportionsurin samlades in från 10 försökspersoner och förvarades vid 2 °C till 8 °C eller vid 30 °C före behandling genom tillsats till urintransportmedierna (UTM). Vid 2 °C till 8 °C observerades betydande nedbrytning av PCA3- och PSA-RNA i vissa prover efter 4 timmar. Helurin måste sålunda behandlas inom 4 timmar. Vid 30 °C observerades betydande nedbrytning efter mindre än 1 timme. Därför måste helurin alltid förvaras i kylskåp eller på is före behandling.
- b. Stabilitet hos behandlat urin: Tolv prover inkuberades vid 4 °C eller 30 °C i upp till 38 dagar. Vid 4 °C var PCA3- och PSA-RNA stabila i 21 dagar; Vid 30 °C, 5 dagar. Prover som förvarades vid -20 °C och -70 °C uppvisade PCA3- och PSA-RNA-stabilitet i upp till 90 dagar.
- c. Stabilitet vid frysning/upptining: Prover cyklades mellan 37 °C och -70 °C sex gånger. Ingen minskning av kopienivåerna av PCA3- eller PSA-RNA observerades.

B. Analytiska resultat

1. Analytisk sensitivitet

En analytisk sensitivitetspanel bestående av utspätt *in vitro*-RNA-transkript användes för att utvärdera analysens sensitivitet. En operatör testade panelen i tolv analysomgångar med fem replikat och med användning av ett enda reagensparti. Detektionsgränsen och kvantifieringsgränsen beräknades enligt CLSI EP17-A (2004) (5). Detektionsgränsen för PCA3-analyten var 80 kopior/mL, och för PSA-analyten var den 1 438 kopior/mL. Kvantifieringsgränsen för båda analyterna var Kalibrator 2.

2. Analytisk specificitet

- a. Osplitsat transkript: Progensa PCA3-analysen har utformats för att endast detektera det prostatacancerspecifika exon3-exon4-splitsade PCA3-RNA:et (2). Analysen detekterade inte osplitsat PCA3-RNA vid 1 miljon kopior/mL, vilket är betydligt högre än bakgrunden.
- b. Prostataspecificitet för PCA3-RNA i urin: Prover tagna från försökspersoner som genomgått radikal prostatektomi (n = 97) analyserades med Progensa PCA3-analysen och PCA3-RNA-nivåerna jämfördes med nivåerna hos försökspersoner före biopsi (n = 464). Medianvärdet för PCA3-RNA (kopior/mL) låg under analysens detektionsgräns för prover från försökspersoner som genomgått prostatektomi, medan medianvärdet för PCA3-RNA (kopior/mL) för prover från försökspersoner före biopsi var 7 243 kopior/mL. Dessa data bekräftar att PCA3-RNA i urin är från prostatan.
- c. Vävnadsspecificitet: Totalt RNA extraherades från vävnad från två unika manliga donatorer per vävnadstyp, tillsattes i provspädningsmedel (10 ng per reaktion) och analyserades med Progensa PCA3-analys. Prostatavävnad var den enda av de vävnadstyper som listas i Tabell 7 som detekterades över detektionsgränsen för PCA3-RNA.

Tabell 7: Vävnadstyper från män som analyserats för PCA3-RNA

Vävnadstyp	
Urinblåsa (normal)	Njure
Urinblåsa (tumör)	Penis
Benmärg	Prostata
Ductus deferens	Sädesblåsan
Bitestikel	Testikel

- d. Interfererande substanser: De substanser som listas i Tabell 8 tillsattes till alikvoter av poolat, behandlat urin från män. Proverna analyserades med Progensa PCA3-analysen enligt CLSI EP7-A2 (2005) (6). Vid de angivna koncentrationerna observerades ingen analysinterferens.

Tabell 8: Ämnen som analyserats för Progensa PCA3-analysinterferens

Terapeutiska agens		Terapeutiska agens, forts	
Substans	Analyskoncentration	Substans	Analyskoncentration
Paracetamol/Kodein	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	Saw palmetto	1 600 mg/L
Difenhydramin	19,6 µmol/L	Selen	0,275 mg/L
Paracetamol	1 324 µmol/L		
Acetylsalicylsyra	3,62 mmol/L	Urinens beståndsdelar	
Ibuprofen	2 425 µmol/L	Substans	Analyskoncentration
Furosemid	181 µmol/L	Urinsyra	1,4 mmol/L
Ciprofloxacin	30,2 µmol/L	Hemoglobin	2 g/L
Levaquin	48,6 µmol/L	Vita blodkroppar	4,56 x 10 ⁷ celler/L
Doxycyklin	67,5 µmol/L	Erytrocyter	3,06 x 10 ⁷ celler/L
Fluoxetinhydroklorid	11,2 µmol/L	Albumin	50 g/L
Flutamid	1 500 mg/L	Bilirubin (okonjugerat)	342 g/L
Dutasterid	1,5 mg/L	IgG	60 g/L

3. Noggrannhet

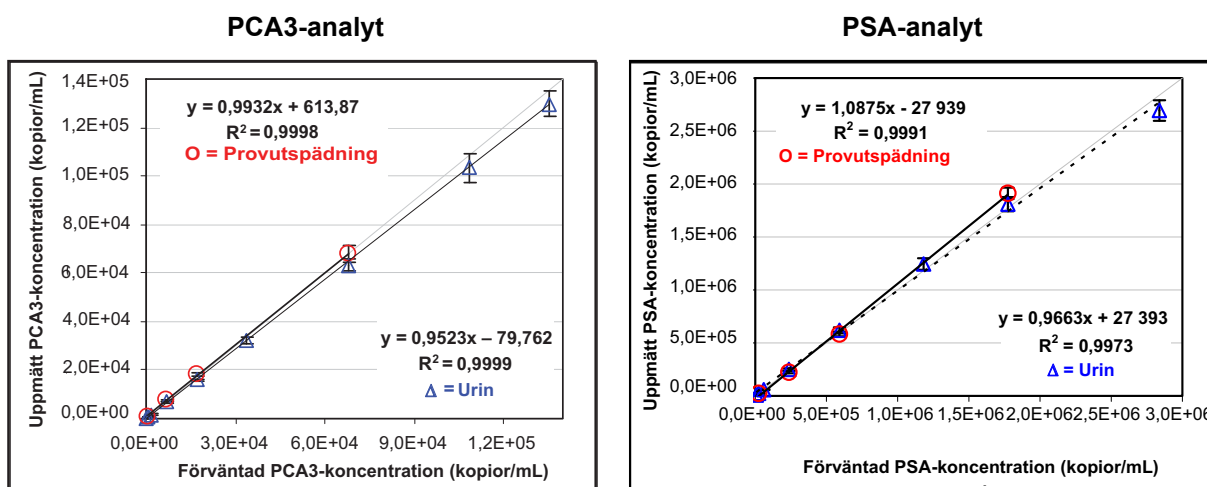
Progensa PCA3-analysens noggrannhet utvärderades enligt CLSI EP15-A2 (2005) (7). PCA3- och PSA-RNA-transkript kvantifierades med ultraviolett/visuell spektrofotometri och tillsattes till behandlade, normala urinprover från kvinnor (inget detekterbart PCA3- eller PSA-RNA), varefter koncentrationer mättes genom Progensa PCA3-analys. Procentuellt (%) utbyte beräknades som förhållandet mellan uppmätt koncentration (kopior/mL) och tillsatta koncentration (kopior/mL), multiplicerat med 100.

Tabell 9: Kopieutbyte vid Progensa PCA3-analys

Analyt	Känd koncentration, kopior/mL	Uppmätt koncentration, kopior/mL	Utbyte i %
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 och intervall

Progensa PCA3-analysens linjära intervall bestämdes enligt CLSI EP6-A (2003) (8) baserat på linjär regressionsanalys (minsta-kvadratmetoden). Två grupper av spädningsserier bereddes från prover innehållande hög koncentration av PCA3- och PSA-RNA. En uppsättning späddes i behandlad urin från kvinnor och en uppsättning späddes i provspädningsmedel. Spädningarna sträckte sig över hela analysintervallet mellan den lägsta och högsta positiva kalibratoren för varje analyt. För både PCA3- och PSA-analyter visade analysmättningsresultat ett direkt proportionellt förhållande mellan de analyserade spädningarna och rapporterat analytkoncentration (kopior/mL). Ingen signifikant spädningsmedelsmatriseffekt förekom. Se figur 4.



Figur 4. Progensa PCA3-analyslinearitet för PCA3- och PSA-analyter

5. Precision

Progensa PCA3-analysens precision utvärderades enligt CLSI EP5-A2 (2004) (9). Repeterbarhet är precision vid minimal variabilitet och reproducerbarhet är precision vid maximal variabilitet.

För repeterbarhet bereddes en 3-komponentsanalyspanel bestående av utspätt *in vitro*-RNA-transkript. En operatör på en analysinrättning analyserade panelen i 20 analysomgångar av 5 replikat under 20 dagar med användning av ett enstaka kalibrator- och kontrollparti, ett reagensparti och en utrustningsuppsättning. Tabell 10 visar repeterbarhetsprecisionen för Progensa PCA3-analys vid olika analyskoncentrationsnivåer.

Tabell 10: Progensa PCA3-analysrepetierbarhet

Analyt	Panel Komponent	Genomsnitt kopior/mL	Repetierbarhet SD	Repetierbarhet VK
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 %

För reproducerbarhet bereddes en 8-komponentsanalyspanel bestående av poolade prover (1 till 3) och utspätt *in vitro*-RNA-transkript (4 till 8). Tre operatörer analyserade panelen i 18 analysomgångar under 3 dagar med användning av ett enstaka kalibrator- och kontrollparti, 3 reagenspartier och 3 utrustningsuppsättningar. Tabeller 11 och 12 sammanfattar Progensa PCA3-analysens total-, inom-analysomgångs-, mellan-analysomgångs-, operatörs-, utrustnings- och partiprecision med avseende på analyt (kopior/mL) och PCA3 Score.

Inom-analysomgångs-, mellan-operatörs- och mellan-analysomgångsvariabilitet utgjorde, i fallande ordning, de största bidragen till total analysvarians. Reagensparti och utrustning bidrog endast i liten utsträckning till den totala analysvariansen. Dessa resultat visar att Progensa PCA3-analysen uppvisar reproducerbarhet och att den primära källan för variation är slumpfel (inom-analysomgång).

Tabell 11: ProgenSA PCA3-analysreproducerbarhet: Kopia/mL-analys

Analyt	Panel Komponent	n	Uppmätt kopior/mL	Totalt VK	Inom-analysomgångs-VK	Mellan-analysomgångs-VK	Mellan-operatörs-VK	Mellan-utrustnings-VK	Mellan-partis-VK
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 %

Tabell 12: ProgenSA PCA3-analysreproducerbarhet: PCA3 Score-analys

Panel Komponent*	n	Score-medelvärde	Totalt VK	Inom-analysomgångs-VK	Mellan-analysomgångs-VK	Mellan-operatörs-VK	Mellan-utrustnings-VK	Mellan-partis-VK
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 %

*Panelkomponenter 4 till 6 innehöll endast PCA3- eller PSA-RNA-transkript och inkluderades därför inte i denna analys.

Källförteckning

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. Kiemeney, 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

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

Teknisk support: +1 888 484 4747
molecularsupport@hologic.com

Besök www.hologic.com för ytterligare kontaktinformation.



Hologic N.V.
Da Vincilaan 5
1930 Zaventem
Belgium

Hologic, Aptima, DTS, Leader, Progensa, och SB100 eller registrerade varumärken som tillhör Hologic, Inc. och/eller dess dotterbolag i USA och/eller andra länder.

eppendorf (stilliserat) och REPEATER är varumärken som tillhör Eppendorf AG.

RAININ är ett varumärke som tillhör Rainin Instrument, LLC.

TECAN och FREEDOM EVO är varumärken som tillhör Tecan Group AG.

Alla andra varumärken som uppträder i denna bipacksedel är varumärken som tillhör sina respektive ägare.

Denna produkt kan omfattas av ett eller flera USA-patent som identifieras på www.hologic.com/patents.

©2006 – 2018 Hologic, Inc. Med ensamrätt.

501377SV Rev. 003

2018-03