

## Test Progensa PCA3

Pouze pro diagnostické použití *in vitro*.

Pouze pro export z USA.

<b>Všeobecné informace</b> .....	<b>2</b>
Určené použití .....	2
Souhrn a vysvětlení testu .....	2
Principy metody .....	2
<b>Dodávané materiály a reagensie</b> .....	<b>4</b>
<b>Materiály</b> .....	<b>8</b>
<b>Varování a bezpečnostní opatření</b> .....	<b>10</b>
<b>Požadavky na uchovávání a manipulaci</b> .....	<b>12</b>
<b>Sběr, transport a uchovávání vzorku</b> .....	<b>13</b>
<b>Postup testu</b> .....	<b>15</b>
Poznámky k postupu .....	21
<b>Postupy kontroly kvality</b> .....	<b>24</b>
<b>Interpretace výsledků</b> .....	<b>25</b>
<b>Omezení</b> .....	<b>30</b>
<b>Funkční charakteristiky</b> .....	<b>31</b>
<b>Literatura</b> .....	<b>36</b>

## Všeobecné informace

### Určené použití

Test Progensa PCA3 je amplifikační test nukleové kyseliny (NAAT) *in vitro*, který detekuje ribonukleovou kyselinu (RNA) genu č. 3 karcinomu prostaty (Prostate Cancer Gene 3, PCA3) ve vzorcích mužské moči a generuje skóre PCA3. Skóre PCA3 je určeno pro použití ve spojení se standardizovaným diagnostickým algoritmem jako pomůcka pro diagnózu karcinomu prostaty.

### Souhrn a vysvětlení testu

Použití testování prostatického specifického antigenu (PSA) v séru při skríningu karcinomu prostaty vedlo k bioptické diagnóze menších a dříve nedetekovaných nádorů (1), čímž vzniklo nové diagnostické dilema: pouze část mužů se zvýšenými hladinami PSA v séru mají detekovatelný karcinom prostaty. Muži s minimálně jednou negativní biopsií mají často trvale zvýšenou hladinu PSA v séru primárně v důsledku zvětšené prostaty a benigní hyperplazie prostaty (BPH). Ovšem významný podíl mužů s mírně zvýšeným sérovým PSA (2,5-4,0 µg/l) má, nebo se u nich vyvine, klinicky významný karcinom prostaty (1). Zatímco biopsie zůstává při detekci karcinomu prostaty zlatým standardem, jsou pro snazší rozhodování o provedení biopsie prostaty nutné přesnější testy s lepší specificitou.

PCA3 (také známé také „PCA3<sup>DD3</sup>“ nebo „DD3<sup>PCA3</sup>“) je nekódující prostatická specifická RNA, která je ve vysoké míře exprimována v buňkách karcinomu prostaty, se střední 66násobnou up-regulací ve srovnání s okolní benigní tkání (2). Exprese genu PSA je naopak podobná v nádorových i benigních buňkách prostaty. Hladiny PSA RNA mohou být proto použity pro normalizaci množství prostatické specifické ribonukleové kyseliny (RNA) ve vzorcích pro molekulární testy. Byla prokázána vhodnost kvantitativního molekulárního testování založeného na PCA3 z močových sedimentů (2) a z plné moči (3).

Test Progensa PCA3 využívá plnou moč odebranou po vyšetření per rectum (PR), které zahrnuje tři zmáčknutí každého laloku prostaty. Vyšetření per rectum způsobí uvolnění buněk prostaty přes prostatické kanálky do močových cest, kde mohou být odebrány v první porci moči. Moč je zpracovávána přidáním média pro přepravu moči (UTM), které způsobuje lýzu buněk a stabilizuje RNA. Je provedena kvantifikace PCA3 RNA a PSA RNA a na základě poměru PCA3 RNA/PSA RNA je stanoveno skóre PCA3. Kromě normalizace signálu PCA3 slouží měření PSA RNA také k potvrzení, že získaná prostatická specifická RNA je dostačující pro generaci platných výsledků. Vyšší skóre PCA3 koreluje s vyšší pravděpodobností pozitivní biopsie prostaty.

### Principy metody

Test Progensa PCA3 je tvořen dvěma kvantitativními amplifikačními testy nukleové kyseliny. Test Progensa PCA3 kombinuje následující technologie: technologii zachycení cíle za účelem zdokonalení zpracování vzorků moči, technologii transkripčně mediované amplifikace (TMA) za účelem amplifikace clové RNA a technologii hybridizačně protekčního testu (HPA) za účelem detekce amplikonu.

Je-li test Progensa PCA3 prováděn v laboratoři, jsou molekuly cílové RNA izolovány ze vzorků moči pomocí metody zachycení cíle. Oligonukleotidy („zachycené oligonukleotidy“), které jsou komplementární pro sekvenčně specifické cílové regiony, jsou ve vzorku moči hybridizovány pro cíle. Pro každý cíl se používá samostatný zachycený oligonukleotid.

Hybridizovaný cíl je poté zachycen na magnetické mikročástice, které jsou separovány ze vzorku moči v magnetickém poli. Promývací kroky se používají pro odstranění cizorodých komponent z reakční zkumavky. Magnetická separace a promývací kroky se provádí pomocí systému zachycení cíle.

Amplifikace cíle probíhá pomocí TMA, což je amplifikační metoda nukleové kyseliny založená na transkripci, která využívá dva enzymy, reverzní transkriptázu Moloneyho viru myší leukemie (MMLV) a polymerázu T7 RNA. Pro každý cíl se používá unikátní sada primerů. Reverzní transkriptáza se používá k vytvoření kopie deoxyribonukleové kyseliny (DNA) (obsahující promoční sekvenci pro polymerázu T7 RNA) cílové sekvence. Polymeráza T7 RNA produkuje více kopií RNA amplikonu z kopie DNA templátu.

Detekce je dosažena pomocí HPA využívající jednořetězcové chemiluminiscenčně značené sondy nukleové kyseliny, které jsou komplementární k amplikonu. Samostatné sondy se používají pro každý cílový amplikon. Značené sondy nukleové kyseliny hybridizují specificky s amplikonem. Selekční reagentie rozlišuje mezi hybridizovanými a nehybridizovanými sondami inaktivací značení na nehybridizovaných sondách. Během detekčního kroku je chemiluminiscenční signál produkovaný hybridizovanou sondou měřen pomocí luminometru a je hlášen jako relativní světelné jednotky (RLU).

PCA3 RNA a PSA RNA jsou kvantifikovány v samostatných zkumavkách a je stanoveno skóre PCA3. Kalibrátory obsahující známé množství PCA3 RNA nebo PSA RNA transkriptu jsou obsaženy v každém cyklu testu a používají se k vytvoření standardní křivky. PCA3 a PSA kontroly jsou obsaženy také k verifikaci přesnosti výsledků interpolovaných ze standardní křivky.

## Dodávané materiály a reagenty

**Poznámka:** Informace o H-větech a P-větech, které mohou být spojeny s reagenty, naleznete v knihovně bezpečnostních listů (Safety Data Sheet Library) na adrese [www.hologic.com/sds](http://www.hologic.com/sds).

Níže jsou uvedeny reagenty a materiály dodávané pro soupravu testu Progensa PCA3/PSA k použití při testu Progensa PCA3. Vedle názvu reagenty jsou také uvedeny identifikační symboly reagenty.

### Souprava testu Progensa PCA3, 2 x 100 reakcí, kat. č. 302355 (8 krabic)

#### Souprava Progensa PCA3, 100 reakcí

Chladicí krabice Progensa PCA3 — uchovávejte při teplotě 2 °C až 8 °C od příjmu až do doby použitelnosti označené na štítku

Symbol	Složka	Množství
A	<b>PCA3 amplifikační reagenty</b> <i>Neinfekční nukleové kyseliny vysušené v pufrovaném roztoku HEPES obsahujícím &lt;10 % objemového činidla.</i>	1 lahvička
E	<b>Enzymatická reagenty PCA3/PSA</b> <i>Reverzní transkriptáza a RNA polymeráza vysušená v pufrovaném roztoku HEPES obsahujícím &lt;10 % objemového činidla.</i>	1 lahvička
P	<b>Reagenty sondy PCA3</b> <i>Neinfekční chemiluminiscenční DNA sondy vysušené v sukcinátem pufrovaném roztoku obsahujícím &lt;5 % objemového činidla a &lt;5 % lithium lauryl sulfátu.</i>	1 lahvička

Krabice s pokojovou teplotou Progensa PCA3 — uchovávejte při teplotě 15 °C až 30 °C od příjmu až do doby použitelnosti označené na štítku

Symbol	Složka	Množství
AR	<b>PCA3 amplifikačně rekonstituční roztok</b> <i>Vodný roztok obsahující konzervační látky (&lt;1 % parabenů).</i>	1 x 9,3 ml
ER	<b>PCA3/PSA enzymatický rekonstituční roztok</b> <i>Pufrovaný roztok HEPES obsahující surfaktant (10 % Triton X-100) a 20 % glycerol.</i>	1 x 3,3 ml
PR	<b>PCA3/PSA rekonstituční roztok sondy</b> <i>Sukcinátem pufrovaný roztok obsahující &lt;5 % lithium lauryl sulfátu.</i>	1 x 12,4 ml
S	<b>PCA3/PSA selekční reagenty</b> <i>Borátem pufrovaný roztok obsahující surfaktant (1 % Triton X-100).</i>	1 x 31 ml
TCR	<b>PCA3 reagenty zachycující cíl</b> <i>Neinfekční nukleová kyselina v pufrovaném roztoku HEPES obsahující pevnou fázi.</i>	1 x 22 ml
	<b>Uzavírací karty</b>	1 balení
	<b>Rekonstituční objímky</b>	1 balení

Souprava kalibrátoru a kontrol Progensa PCA3 — uchovávejte při teplotě 2 °C až 8 °C od příjmu až do doby použitelnosti označené na štítku

<b>Symbol</b>	<b>Složka</b>	<b>Množství</b>
<b>CAL</b>	<b>PCA3 kalibrátor 1</b> <i>Fosfátem pufovaný roztok obsahující &lt; 5 % lithium lauryl sulfátu.</i>	1 x 2,0 ml
<b>CAL</b>	<b>PCA3 kalibrátory 2-5</b> <i>Neinfekční PCA3 nukleová kyselina ve fosfátem pufovaném roztoku obsahujícím &lt;5 % lithium lauryl sulfátu.</i>	4 x 1,7 ml
<b>PC</b>	<b>PCA3 pozitivní kontroly</b> <i>Neinfekční PCA3 nukleová kyselina ve fosfátem pufovaném roztoku obsahujícím &lt;5 % lithium lauryl sulfátu.</i>	2 x 1,7 ml
	<b>Informační list koncentrací PCA3</b>	1 list

**Souprava Progensa PSA, 100 reakcí**

Chladicí krabice Progensa PSA — uchovávejte při teplotě 2 °C až 8 °C od příjmu až do doby použitelnosti označené na štítku

<b>Symbol</b>	<b>Složka</b>	<b>Množství</b>
<b>A</b>	<b>PSA amplifikační reagentie</b> <i>Neinfekční nukleové kyseliny vysušené v pufovaném roztoku HEPES obsahujícím &lt;10 % objemového činidla.</i>	1 lahvička
<b>E</b>	<b>Enzymatická reagentie PCA3/PSA</b> <i>Reverzní transkriptáza a RNA polymeráza vysušená v pufovaném roztoku HEPES obsahujícím &lt;10 % objemového činidla.</i>	1 lahvička
<b>P</b>	<b>Reagentie sondy PSA</b> <i>Neinfekční chemiluminiscenční DNA sondy vysušené v sukcinátem pufovaném roztoku obsahujícím &lt;5 % objemového činidla a &lt;5 % lithium lauryl sulfátu.</i>	1 lahvička

Krabice s pokojovou teplotou Progensa PSA — uchovávejte při teplotě 15 °C až 30 °C od příjmu až do doby použitelnosti označené na štítku

Symbol	Složka	Množství
AR	<b>PSA amplifikačně rekonstituční roztok</b> <i>Vodný roztok obsahující konzervační látky (&lt;1 % parabenů).</i>	1 x 9,3 ml
ER	<b>PCA3/PSA enzymatický rekonstituční roztok</b> <i>Pufrovaný roztok HEPES obsahující surfaktant (10 % Triton X-100) a 20 % glycerol.</i>	1 x 3,3 ml
PR	<b>PCA3/PSA rekonstituční roztok sondy</b> <i>Sukcinátem pufrovaný roztok obsahující &lt;5 % lithium lauryl sulfátu.</i>	1 x 12,4 ml
S	<b>PCA3/PSA selekční reagenty</b> <i>Borátem pufrovaný roztok obsahující surfaktant (1 % Triton X-100).</i>	1 x 31 ml
TCR	<b>PSA reagenty zachycující cíl</b> <i>Neinfekční nukleová kyselina v pufrovaném roztoku HEPES obsahující pevnou fázi.</i>	1 x 22 ml
	<b>Uzavírací karty</b>	1 balení
	<b>Rekonstituční objímky</b>	1 balení

Souprava kalibrátoru a kontrol Progensa PSA — uchovávejte při teplotě 2 °C až 8 °C od příjmu až do doby použitelnosti označené na štítku

Symbol	Složka	Množství
CAL	<b>PSA kalibrátor 1</b> <i>Fosfátem pufrovaný roztok obsahující &lt; 5 % lithium lauryl sulfátu.</i>	1 x 2,0 ml
CAL	<b>PSA kalibrátory 2-5</b> <i>Neinfekční PSA nukleová kyselina ve fosfátem pufrovaném roztoku obsahujícím &lt;5 % lithium lauryl sulfátu.</i>	4 x 1,7 ml
PC	<b>PSA pozitivní kontroly</b> <i>Neinfekční PSA nukleová kyselina ve fosfátem pufrovaném roztoku obsahujícím &lt;5 % lithium lauryl sulfátu.</i>	2 x 1,7 ml
	<b>Informační list koncentrací PSA</b>	1 list

**Kapaliny testu Aptima** — uchovávání při teplotě 15 °C až 30 °C (2 krabice) od příjmu až do doby použitelnosti označené na štítku

Symbol	Složka	Množství
W	<b>Promývací roztok</b> <i>Pufrovaný roztok HEPES obsahující &lt;2 % dodecyl sulfátu sodného.</i>	1 x 402 ml
DF	<b>Pufr pro deaktivční kapalinu</b> <i>Bikarbonátový pufrovaný roztok.</i>	1 x 402 ml
O	<b>Olejová reagentie</b> <i>Silikonový olej.</i>	1 x 24,6 ml

**Poznámka:** Veškeré materiály, které jsou součástí soupravy testu Progens PCA3, je možné zakoupit také samostatně (viz kapitola Materiály, kde jsou uvedeny podrobnosti).

## Materiály

**Poznámka:** Informace o H-větách a P-větách, které mohou být spojeny s reagensy, naleznete v knihovně bezpečnostních listů (Safety Data Sheet Library) na adrese [www.hologic.com/sds](http://www.hologic.com/sds).

**Poznámka:** Materiály dostupné od společnosti Hologic mají uvedená katalogová čísla.

### Potřebný materiál, který se dodává zvlášť

	<u>Kat. č.</u>
Přepravní souprava pro vzorky moči Progensa PCA3	302352
Luminometr Leader HC+	104747
Systém zachycení cíle Hologic (Hologic Target Capture System - TCS)	104555
Souprava Aptima Auto Detect	301048
2 opakovací pipety eppendorf Repeater Plus	105725
Špičky pro opakovací pipety (2,5 ml, 5,0 ml a 25,0 ml)	—
Buď:	—
2 vícezkumavkové vířivé mixéry	102160F
3 cirkulační vodní lázně (62 °C ± 1 °C, 42 °C ± 1 °C, 62 °C ± 1 °C)	104586F
3 distanční vložky pro vodní lázeň	104627
NEBO	
2 lázně/vířivky se suchým teplem SB100	105524F
Mohou být nutné další přístroje SB100 v závislosti na požadovaném výkonu throughput	
Mikropipetor, 1000 µl RAININ PR1000	901715
Špičky, 1000 µl P1000	105049
Pipetor, eppendorf 20 až 200 µl	105726
Špičky, pipeta 20 až 200 µl	—
Bělidlo, 5% až 7% (0,7 M až 1,0 M) roztok chlornanu sodného	—
Plastový kontejner s velkým uzávěrem	—
Standardní kontejnery na sběr moči, bez konzervačních látek	—
Jednotky deseti zkumavek (Ten Tube Unit - TTU)	TU0022
Kazety s deseti špičkami (Ten Tip Cassette - TTC)	104578
Kalibrační standard SysCheck	301078

### Volitelné materiály

	<u>Kat. č.</u>
Souprava Progensa PCA3, 100 reakcí	302354
Souprava Progensa PSA, 100 reakcí	302357
Souprava kalibrátorů a kontrol Progensa PCA3	302353



	<u>Kat. č.</u>
Souprava kalibrátorů a kontrol Progensa PSA	302356
Technické panely Progensa PCA3/PSA	302350
Souprava pro ředění vzorku Progensa PCA3	302351
Souprava kapalin pro test Aptima	302002C
Jednorázové pipetové špičky s filtrem (1 ml)	10612513 (Tecan)
TECAN Freedom EVO 100/4	900932
<i>Souprava PCA3 Deck Plate, DTS 800</i>	902021
<i>Nádržka na reagentie (40 ml čtvrtkový modul)</i>	104765
<i>Rozdělená nádržka na reagentie (19 ml x 2čtvrtkový modul)</i>	901172
Transportní zkumavky	302521
Náhradní propichovací uzávěry	302520
Náhradní nepropichovací uzávěry	103036A

## Varování a bezpečnostní opatření

- A. Pouze pro diagnostické použití *in vitro*.
- B. Pouze pro export z USA.

### Související s laboratoří

- C. Používejte pouze dodávané nebo specifikované jednorázové laboratorní materiály.
- D. Používejte rutinní laboratorní bezpečnostní opatření. V určených pracovních prostorech nejezte, nepijte ani nekuřte. Při manipulaci se vzorky moči a reagensy soupravy používejte jednorázové rukavice bez talku, ochranu očí a laboratorní pláště. Po manipulaci se vzorky moči a reagensy soupravy si důkladně umyjte ruce.
- E. **Varování: Dráždivé, žíravina.** Zamezte styku reagensů Auto Detect 1 a Auto Detect 2 s kůží, očima a sliznicemi. Pokud se tyto kapaliny dostanou do styku s kůží nebo očima, omyjte postiženou oblast vodou. Pokud dojde k vylití kapalin, rozředte je vodou předtím, než je vytřete do sucha.
- F. Pracovní povrchy, pipetory a jiné vybavení musí být pravidelně dekontaminovány pomocí 2,5% až 3,5% (0,35 M až 0,5 M) chlornanu sodného (roztok bělidla) (viz *Poznámky k postupu*).
- G. Důrazně se doporučuje použití samostatné poamplifikační oblasti, aby se minimalizovala kontaminace amplikonu v testu. Tato vyhrazená oblast by měla být mimo preamplifikační oblast, kde probíhá příprava reagensie, zachycení cíle a amplifikace.
- H. Chcete-li zabránit kontaminaci laboratorní oblasti amplikonem, měla by být laboratorní oblast zorganizována v jednosměrném pracovním toku od přípravy reagensie do poamplifikační oblasti. Vzorky, zařízení a reagensie se nesmí vracet do oblasti, kde byl proveden předchozí krok. Personál by se neměl pohybovat zpět do předchozí pracovní oblasti bez řádného zabránění kontaminaci.

### Související s vzorkem

- I. Po přidání moči musí být na začátku hladina kapaliny v transportní zkumavce pro vzorek moči mezi dvěma černými indikátorovými linkami na štítku zkumavky. Jinak musí být vzorky odmítnuty.
- J. Při přepravě vzorků dodržujte správné podmínky uchovávání, aby byla zajištěna integrita vzorku. Stabilita vzorku nebyla hodnocena za jiných přepravních podmínek než těch, které jsou doporučeny.
- K. Data použitelnosti uvedená na sběrné soupravě se vztahují na místo sběru a nikoliv na testovací zařízení. Vzorky odebrané kdykoliv před datem použitelnosti sběrné soupravy a přenášené a uchovávané v souladu s příbalovou informací, jsou platné pro testování, dokonce i v případě, že uplynula doba použitelnosti sběrné zkumavky.
- L. Uchovávejte všechny vzorky při specifikovaných teplotách. Provedení testu může být ovlivněno použitím nesprávně uchovávaných vzorků. Viz *Sběr, transport a uchovávání vzorku*, kde jsou uvedeny specifické pokyny.

- M. Vzoroky moči mohou být infekční. Při provádění tohoto testu dodržujte univerzální bezpečnostní opatření. Metody správné manipulace a likvidace musí stanovit ředitel laboratoře. Tento postup by měl provádět pouze adekvátně kvalifikovaný personál, který je vyškolený v použití testu Progensa PCA3 a adekvátně vyškolený v zacházení s infekčními materiály.
- N. Během manipulace s vzorkem zamezte zkřížené kontaminaci. Vzoroky moči mohou obsahovat vysoké hladiny cílové RNA. Ujistěte se, že nejsou nádoby na vzorky ve vzájemném kontaktu a použité materiály vyhodte, aniž byste je přenášeli nad otevřenými nádobami. Pokud dojde ke kontaktu rukavic se vzorkem moči, vyměňte je, abyste zabránili zkřížené kontaminaci.

### Související s testem

- O. Nepoužívejte tuto soupravu po uplynutí doby použitelnosti.
- P. **U soupravy testu Progensa PCA3 nezaměňujte, nemíchejte ani nekombinujte reagentie testu PCA3 různých čísel šarží** (tj. pro každý analyt musí být reagentie testu pocházející z chlazené krabice a z krabice s pokojovou teplotou ze stejné šarže). Reagentie testu lze používat s různými šaržemi kalibračních a kontrolních souprav. Soupravy kapalin pro test Aptima jsou zaměnitelné. U souprav reagentií PCA3 a PSA není nutná vzájemná shoda.
- Q. Uchovávejte všechny reagentie testu při uvedených teplotách. Provádění testu může být ovlivněno použitím nesprávně uchovávaných činidel testu. Viz *Požadavky na uchovávání a manipulaci a Poznámky k postupu*, kde jsou uvedeny specifické pokyny.
- R. Pro deaktivaci testu (viz *Postup testu*) musí být koncentrace chlornanu sodného minimálně 2,5 % (0,35 M) **po** zředění 1:1 s deaktivčním puftrem. Proto musí být výchozí roztok chlornanu sodného 5% až 7% (0,7 M až 1,0 M), aby se dosáhlo konečné koncentrace nutné pro deaktivaci.
- S. Je nutné použít špičky s hydrofobními zátkami. Minimálně dva opakovací pipetory musí být určeny pro použití s tímto testem: jeden pro použití v preamplifikačních krocích a jeden pro použití v poamplifikačních krocích. Jeden mikropipetor musí být vyhrazen výhradně pro použití při přenosu vzorku, pokud není použit přístroj TECAN Freedom EVO 100/4. Všechny pipetory se musí pravidelně čistit podle návodu v části *Poznámky k postupu*.
- T. Při použití opakovacích pipetorů pro přidání reagentie se špičkou pipetoru nedotýkejte reakční zkumavky, abyste zabránili přenosu z jedné zkumavky do druhé.
- U. Adekvátní míchání je nutné pro dosažení přesných výsledků testu. Úplné podrobnosti naleznete v *Poznámky k postupu*.
- V. Pro preamplifikační, amplifikační a poamplifikační kroky testu musí být vyhrazeny samostatné vodní lázně.
- W. Některé reagentie v této soupravě jsou označeny symboly rizika a bezpečnosti dle Evropské směrnice 1999/45/ES a mělo by se s nimi odpovídajícím způsobem zacházet. Listy s bezpečnostními údaji o materiálu je možné prohlížet na stránce [www.hologic.com](http://www.hologic.com) a jsou k dispozici na vyžádání.

## Požadavky na uchovávání a manipulaci

A. Informace o skladování reagensů naleznete v Tabulka 1.

Tabulka 1: Skladování reagensů

Reagencie / kapalina	Skladování v neotevřeném stavu	Stabilita po otevření/rekonstituci (do uplynutí doby použitelnosti)
Amplifikační reagencie	2 °C až 8 °C do uplynutí doby použitelnosti	30 dnů při teplotě 2 °C až 8 °C*
Reagencie sondy	2 °C až 8 °C do uplynutí doby použitelnosti	30 dnů při teplotě 2 °C až 8 °C*
Enzymatická reagencie	2 °C až 8 °C do uplynutí doby použitelnosti	30 dnů při teplotě 2 °C až 8 °C*
Reagencie zachycení cíle	15 °C až 30 °C do uplynutí doby použitelnosti	30 dnů při teplotě 15 °C až 30 °C
Amplifikačně rekonstituční roztok	2 °C až 30 °C do uplynutí doby použitelnosti	Neuplatňuje se (jedno použití)
Rekonstituční roztok sondy	2 °C až 30 °C do uplynutí doby použitelnosti	Neuplatňuje se (jedno použití)
Enzymatický rekonstituční roztok	2 °C až 30 °C do uplynutí doby použitelnosti	Neuplatňuje se (jedno použití)
Selekční reagencie	2 °C až 30 °C do uplynutí doby použitelnosti	30 dnů při teplotě 15 °C až 30 °C
Kalibrátory	2 °C až 8 °C do uplynutí doby použitelnosti	Neuplatňuje se (jeden cyklus testu)
Kontroly	2 °C až 8 °C do uplynutí doby použitelnosti	Neuplatňuje se (jeden cyklus testu)
Olejevá reagencie	15 °C až 30 °C do uplynutí doby použitelnosti	30 dnů při teplotě 15 °C až 30 °C
Promývací roztok	15 °C až 30 °C do uplynutí doby použitelnosti	30 dnů při teplotě 15 °C až 30 °C
Pufř pro deaktivaci kapaliny	15 °C až 30 °C do uplynutí doby použitelnosti	28 dnů při teplotě 15 °C až 30 °C

\* Může se používat znovu pro další cykly až čtyřikrát, za předpokladu, že celkový čas při pokojové teplotě není delší než 24 hodiny.

### B. Neuchovávejte reagensy zachycení cíle při teplotách pod 15 °C.

C. Reagencie sondy a rekonstituovaná reagencie sondy jsou fotosenzitivní. Chraňte tyto reagensy před nadměrnou expozicí světlu při uchovávání a přípravě pro použití.

### D. Reagencie nezmrazujte.

E. Reagencie ani kapaliny nepoužívejte po uplynutí doby použitelnosti.

F. Kalibrátory a kontroly PCA3 a PSA testu Progensa jsou lahvičky na použití v jednom cyklu a musí být po použití zlikvidovány.

G. Změny fyzikálního vzhledu dodané reagencie mohou znamenat nestabilitu nebo narušení těchto materiálů. Pokud jsou změny fyzikálního vzhledu reagensů viditelné po resuspendaci (např. jasné změny barvy reagencie nebo zakalení znamenající mikrobiální kontaminaci), kontaktujte před použitím technickou podporu společnosti Hologic.

H. Rekonstituovanou reagensy vyhodte po 30 dnech nebo po uplynutí doby použitelnosti, dle toho, co nastane dříve.

I. Zbylé otevřené nebo rekonstituované reagensy je možné použít v následujících testech, pokud byly uchovávány správně po úvodním použití. Zbylá reagensy může být smíchána s čerstvě připravenou nebo jinou zbylou reagensy stejné šarže. **Nezaměňujte, nemíchejte ani nekombinujte reagensy ze souprav s různými čísly šarží (viz Varování a bezpečnostní opatření).** Žádné součásti smíchaných reagensů nesmí překračovat skladovací meze otevřených nebo rekonstituovaných reagensů. Ujistěte se, že byla smíchaná reagensy důkladně promíchána a že byl připraven dostatečný objem reagensy pro celý cyklus testu.

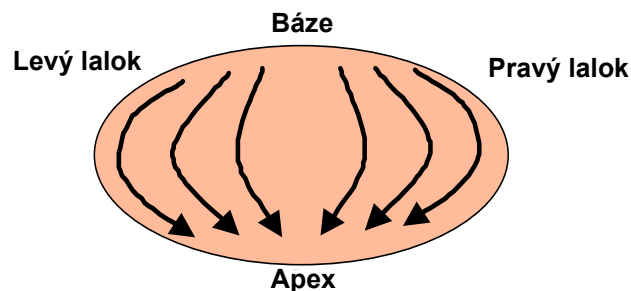
## Sběr, transport a uchovávání vzorku

Test Progensa PCA3 je navržen pro kvantifikaci PCA3 RNA a PSA RNA v první porci moči odebrané po vyšetření per rectum, které zahrnuje tři zmáčknutí každého laloku prostaty. Moč je zpracována pomocí soupravy na přepravu vzorků moči Progensa PCA3. Stabilita PCA3 RNA a PSA RNA v čerstvé a zpracované moči byla stanovena monitorováním hladin RNA kopií ve vzorcích moči odebraných dle pokynů uvedených níže.

### A. Pokyny pro sběr a zpracování vzorků moči:

1. Chcete-li zajistit odběr dostatečného množství moči, může pomoci, když pacient vypije větší množství vody (asi 500 ml).
2. Těsně před odběrem moči proveďte vyšetření per rectum dle níže uvedeného popisu:

Aplikujte na prostatu dostatečný tlak, abyste zamáčkli povrch asi o 1 cm a to proveďte u každého laloku od báze k apexu a ze strany do středu tak, jak ukazuje Obrázek 1. Na každý lalok zatlačte přesně třikrát. Účelem není provedení masáže prostaty.



**Obrázek 1. Správný směr aplikace tlaku na prostatu**

3. Po vyšetření per rectum řekněte pacientovi, aby odebral první porci moči (asi 20 až 30 ml na začátku proudu moči) do vhodným způsobem označeného kelímku na sběr moči. Toto musí být první vzorek moči, kterou pacient vymočí po vyšetření per rectum. Používejte odběrový kelímek bez jakýchkoliv konzervačních látek. Pokud pacient není schopen zastavit proud moči a vymočí více, než požadovaných 20 až 30 ml, uschovejte celý tento objem. Pokud není pacient schopen dodat požadovaný objem moči, je k provedení testu Progensa PCA3 nutných alespoň 2,5 ml moči. Jinak musí být vzorky odmítnuty.

**Poznámka:** Velmi vysoké objemy moči mohou snížit koncentrace analytů PCA3 and PSA a zřídka mohou vést k neplatnosti vzorku. Proto by se měl pacient pokusit, aby kelímek na sběr moči nenaplnil.

4. Pokud nejsou nezpracované vzorky moči okamžitě zpracovány, je třeba je uchovat při teplotě 2 °C až 8 °C nebo na ledu. Zchlazený a nezpracovaný vzorek moči je třeba přenést do přepravní zkumavky pro vzorek moči do čtyř hodin od odběru. Jinak musí být vzorek odmítnut a odebrán nový vzorek. **Nezpracované vzorky moči nezmrázujte.**
5. Chcete-li zpracovat vzorky moči, těsně uzavřete a pětikrát převraťte vzorek moči, aby došlo k resuspendaci buněk. Sejměte uzávěr přepravní zkumavky pro vzorek moči a přeneste 2,5 ml odebrané moči do zkumavky pomocí dodávané jednorázové přepravní pipety. Jakmile je hladina tekutiny mezi černými plnicími linkami na štítku přepravní zkumavky pro vzorek moči, znamená to, že byl přidán správný objem moči.
6. Zkumavku na přepravu vzorku moči znovu pevně uzavřete a pětikrát ji převraťte, aby se vzorek promíchal. Nyní je vzorek moči považován za zpracovaný.

## B. Přeprava a uchovávání vzorku před testováním:

1. Zpracované vzorky moči se musí přepravovat do laboratoře v přepravní zkumavce pro vzorek moči. Mohou být přepravovány při teplotě okolního prostředí (bez řízené teploty) nebo zmrazené. Přepravu zásilky je třeba domluvit předem, aby bylo zajištěno, že budou vzorky moči obdrženy testovacím centrem do 5 dnů od odběru.

Po přijetí zásilky musí laboratoř ověřit datum odběru vzorku na zkumavce. Pokud byly vzorky zaslány při teplotě okolního prostředí a jsou obdrženy více než 5 dnů po odběru vzorku, vzorek musí být odmítnut a musí být vyžádán nový vzorek. Laboratoř může uchovávat vzorky při teplotě 2 °C až 8 °C po dobu až 14 dnů předtím, než bude nutná jejich likvidace. Pokud potřebujete delší období, viz Tabulka 2, kde jsou uvedeny povolené doby skladování při různých teplotách.

Tabulka 2: Délka uchovávání zpracovaných vzorků moči

Teplota uchovávání	Doba
Uchovávání a přeprava zpracovaných vzorků:	až 5 dnů*
Po obdržení v testovacím centru:	
2 °C až 8 °C	až 14 dnů
-35 °C až -15 °C	až 11 měsíců**
při teplotě -65 °C nebo nižší	až 36 měsíců**

\*Čas povolený pro přepravu při teplotě okolního prostředí nebo ve zmrazeném stavu.

\*\*Čas povolený po skladování v chladničce.

2. Zpracované vzorky moči mohou podstoupit až pět cyklů zmrazení a rozmrazení.

## C. Uchovávání vzorků po testování:

1. Vzorky musí být po provedení testu uloženy vertikálně ve stojanu.
2. Přepravní zkumavky na vzorky moči by měly být zakryty novou čistou plastovou nebo foliovou bariérou, pokud nejsou znovu zakryty neporušenou krytkou.
3. Pokud je třeba testované vzorky zmrazit nebo přepravit, odstraňte propichovací uzávěr a na transportní zkumavky na vzorky moči umístěte nový nepropichovací uzávěr. Pokud je třeba vzorky odeslat pro testování do jiného zařízení, je nutno dodržovat doporučené teploty. **Zabraňte rozstříkávání a zkřížené kontaminaci.**

**Poznámka:** Vzorky se musí přepravovat v souladu s příslušnými státními a mezinárodními přepravními předpisy.

## Postup testu

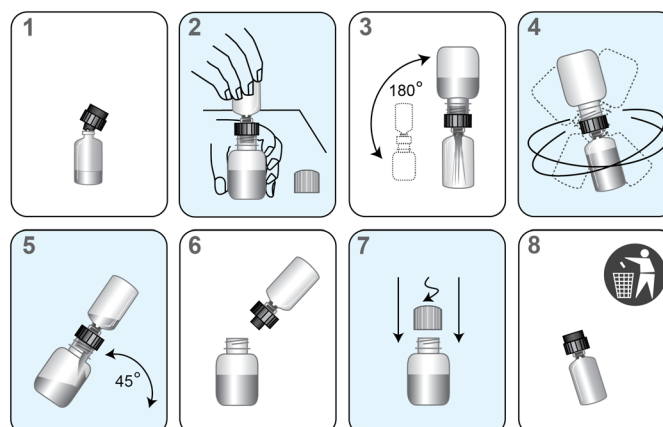
### A. Příprava pracovního místa

1. Nastavte jednu vodní lázeň na  $62\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  pro preamplifikaci, druhou vodní lázeň na  $42\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  pro amplifikaci a třetí vodní lázeň na  $62\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  pro poamplifikaci. Ujistěte se, že vodní lázně obsahují dostatek vody (viz *Poznámky k postupu*). Pokud používáte lázeň/vířivku se suchým teplem SB100, přečtěte si *aplikační list lázně/vířivky se suchým teplem SB100 pro test Progensa PCA3 (aplikační list SB100)*.
2. Před zahájením testu otřete pracovní povrchy a pipety 2,5% až 3,5% (0,35 M až 0,5 M) roztokem chlornanu sodného. Roztok chlornanu sodného nechte v kontaktu s povrchy a pipety po dobu minimálně 1 minuty a pak opláchněte vodou. Roztok chlornanu sodného nenechte zaschnout. Zakryjte pracovní plochu, na níž bude reakce provedena, čistým absorpčním laboratorním krytem na pracovní desky, který je potažen z jedné strany plastem.
3. Umístěte dostatečný počet kazet s deseti špičkami do systému pro zachycení cíle (TCS). Ujistěte se, že je promývací láhev TCS naplněna promývacím roztokem a že je aspirátor připojen k vakuovému čerpadlu. (Viz *provozní příručka systému zachycení cíle (Target Capture System Operator's Manual)*.)

### B. Rekonstituce a příprava reagensie

Rekonstituce reagensie by měla být provedena před zahájením přenosu vzorku.

1. Chcete-li rekonstituovat amplifikační reagensie, enzymatické reagensie a reagensie sondy, zkombinujte lahve lyofilizované reagensie s rekonstitučním roztokem. V případě uložení v chladničce nechejte rekonstituční roztoky před použitím dosáhnout pokojové teploty.



**Obrázek 2. Rekonstituční proces**

- a. Spárujte odpovídající rekonstituční roztok s jeho suchou reagensií. Ověřte si, že mají lahvičky štítky shodné barvy, aby bylo zajištěno správné spárování.
- b. Otevřete lahvičku se suchou reagensií a pevně zasuňte konec rekonstituční objímky s drážkou do otvoru v lahvičce (Obrázek 2, krok 1).
- c. Otevřete odpovídající rekonstituční roztok a umístěte uzávěr na čistý zakrytý pracovní povrch. Držte láhev s roztokem na pracovní desce a pevně zasuňte druhý konec rekonstituční objímky do otvoru v láhvi (Obrázek 2, krok 2).
- d. Sestavené lahve pomalu převraťte. Nechte roztok vytéct z láhve do skleněné lahvičky (Obrázek 2, krok 3). Vyčkejte, až se lyofilizovaná reagensie rozpustí

- a pak roztokem jemně ve skleněné lahvičce míchejte, aby se promíchal. Při kroužení láhvi zamezte vzniku pěny (Obrázek 2, krok 4).
- e. Obráťte sestavu a skloňte v úhlu 45°, abyste minimalizovali vznik pěny (Obrázek 2, krok 5). Nechte veškerou kapalinu natéct zpět do plastové lahve.
  - f. Sejměte rekonstituční objímku a skleněnou lahvičku (Obrázek 2, krok 6).
  - g. Znovu uzavřete plastovou lahev (Obrázek 2, krok 7). Na všech lahvičkách s rekonstituovanými reagensy zaznamenejte iniciály obsluhy a datum rekonstituce. Ujistěte se, že na lahvičky reagensy sondy zaznamenáte analyt (PCA3 nebo PSA).
  - h. Rekonstituční objímku a skleněnou lahvičku zlikvidujte (Obrázek 2, krok 8).
2. Dříve rekonstituované reagensy sondy, amplifikační a enzymatické reagensy musí před zahájením testu dosáhnout pokojovou teplotu (15 °C až 30 °C). Přečtěte si *Požadavky na uchování a manipulaci*, pokud smícháváte zbytky reagensů dohromady. Pokud rekonstituovaná amplifikační reagensy obsahuje precipitát, který se při pokojové teplotě nerozpouští, zahřívějte ji v preamplifikační oblasti při teplotě 62 °C ± 1 °C po dobu 1 až 2 minut. Pokud rekonstituovaná reagensy sondy obsahuje precipitát, který se při pokojové teplotě nevrací do roztoku, zahřívějte ho v poamplifikační oblasti při teplotě 62 °C ± 1 °C po dobu 1 až 2 minut. Po těchto zahřívacích krocích mohou být rekonstituované reagensy použity dokonce i v případě, že zůstává reziduální precipitát. Po resuspendaci promíchejte lahvičky jemným převrácením.

### C. Příprava stojanu

Opakovací pipetor používaný pro zachycení cíle, přenos vzorků a amplifikaci musí být vyhrazen pro použití pouze v těchto krocích (viz *Varování a bezpečnostní opatření*).

1. Nastavte jeden stojan pro analyt PCA3 a další stojan pro analyt PSA.

**Poznámka:** Pokud je počet vzorků dostatečně nízký, oba analyty je možné testovat v jednom stojanu. Pokud používáte přístroj TECAN Freedom EVO 100/4, musí být pro každý analyt vyhrazeny samostatné stojany. Je možné testovat maximálně dva plné stojany (20 TTU) najednou.

2. Do stojanu(ů) na jednotku deseti zkumavek (TTU) umístěte dostatek jednotek TTU pro kalibrátory, kontroly a vzorky pro každý analyt.
3. Označte TTU pomocí identifikačního čísla vzorku. Tabulka 3 popisuje způsob přidání kalibrátorů, kontrol a vzorků. Spusťte PSA kalibrátory na nové TTU.

**Poznámka:** Kalibrátory by měly být testovány ve třech replikátech a kontroly ve dvou replikátech a musí být testovány ve stejném stojanu jako vzorky. Vzorky je třeba testovat v duplikátu. Nenechávejte prázdné reakční zkumavky mezi kalibrátory, kontrolami a vzorky. Pokud používáte přístroj TECAN Freedom EVO 100/4, přečtěte si aplikační list k přístroji TECAN Freedom EVO 100/4 pro test Progensa PCA3 (aplikační list TECAN Freedom EVO), kde jsou uvedeny další pokyny.



Tabulka 3: Příklad nastavení stojanu

Poloha stojanu	Popis vzorku	*Koncentrace cíle PCA3 (kopie/ml)	*Koncentrace cílového PSA (kopie/ml)
1 až 3	Kalibrátor 1	0	0
4 až 6	Kalibrátor 2	250	7 500
7 až 9	Kalibrátor 3	2 500	75 000
10 až 12	Kalibrátor 4	25 000	750 000
13 až 15	Kalibrátor 5	125 000	3 000 000
16 až 17	Kontrola A	1 250	37 500
18 až 19	Kontrola B	62 500	1 500 000
20 až n	Vzorek	neznámé	neznámé

\*Pozitivní kalibrátory a kontroly PCA3 a PSA jsou přiděleny dle hodnoty, takže aktuální hodnoty kopií/ml pro kalibrátory 2 až 5 a kontroly A a B budou lehce odlišné než u cílových koncentrací uvedených v tabulce a budou se lišit mezi jednotlivými šaržemi. Informace o koncentracích jsou poskytovány na kartě v balení lahvíček kalibrátorů a kontrol a jsou použity pro kalibraci a stanovení validity cyklu.

D. Verifikace informací o koncentraci

Ověřte si u administrátora systému softwaru testu Progensa PCA3, že informace o koncentraci pro šarže souprav kalibrátorů a kontrol testu Progensa PCA3 a PSA byly zadány. Pro více informací si přečtete *stručnou referenční příručku pro test Progensa PCA3 (Quick Reference Guide for Progensa PCA3 Assay)* nebo *příručku systémového administrátora softwaru testu Progensa PCA3 (Progensa PCA3 Assay Software System Administrator's Manual)*.

**Poznámka:** Zadání informací o koncentraci je vyžadováno **před prvním použitím** každé nové šarže soupravy kalibrátorů a kontrol. Následné cykly využívající kalibrátory a kontroly ze stejné šarže soupravy nevyžadují další opatření.

E. Nastavení editoru pracovního seznamu

Vytvořte pracovní seznam cyklu pomocí editoru pracovního seznamu Hologic na počítači, který se nachází v preamplifikační oblasti. Pro použití editoru pracovního seznamu si přečtete *stručnou referenční příručku (Quick Reference Guide)* nebo *provozní příručku editoru pracovního seznamu Hologic (Hologic Worklist Editor Operator's Manual)*. Pokud používáte přístroj TECAN Freedom EVO 100/4, přečtete si také *aplikační seznam TECAN Freedom EVO*, kde jsou uvedeny další pokyny.

F. Příprava vzorku

1. Před testováním ponechte kalibrátory a kontroly dosáhnout pokojovou teplotu. Promíchejte lahvičky jemným převrácením.
2. Před testováním ponechte vzorky dosáhnout pokojovou teplotu. **Vzorky nemíchejte vířením.** Vzorky je třeba míchat občasným jemným převrácením během zahřívacího období. Viz *Poznámky k postupu*, kde jsou uvedeny informace o precipitátu, který nepřejde do roztoku, a manipulaci se zmrazenými vzorky.

G. Preamplifikace

Preamplifikační prostředí musí mít teplotu 15 °C až 30 °C. Uskutečňte cyklus obou stojanů paralelně. Pokud používáte lázeň/vířivku se suchým teplem SB100, přečtete si *aplikační list SB100*. Pokud používáte přístroj TECAN Freedom EVO 100/4, přečtete si *aplikační list TECAN Freedom EVO*, kde jsou uvedeny další pokyny.

1. Reagencii zachycení cíle (TCR) důkladně promíchejte vířením nebo převrácením. Za použití opakovacího pipetoru přidejte do odpovídající reakční zkumavky 100  $\mu$ l TCR specifického pro analyt.
2. Propíchněte uzávěr lahvičky kalibrátoru mikropipetorem a přidejte 400  $\mu$ l kalibrátoru k řádně označené reakční zkumavce. Za použití stejné špičky pipety odeberte přidaný replikát z lahvičky přes propíchnutou krytku. Pro každou lahvičku kalibrátoru používejte nové pipetové špičky. Opakujte stejný postup pro přidání kontrol a vzorků. Zakryjte a uchovejte veškerý zbylý vzorek a uložte ho při teplotě 8 °C nebo nižší (viz *Sběr, transport a uchovávání vzorku* pro více informací) pro případ, že bude nutné opakování testu.
3. Zakryjte TTU uzavírací kartou(kartami) a stojanem jemně rukou zatřepete. **Neumíst'ujte do vířivky.** Stojan inkubujte při teplotě 62 °C  $\pm$  1 °C ve vodní lázni po dobu 30  $\pm$  5 minut.
4. Vyjměte stojan z vodní lázně a osušte spodní části zkumavek na absorpčním materiálu.
5. Ujistěte se, že jsou uzavírací karty pevně usazeny. Pokud je to nutné, vyměňte je za nové uzavírací karty a TTU řádně uzavřete.
6. Stojan míchejte vířením po dobu 60 sekund ve vířivém mixéru pro více zkumavek (viz *Poznámky k postupu*). Začněte s vířením do 2 minut od vyjmutí stojanu z vodní lázně.
7. Neodstraňujte uzavírací karty a stojan inkubujte při pokojové teplotě po dobu 30  $\pm$  5 minut.
8. Umístěte stojan s předním štítkem směrem dopředu na magnetickou bázi TCS na dobu 5 až 10 minut. Vložte TTC do stojanu.
9. Naplňte hadičky rozdělovací čerpací stanice načerpáním promývacího roztoku přes rozdělovací potrubí. Načerpejte dostatek kapaliny do systému, aby nebyly v hadičce přítomné žádné vzduchové bubliny a všech deset trysek dodávalo stabilní proud kapaliny.
10. Zapněte vakuové čerpadlo a odpojte aspirační potrubí na prvním konektoru mezi aspiračním potrubím a záchytnou láhví. Zkontrolujte, že měřidlo vakua splňuje specifikace zkoušky těsnosti. Hodnotu získáte po 15 sekundách. Znovu připojte potrubí a zajistěte, že měřidlo vakua splňuje specifikace zkoušky těsnosti. Ponechejte vakuové čerpadlo zapnuté do dokončení všech kroků zachycení cíle a dokud nebude aspirační potrubí suché.  
  
Viz list specifikací vakua pro systém zachycení cíle na zadní straně *provozní příručky systému zachycení cíle (Target Capture System Operator's Manual)* nebo se obraťte na technickou podporu společnosti Hologic, chcete-li získat další informace.
11. Pevně připojte aspirační potrubí k první sadě špiček. Zanořte špičky do první jednotky TTU, až se dotknou povrchu kapaliny. Při pohybu špiček směrem dolů udržujte špičky v kontaktu s povrchem kapaliny, až se špičky dostanou do krátkého kontaktu se dny zkumavek. Jemně poklepejte špičkami o dno zkumavek, až dojde k odstranění veškeré kapaliny. Neudržujte špičky v kontaktu se dny zkumavek příliš dlouho a neklepejte špičkami rychle, aby nedošlo v záchytném vakuovém prostoru k vytvoření nadměrné pěny.

12. Po dokončení aspirace vysuňte špičky do jejich původní kazety. Opakujte aspirační kroky pro zbývající TTU a přitom používejte vyhrazenou špičku pro každou reakční zkumavku.
13. Umístěte rozdělovací potrubí nad každou TTU a za použití čerpadla rozdělovací stanice aplikujte 1,0 ml promývacího roztoku do každé zkumavky TTU.
14. Zakryjte zkumavky uzavírací kartou a vyjměte stojan z TCS. Jednou promíchejte vířením ve vířivém mixéru pro více zkumavek. Další informace viz *Poznámky k postupu*.
15. Stojan umístěte na magnetickou bázi TCS na 5 až 10 minut.
16. Aspirujte veškerou kapalinu jako v kroky 11 a krok 12.
17. Po poslední aspiraci vyjměte stojan z báze TCS a vizuálně zkontrolujte zkumavky, abyste se ujistili, že byla aspirována veškerá kapalina a že všechny zkumavky obsahují pelety magnetických částic. Pokud je viditelná jakákoliv kapalina, umístěte stojan zpět na bázi TCS na 2 minuty a opakujte aspiraci pro tuto TTU pomocí stejných špiček použitých předtím pro každou reakční zkumavku. Pokud bude JAKÁKOKLIV peleta magnetické částice viditelná po dokončení aspirace, zkumavku je možné akceptovat. Pokud nebude viditelná žádná peleta, vzorek je třeba testovat znovu. Pokud při následujícím cyklu stejný vzorek neobsahuje pelety magnetických částic v tomto kroku, může to znamenat problém se vzorkem. V takovém případě se doporučuje nový odběr vzorku moči.

#### H. Amplifikace

**Poznámka:** Přidání enzymu do reakčního stojanu (kroky 6 a krok 7 níže) musí být provedeno maximálně do 90 sekund.

Provedte Kroky 6 a 7 na jednom stojanu předtím, než to budete opakovat na druhém stojanu. Pokud používáte lázeň/vířivku se suchým teplem SB100, přečtěte si *aplikační list SB100*. Pokud používáte přístroj TECAN Freedom EVO 100/4, přečtěte si *aplikační list TECAN Freedom EVO*, kde jsou uvedeny další pokyny.

1. Pomocí opakovacího pipetoru přidejte 75 µl rekonstituované amplifikační reagentie specifické pro analyt do každé reakční zkumavky. Všechny reakční směsi ve stojanu by měly mít nyní červenou barvu.
2. Pomocí opakovacího pipetoru přidejte 200 µl olejové reagentie.
3. Zakryjte zkumavky uzavírací kartou a míchejte vířením ve vířivém mixéru pro více zkumavek.
4. Stojan inkubujte v preamplifikační vodní lázni při teplotě 62 °C ± 1 °C po dobu 10 ± 5 minut.
5. Přeneste stojan do vodní lázně o teplotě 42 °C ± 1 °C na 5 ± 2 minuty.
6. Stojan ponechejte ve vodní lázni a opatrně odstraňte uzavírací kartu; za použití opakovacího pipetoru přidejte 25 µl rekonstituované enzymatické reagentie do každé reakční směsi. Všechny reakce by měly mít nyní oranžovou barvu.
7. Okamžitě zakryjte všechny zkumavky čerstvou uzavírací kartou, vyjměte je z vodní lázně a rychle smíchejte jemným třepáním stojanu v ruce.

**Poznámka:** Minimalizujte čas, kdy je stojan mimo vodní lázeň, abyste předešli vychladnutí zkumavek.

8. Stojan inkubujte při teplotě 42 °C ± 1 °C po dobu 60 ± 5 minut.

## I. Po amplifikaci

Opakovací pipetor používaný při hybridizaci a selekci musí být vyhrazený pouze na tyto kroky (viz *Varování a bezpečnostní opatření*). Poamplifikační prostředí včetně detekce musí mít teplotu 15 °C až 30 °C. Pokud používáte lázeň/vířivku se suchým teplem SB100, přečtěte si *aplikační list SB100*.

## 1. Hybridizace

- a. Vyjměte stojan z preamplifikační vodní lázně a přeneste ho do poamplifikační oblasti. Přidejte 100 µl rekonstituované reagentie sondy specifické pro analyt za použití opakovacího pipetoru. Všechny reakční směsi by měly mít nyní žlutou barvu.
- b. Zakryjte zkumavky uzavírací kartou a míchejte vířením ve vířivém mixéru pro více zkumavek po dobu 10 sekund, nebo dokud nebude barva uniformní.
- c. Inkubujte stojan při teplotě 62 °C ± 1 °C ve vodní lázni po dobu 20 ± 5 minut.
- d. Vyjměte stojan z vodní lázně a inkubujte při pokojové teplotě po dobu 5 ± 1 minuta.

## 2. Výběr

- a. Opakovacím pipetorem přidejte 250 µl selekční reagentie do každé zkumavky. Všechny reakce by měly mít nyní růžovou barvu.
- b. Zakryjte zkumavky uzavírací kartou, míchejte vířením po dobu 10 sekund, nebo dokud nebude barva uniformní a stojan inkubujte ve vodní lázni při teplotě 62 °C ± 1 °C po dobu 10 ± 1 minuta.
- c. Vyjměte stojan z vodní lázně. Stojan inkubujte při pokojové teplotě po dobu 15 ± 3 minuty.

## J. Detekce

Chcete-li použít luminometr Leader HC+, přečtěte si *provozní příručku luminometru Leader HC+ (Leader HC+ Luminometer Operator's Manual)*. Chcete-li použít software testu Progensa PCA3, přečtěte si *stručnou referenční příručku (Quick Reference Guide)* nebo *příručku systémového administrátora softwaru testu Progensa PCA3 (Progensa PCA3 Assay Software System Administrator's Manual)* a *provozní příručku testu Progensa PCA3 (Progensa PCA3 Assay Operator's Manual)*.

1. Připravte luminometr Leader HC+ umístěním jedné prázdné TTU do pozice kazety číslo 1 a jednou proveďte PROMÝVACÍ protokol.
2. Ujistěte se, že jsou přítomny dostatečné objemy reagentií Auto Detect 1 a Auto Detect 2 pro dokončení reakcí.
3. Vložte TTU do luminometru dle diagramu v luminometru jako vodítka. Pokud testujete oba analyty (těsně za sebou), vložte nejprve všechny jednotky TTU pro PCA3 a těsně za nimi všechny TTU pro PSA.
4. Přihlaste se do počítače. Klikněte na **NEW RUN** (Nový cyklus) a zvolte odpovídající protokol testu a koncentrace. Klepněte na **NEXT** (Další) a zahajte cyklus.

**Poznámka:** *Cyklus musí být dokončen do 2 hodin od konce inkubačního kroku selekce při teplotě 62 °C.*

5. Připravte deaktivální roztok smícháním stejných objemů 5% až 7% (0,7 M až 1,0 M) roztoku chlornanu sodného a pufru pro deaktivální kapalinu v plastovém kontejneru s velkým uzávěrem. Plastový kontejner označte štítkem a na štítek napište datum expirace. Deaktivální kapalina je stabilní po dobu 4 týdnů při pokojové teplotě.

- Po dokončení cyklu vytvoří testový software dvě zprávy o cyklu, Raw Run Report (Zpráva nezpracovaného cyklu) a Ratio Report (Zpráva o poměru), v případě, že se jedná o po sobě jdoucí cykly (viz Postupy kontroly kvality a *Interpretace výsledků*).
- Po dokončení cyklu vyjměte použité TTU z luminometru a umístěte TTU do kontejneru s deaktivací kapalinou. Ponechte TTU v kontejneru po dobu alespoň 15 minut předtím, než je vyhodíte. Metody správné manipulace a likvidace musí stanovit ředitel laboratoře.

## Poznámky k postupu

### A. Příprava vzorku

- Pokud vzorky obsahují suspendované precipitáty, zahřívějte je na 37 °C po dobu až 5 minut a pak pokračujte jemným převrácením. V případě, že se precipitát znovu nerozpouští, ujistěte se, že nebrání dodávce vzorku.
- Zmrazené vzorky musí být rozmrazené při pokojové teplotě (15 °C až 30 °C, je možné použít vodní lázeň) s občasným převrácením při rozmrazování, aby se předešlo vzniku nerozpustné zátky. Promíchejte lahvičky jemným převrácením, jakmile se led uvnitř lahvičky dostatečně rozpustil, aby se uvolnil a mohl se volně pohybovat. Zahřívějte dále do úplného rozpuštění vzorku a lahvičky znovu promíchejte jemným převrácením.
  - Pokud se vytvoří zátka a vzorky budou pipetovány pomocí zařízení TECAN Freedom EVO 100/4, znovu je zmrazte, opakujte pokyny pro rozmrazení a zajistěte, že nevznikne žádná zátka. Pokud nejste schopni vznik zátky vyloučit, je třeba vzorek pipetovat rukou.
  - Pokud se vytvoří zátka a vzorky se pipetují rukou a mikropipetorem, není nutné žádné další opatření, ale ujistěte se, že zátka nebrání dodání vzorku.

### B. Pipetování kontroly, kalibrátoru a vzorku

- Objem kalibrátoru, kontroly nebo vzorku přidaných do TTU by měl být 400 µl. Doporučuje se vizuální kontrola objemu pipetovaného do jednotky TTU, aby se zajistil přenos správného objemu. Správný objem je nutný pro dosažení přesných výsledků.
- Ujistěte se, že je pipetová špička správně umístěna na pipetoru a zkontroluje, že je objem správně nastaven. Doporučuje se vizuální kontrola nastavení objemu na konci každé TTU (každých 10 zkumavek). Při nabírání vzorku uvolňujte píst pipety pomalu stabilní rychlostí, abyste zabránili vzniku pěny a bublinek.

### C. Reagencie

- V rekonstitučním roztoku sondy může dojít během uchování ke vzniku precipitátu. Zahřívějte roztok při teplotě 62 °C ± 1 °C po dobu 1 až 2 minut. Po tomto zahřívacím kroku může být rekonstituční roztok sondy použitý dokonce i v případě, že zůstává reziduální precipitát. Po resuspendaci promíchejte lahvičku jemným převrácením.
- Při pipetování jiných činidel než enzymu mířte lehce ke straně spodní části reakční zkumavky (kde se spodní část zahýbá směrem ke stranám). Při pipetování enzymatické reagencie mířte do středu reakční zkumavky. Vizuálně si ověřte, že jsou reagencie rozdělovány správně (žádné nadměrné množství reagencie po stranách zkumavek a správná barevná změna).

### D. Teplota

- Kroky zachycení cíle, amplifikace, hybridizace a selekce jsou závislé na teplotě. Proto je zásadně důležité, aby se ve vodní lázni udržovala teplota v určeném rozsahu.

2. Pokojová teplota je definována jako 15 °C až 30 °C.

E. Doba

Reakce zachycení cíle, amplifikace, hybridizace a selekce jsou všechny závislé na čase. Dodržujte časy specifikované v *Postup testu*.

F. Víření

Správné víření je důležité pro úspěšné provedení testu Progensa PCA3. Pro reakce s vířením nastavte vířivý mixer pro více zkumavek na nejnižší rychlost, stojan zajistěte a zapněte. Pomalu zvyšujte rychlost, dokud kapalina nedosáhne poloviny zkumavky. Míchejte vířením po stanovenou dobu 10 sekund nebo dokud nebude barva uniformní. Před vypnutím vířivého mixéru pro více zkumavek nastavte rychlost na nejnižší nastavení a stojan vyjměte. Reakční směsi by se neměly nikdy dotýkat uzavíracích karet.

G. Vodní lázně

1. Hladina vody ve vodních lázních musí být udržována na 3,8 až 5,0 cm (1,5 až 2,0 in.), měřeno od podpurné kovové misky (na dně vodní lázně) k vodní hladině. To zajistí správný přenos tepla.
2. Chcete-li zabránit zkřížené kontaminaci, je třeba vodní lázně vyhradit pro specifický krok testu.

H. Dekontaminace

1. Povrchy a pipetory

Laboratorní pracovní povrchy a pipetory musí být pravidelně dekontaminovány pomocí 2,5% až 3,5% (0,35 M až 0,5 M) roztoku chlornanu sodného. Roztok chlornanu sodného nechte v kontaktu s povrchy po dobu minimálně 1 minuty a pak opláchněte vodou. **Roztok chlornanu sodného nenechte zaschnout.** Chlorové roztoky mohou působit na zařízení a kovu důlkovou korozi. Důkladně opláchněte zařízení vodou, abyste předešli vzniku koroze.

2. Aspirační potrubí TCS

Po každém použití:

- a. Posuňte rozdělovací potrubí stranou.
- b. Umístěte nové TTC do stojanu na TTC. Zapněte vakuové čerpadlo. Připojte aspirační potrubí ke špičkám v TTC. Aspirujte jakýkoliv zbyvajících promývací roztok v plnicím korýtku rozdělovací stanice.
- c. Nalijte alespoň 100 ml 0,5% až 0,7% (0,07 M až 0,1 M) nebo pokud je to preferováno, tak 2,5% až 3,5% (0,35 M až 0,5 M) roztoku chlornanu sodného do plnicího korýtku. Nasajte veškerý roztok přes aspirační potrubí.
- d. Nalijte alespoň 100 ml deionizované vody do plnicího korýtku. Nasajte veškerou vodu přes aspirační potrubí.
- e. Vysuňte špičky do jejich originální TTC.
- f. Ponechejte vakuové čerpadlo zapnuté, dokud nebudou hadičky potrubí suché, aby se zabránilo zpětnému toku (asi 3 minuty).
- g. Povrchy aspiračního potrubí dekontaminujte, jak je popsáno v *Jednotka systému zachycení cíle (TCS)*.

3. Odpadní kontejner systému zachycení cíle

Čistěte odpadní láhev minimálně jednou týdně, nebo když je odpadní láhev z 25% plná, dle toho co je dřív.

- a. Vypněte vakuové čerpadlo a nechejte vyrovnat podtlak.
- b. Uvolněte díly pro rychlé odpojení mezi odpadní láhví a přetékací láhví a mezi odpadní láhví a aspiračním potrubím.
- c. Odstraňte odpadní láhev z obalu přepadu podtlaku.
- d. Odstraňte uzávěr a pozorně přidejte 400 ml 5% až 7% (0,7 M až 1,0 M) roztoku chlornanu sodného do 4l odpadní láhve.

**Poznámka:** To je možné provést v digestoři, abyste předešli uvolnění výparů do laboratoře.

- e. Uzavřete odpadní láhev a opatrně vířte obsahem, dokud nebude zcela promíchán.
  - f. Ponechte odpadní láhev usadit minimálně 15 minut a pak obsah vyhodte (odpad).
  - g. Vypláchněte odpadní láhev vodou, abyste odstranili zbývající odpad, který je uvnitř.
  - h. Zavřete prázdnou odpadní láhev a umístěte ji do obalu přepadu podtlaku. Připojte díly pro rychlé odpojení k jednotce TCS. Opatrně zlikvidujte obě rukavice.
4. Jednotka systému zachycení cíle (TCS)

Otřete povrchy jednotky TCS, aspiračního potrubí a povrch ejetčních špiček promývacího pufru papírovými utěrkami navlhčenými 2,5% až 3,5% (0,35 M až 0,5 M) roztokem chlornanu sodného. Po kroku s roztokem chlornanu sodného pokračujte s oplachem vodou a potom povrchy úplně vysušte papírovými ručníky.

5. Stojany

Stojany ponořte do 2,5% až 3,5% (0,35 M až 0,5 M) roztoku chlornanu sodného tak, aby byly roztokem pokryty. Stojany nechte ponořené po dobu 10 minut. Delší expozice stojany poškodí. Opláchněte stojany důkladně vodou a pak je úplně osušte papírovými ručníky.

I. Kontaminace testu

1. Pokud není provádění testu věnována dostačující péče, může dojít k vniknutí kontaminujících materiálů.
2. Jednotky TTU musí být dekontaminovány deaktivací kapalinou, jak je popsáno v *Postup testu*. Jednotky TTU nepoužívejte opakovaně.
3. Proveďte pravidelnou dekontaminaci zařízení a pracovních povrchů, jak je popsáno výše v *Dekontaminace*.
4. Podobně jako u jiných systémů reagentů může nadbytek talku z některých rukavic způsobit kontaminaci otevřených zkumavek. Doporučuje se, aby obsluha používala rukavice bez talku.

## Postupy kontroly kvality

### A. Platnost cyklu

1. Kalibrátory a kontroly musí být používány se všemi testy a na stejném stojanu, jako testované vzorky. Je třeba dodržet následující kritéria, aby mohl být cyklus považován za platný:

Průměrná RLU kalibrátoru 2 > mezní hodnota RLU

Kde mezní hodnota RLU = průměrná RLU kalibrátoru 1  
+ 1,645 směrodatná odchylka kalibrátoru 1 RLU replikátů  
+ 1,645 směrodatná odchylka kalibrátoru 2 RLU replikátů.

Průměrná interpolovaná výtěžnost kalibrátoru 5 = 100 ± 30 %

Průměrná interpolovaná výtěžnost kontroly A = 100 ± 60 %

Průměrná interpolovaná výtěžnost kontroly B = 100 ± 35 %

2. Software PCA3 automaticky hodnotí výsledky s výše uvedenými kritérii a bude hlásit Run Status (Status cyklu) jako PASS (Splnil), pokud jsou splněna kritéria validity a FAIL (Nesplnil), pokud nejsou splněna kritéria validity.
3. Pokud je Run Status (Status cyklu) označen jako FAIL (Nesplnil), všechny výsledky testu ve stejném cyklu jsou pro daný analyt neplatné a nesmí být hlášeny.
4. Pokud je cyklus neplatný, musí být pro daný analyt opakován (viz *Interpretace výsledků*). Pokud je cyklus platný pro jiný analyt, mohou být takové výsledky použity při analýze dat s opakovaným platným cyklem prvního analytu.

### B. Validita vzorku

Při platném cyklu mohou být jednotlivé výsledky vzorků považovány za NEPLATNÉ a budou vyznačeny v Raw Run Report (Zpráva nezpracovaného cyklu) (viz *Interpretace výsledků*). I když mohou být jednotlivé replikáty vzorku platné, vzorek bude neplatný, pokud interpolovaný rozdíl kopií/ml mezi replikáty přesáhne 600 %. Testování vzorku na takový analyt musí být opakováno.



## Interpretace výsledků

### A. Typy zpráv

#### 1. Raw Run Report (Zpráva nezpracovaného cyklu)

Raw Run Report (Zpráva nezpracovaného cyklu) poskytuje informace o validitě cyklu (PASS (Splnil) nebo FAIL (Nesplnil); viz *Postupy kontroly kvality*) a o jednotlivých reakčních zkumavkách testovaných pomocí testu Progensa PCA3. Pokud je cyklus neplatný (FAIL (Nesplnil)), všechny zkumavky v takovém cyklu budou označeny jako neplatné. Nicméně jednotlivé zkumavky mohou být považovány za neplatné v rámci platného cyklu (PASS (Splnil)). Pro po sobě jdoucí cykly (tzn. analyty PCA3 i PSA byly testovány ve stejném cyklu testu) může být jeden cyklus analytu neplatný, zatímco druhý cyklus analytu může být platný.

Na konci Raw Run Report (Zpráva nezpracovaného cyklu) se nachází souhrn výjimek. Pro po sobě jdoucí cykly, kde jsou cykly obou analytů platné, mohou vzorky uvedené v souhrnu výjimek vyžadovat opakované testování u jednoho analytu. I když může být výsledek skóre PCA3 uveden v souhrnu výjimek, není tento výsledek považován za hlásitelný až do doby, kdy je provedeno manuální spárování a výsledek je uveden v Ratio Report (Zpráva o poměru). Pokud byl testován pouze jeden analyt nebo pokud je cyklus jednoho analytu neplatný, všechny testované vzorky budou uvedeny v souhrnu výjimek.

#### 2. Ratio Report (Zpráva o poměru)

Software testu generuje automaticky Ratio Report (Zpráva o poměru) pro po sobě jdoucí cyklus, kde jsou cykly obou analytů platné. Software vypočítá a uvádí seznam skóre PCA3 vzorků v Ratio Report (Zpráva o poměru). Vzorky uvedené v Ratio Report (Zpráva o poměru) nevyžadují buď žádné další testování, nebo musí být znovu testovány oba analyty. Vzorky, které nejsou uvedené v Ratio Report (Zpráva o poměru), budou uvedené v kapitole souhrn výjimek Raw Run Report (Zpráva nezpracovaného cyklu).

Ratio Report (Zpráva o poměru) může být také generována po manuálním spárování (viz *Manuální párování*, kde je uvedeno více informací).

#### 3. QC Report (Zpráva o kontrole kvality)

QC Report (Zpráva o kontrole kvality) uvádí kritéria validity cyklu, přiřazených a interpolovaných koncentrací a výtěžnosti kalibrátorů a kontrol. Zpráva uvádí také seznam parametrů, které definují čtyřparametrovou logistickou kalibrační křivku dávkou a odpovědi (3). Pro více informací si přečtěte *provozní příručku softwaru testu Progensa PCA3 (Progensa PCA3 Assay Software Operator's Manual)*.

### B. Párování

#### 1. Automatické párování

V po sobě jdoucích cyklech, kde jsou cykly obou analytů platné, páruje software automaticky jednotlivé výsledky analytu PCA3 a PSA pro vzorky a stanovuje skóre PCA3 (pokud ho lze vypočítat). Výsledky jsou uvedeny v Ratio Report (Zpráva o poměru) nebo souhrnu výjimek zprávy Raw Run Report (Zpráva nezpracovaného cyklu).

#### 2. Manuální párování

Jakmile jsou testovány analyty PCA3 a PSA v různých cyklech, software nemůže automaticky stanovit skóre PCA3. Manuální párování výsledků analytu je nezbytné pro stanovení skóre PCA3 nebo rozsahu skóre PCA3 (viz *stručná referenční příručka*

(*Quick Reference Guide*) nebo *provozní příručka softwaru testu Progensa PCA3 (Progensa PCA3 Assay Software Operator's Manual)*). Manuální párování může být také vyžadováno pro výsledky, které jsou uvedeny v souhrnu výjimek ve zprávě Raw Report (Zpráva nezpracovaného cyklu). Po manuálním spárování bude skóre PCA3 pro spárované vzorky uvedeno v nové Ratio Report (Zpráva o poměru).

## C. Interpretace zpráv

### 1. Skóre PCA3

**Poznámka: Pouze skóre PCA3 a rozsah skóre PCA3 uvedené v Ratio Report (Zpráva o poměru) jsou hlásitelné. Výsledky, které se objevují v souhrnu výjimek mohou vyžadovat další opatření a nejsou hlásitelné.**

Skóre PCA3 je vypočteno jako poměr kopií PCA3 RNA ke kopiím PSA RNA, vynásobeno 1 000. Skóre PCA3 mohou být vypočtena pouze pomocí výsledků z platných cyklů a vzorků. Neplatné cykly a neplatné vzorky musí být pro tento analyt opakovaně testovány (viz *Opakování testu*, kde je uvedeno více informací).

Pokud je hlášené skóre PCA3 pod mezní hodnotou, měl by být výsledek interpretován jako NEGATIVNÍ. Pokud je skóre PCA3 rovno mezní hodnotě nebo se nachází nad ní, měl by být výsledek interpretován jako POZITIVNÍ. Ředitel laboratoře stanoví mezní hodnotu (viz *Funkční charakteristiky*, kde je uvedeno více informací).

Za určitých podmínek je poskytován rozsah skóre PCA3 (>[Vypočtené skóre PCA3] nebo <[Vypočtené skóre]). Pokud je <[Vypočtené skóre PCA3] pod mezní hodnotou, výsledek by měl být interpretován jako NEGATIVNÍ. Pokud je >[Vypočtené skóre PCA3] nad mezní hodnotou, výsledek by měl být interpretován jako POZITIVNÍ. Pokud je požadována numerická hodnota, může ředění vzorku a opakovaný test generovat skóre PCA3 namísto rozsahu skóre PCA3 (viz *Opakování testu - Ředění vzorků s vysokou hodnotou mimo rozsah*).

### 2. Interpretace kódů stavu a analýzy

Stavový sloupec u obou zpráv Raw Run Report (Zpráva nezpracovaného cyklu) i Ratio Report (Zpráva o poměru) uvádí informace ve formátu „s:a“. Kódy stavu specifické pro cyklus („s“) jsou uvedeny před dvojtečkou (vlevo) a kódy analýzy specifické pro analyt („a“) jsou uvedeny za dvojtečkou (vpravo). Kódy specifické pro analyt jsou uvedeny malým písmem pro výsledky PCA3 a velkým písmem pro výsledky PSA. Každá zpráva obsahuje popis kódů stavu a analýzy, které se objevují v této zprávě. Například kódy mohou ukazovat, zda je výsledek vzorku nebo replikátu platný nebo je mimo rozsah. Viz *stručná referenční příručka (Quick Reference Guide)* nebo *provozní příručka softwaru testu Progensa PCA3 (Progensa PCA3 Assay Software Operator's Manual)*, kde je uveden úplný seznam kódů stavu a analýzy a další podrobnosti.

Pokud je skóre PCA3 hlášeno ve zprávě Ratio Report (Zpráva o poměru) a neobjeví se žádné kódy stavu nebo analýzy ve stavovém sloupci PCA3 nebo PSA, znamená to, že oba analyty byly dle testu platné a „v rozmezí“. Výsledek vzorku je možné hlásit a nejsou nutná žádná další opatření.

Pokud se kód stavu nebo analýzy objeví v souhrnu výjimek nebo Ratio Report (Zpráva o poměru), může být nezbytné provést nový test (viz *Interpretace výsledků v souhrnu výjimek a Interpretace výsledků v Ratio Report (Zpráva o poměru)*). Pokud výsledky analytu pocházejí ze samostatných cyklů a mají kód(y) analýzy, najdete kombinaci pro oba analyty v Tabulka 4 nebo Tabulka 5, abyste mohli určit, zda jsou nezbytná další opatření.

**Poznámka:** Přítomnost kódu stavu nebo analýzy neznamena automaticky, že je nutné provedení opakovaného testu.

3. Interpretace výsledků v souhrnu výjimek

Souhrn výjimek nemusí uvádět žádné výjimky. V takovém případě nejsou nutná žádná opatření.

Pokud souhrn výjimek uvádí vzorek (vzorky) z po sobě jdoucích cyklů, kde byly oba cykly analytu platné, přečtěte si Tabulka 4, kde jsou uvedeny další pokyny.

Pro jednotlivé cykly analytu si přečtěte *Interpretace kódů stavu a analýzy*. V po sobě jdoucích cyklech, kde je jeden cyklus analytu neplatný, proveďte nové testování neplatného cyklu (viz *Opakování testu*, kde je uvedeno více informací) a zacházejte s výsledky, jako by byly provedeny individuální cykly pro daný analyt. Bude nutné provedení manuálního spárování.

Vzorek může být označen jako neplatný, i když mohou být jednotlivé zkumavky (replikáty) označené za platné. Kombinovaný výsledek replikátů určuje validitu vzorku a velký rozdíl mezi replikáty způsobí neplatnost vzorku (viz *Postupy kontroly kvality*, kde je uvedeno více informací).

Tabulka 4: Podmínky souhrnu výjimek testu Progensa PCA3

Výsledek PCA3 (kód analýzy*)	Výsledek PSA (kód analýzy*)	Uvedené skóre PCA3	Další testování?	Opatření/komentář
V rozmezí (bez kódu)	Neplatný** (A, B, E, H nebo I)	--	Ano	Opakujte test PSA (viz <i>Opakování testu</i> ) a manuálně výsledky spárujte.
Mimo rozsah, nízký (g)	Neplatný (A, B, E, H nebo I)	--	Ano	Opakujte test PSA (viz <i>Opakování testu</i> ) a manuálně výsledky spárujte.
Neplatný (a, b, e, h nebo i)	V rozmezí (bez kódu)	--	Ano	Opakujte test PCA3 (viz <i>Opakování testu</i> ) a manuálně výsledky spárujte.
V rozmezí (bez kódu)	Mimo rozsah, vysoký (F)	<[Vypočtené skóre PCA3]***	Volitelné	1. Manuálně spárujte pro dosažení výsledku <[Vypočtené skóre PCA3] NEBO 2. Naředte vzorek v ředidle vzorku (viz <i>Ředění vzorků s vysokou hodnotou mimo rozsah</i> ), opakujte test PSA a manuálně spárujte výsledky, pokud je požadováno skóre PCA3.
Mimo rozsah, vysoký (f)	V rozmezí (bez kódu)	>[Vypočtené skóre PCA3]	Volitelné	1. Manuálně spárujte pro dosažení výsledku >[Vypočtené skóre PCA3] NEBO 2. Naředte vzorek v ředidle vzorku, opakujte test PCA3 a manuálně spárujte výsledky, pokud je požadováno skóre PCA3.
Mimo rozsah, nízký (g)	V rozmezí (bez kódu)	<[Vypočtené skóre PCA3]	Ne	Manuálně spárujte pro dosažení výsledku <[Vypočtené skóre PCA3].
Mimo rozsah, nízký (g)	Mimo rozsah, vysoký (F)	<[Vypočtené skóre PCA3]	Ne	Manuálně spárujte pro dosažení výsledku <[Vypočtené skóre PCA3].

\*Viz *provozní příručka softwaru testu Progensa PCA3 (Progensa PCA3 Assay Software Operator's Manual)*, kde je uveden úplný seznam kódů analýzy.

\*\*Platí pouze pro neplatné vzorky s platným cyklem.

\*\*\*Pro hodnoty mimo rozsah je vypočtené skóre PCA3 počítáno pomocí hladiny kopií pro nejbližší pozitivní kalibrátor.

## 4. Interpretace výsledků v Ratio Report (Zpráva o poměru)

Pokud je vzorek uveden v Ratio Report (Zpráva o poměru) se skóre PCA3, je výsledkem hlásitelné skóre PCA3 a nejsou nutná žádná další opatření. Pokud není uvedeno žádné skóre PCA3, vyjádřené jako „--“ ve sloupci skóre PCA3, přečtěte si Tabulka 5, kde jsou uvedeny pokyny.

Tabulka 5: Podmínky Ratio Report (Zpráva o poměru) testu ProgenSA PCA3

Výsledek PCA3 (kód analýzy*)	Výsledek PSA (kód analýzy*)	Uvedené Skóre PCA3	Další testování?	Opatření/komentář
V rozmezí (bez kódu)	V rozmezí (bez kódu)	Skóre PCA3	Ne	Žádná další opatření; výsledek je možné hlásit.
Neplatný** (a, b, e, h nebo i)	Neplatný (A, B, E, H nebo I)	--	Ano	Opakujte oba analyty (viz <i>Opakování testu</i> ).
Neplatný (a, b, e, h nebo i)	Mimo rozsah, vysoký (F)	--	Ano	Naředte vzorek v ředidle vzorku (viz <i>Ředění vzorků s vysokou hodnotou mimo rozsah</i> ), opakujte test pro oba analyty.
Mimo rozsah, vysoký (f)	Neplatný (A, B, E, H nebo I)	--	Ano	Naředte vzorek v ředidle vzorku, opakujte test pro oba analyty.
Mimo rozsah, vysoký (f)	Mimo rozsah, vysoký (F)	--	Ano	Naředte vzorek v ředidle vzorku, opakujte test pro oba analyty.
Neplatný (a, b, e, h nebo i)	Mimo rozsah, nízký (G)	--	Ne	Vzorek má nedostatek RNA pro přesnou analýzu. U pacienta musí být odebrán nový vzorek.
V rozmezí (bez kódu)	Mimo rozsah, nízký (G)	--	Ne	Vzorek má nedostatek RNA pro přesnou analýzu. U pacienta musí být odebrán nový vzorek.
Mimo rozsah, vysoký (f)	Mimo rozsah, nízký (G)	--	Ne	Vzorek má nedostatek RNA pro přesnou analýzu. U pacienta musí být odebrán nový vzorek.
Mimo rozsah, nízký (g)	Mimo rozsah, nízký (G)	--	Ne	Vzorek má nedostatek RNA pro přesnou analýzu. U pacienta musí být odebrán nový vzorek.

\*Viz provozní příručka softwaru testu ProgenSA PCA3 (*ProgenSA PCA3 Assay Software Operator's Manual*), kde je uveden úplný seznam kódů analýzy.

\*\*Platí pouze pro neplatné vzorky s platným cyklem. Pokud byly vzorky neplatné, protože byl neplatný cyklus, výsledky budou uvedeny v souhrnu výjimek (viz *Interpretace výsledků v souhrnu výjimek*, kde je uvedeno více informací).

## D. Opakování testu

## 1. Pokyny pro opakování testu

- a. I když není nutné, aby byly oba analyty testovány ve stejném cyklu, **musí výsledky obou analytů pocházet ze stejné lahvičky vzorku pro hlásitelné skóre PCA3.**
- b. Všechny neplatné cykly musí být opakovaně testovány a všechny neplatné vzorky z platných cyklů musí být opakovaně testovány.
- c. Opakujte test vzorku(ů) pomocí nové sady kalibrátorů a kontrol.
- d. Je nezbytné správné uchování zbylých vzorků před opakováním testu (viz *Sběr, transport a uchování vzorku*, kde je uvedeno více informací).
- e. Manuální párování analytů PCA3 a PSA může být nutné ke stanovení skóre PCA3 (viz *Manuální párování*, kde je uvedeno více informací).

## 2. Ředění vzorků s vysokou hodnotou mimo rozsah

- a. Pokud koncentrace vzorku extrapoluje nad kalibrátor 5 v rozsahu platného cyklu, výsledek je „mimo rozsah, vysoký“ a výsledek bude označen kódem analýzy „f“ nebo „F“ ve zprávě o cyklu. Koncentrace bude vyjádřena jako >[Koncentrace kalibrátoru 5].
- b. Převertete zpracovaný vzorek moči, aby se před ředěním promíchal. Doporučené, ale nevyžadované ředění, je 1:10 s využitím soupravy pro ředění vzorku Progensa PCA3. Do vhodné lahvičky přidejte 1 800 µl ředidla vzorku a 200 µl vzorku; zkumavku uzavřete a pětkrát obraťte, aby se obsah důkladně promíchal. Faktor ředění v pracovním listu cyklu bude „10“. Pokud mají být znovu testovány oba analyty, zdvojnásobte objemy (použijte 3 600 µl ředidla vzorku a 400 µl vzorku). Přečtěte si příbalovou informaci k soupravě pro ředění vzorku testu Progensa PCA3. Testujte zředěný vzorek pomocí testu.
- c. Pokud je při opakovaném testování výsledek vzorku opět vysoký mimo rozsah, bude nutné další ředění, dokud nebude výsledek vzorku interpolovat s rozsahem kalibrátorů. Další ředění úvodního ředění 1:10 je možné za předpokladu, že bylo úvodní ředění 1:10 řádně uchováno (viz *Sběr, transport a uchování vzorku*, kde je uvedeno více informací).

## Omezení

- A. Test Progensa PCA3 by se neměl používat pro pacienty, kteří užívají léky, o nichž je známo, že ovlivňují sérové hladiny PSA, jako například finasterid (Proscar, Propecia), dutasterid (Avodart) a antiandrogenní terapie (Lupron). Účinek těchto léků na genovou expresi PCA3 nebyl dosud vyhodnocen.
- B. Určité terapeutické a diagnostické postupy, jako je prostatektomie, záření, biopsie prostaty a jiné, mohou ovlivnit životnost tkáně prostaty a následně ovlivnit skóre PCA3. Účinek těchto postupů na výkonnost testu nebyl dosud vyhodnocen. Vzorky pro testování PCA3 by měly být odebrány tehdy, pokud si lékař myslí, že se prostatická tkáň zotavila.
- C. Použití testu Progensa PCA3 je omezeno na personál, který byl proškolen v takových postupech. Zanedbáním instrukcí v této příbalové informaci mohou být způsobeny chybné výsledky.
- D. Každá laboratoř musí nezávisle validovat přenosový proces LIS.
- E. Spolehlivé výsledky závisí na adekvátním odběru vzorku moči. Vzhledem k tomu, že přepravní systém používaný v testu Progensa PCA3 neumožňuje mikroskopické hodnocení adekvátnosti vzorku moči, je třeba provedení školení lékařů v technice řádného odběru vzorků moči. Viz *Sběr, transport a uchování vzorku*. Podrobné informace získáte v příbalové informaci dodávané k soupravě na přepravu vzorků moči Progensa PCA3.
- F. Výsledky testu Progensa PCA3 by měly být interpretovány ve spojení s jinými laboratorními a klinickými údaji, které jsou dostupné lékařům. (Testové výsledky mohou být ovlivněny nesprávným odběrem vzorku, technickou chybou nebo záměnou vzorku.)

## Funkční charakteristiky

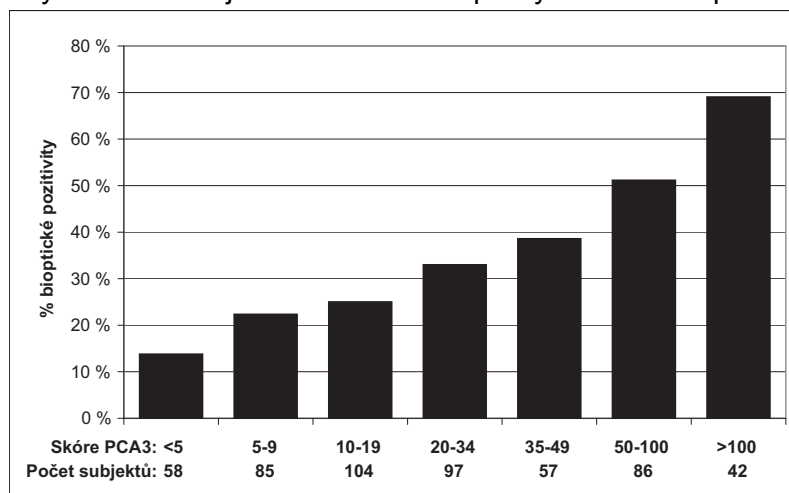
### A. Klinické výsledky

#### 1. Diagnostická senzitivita a specifita

Výkonnostní charakteristiky testu Progensa PCA3 byly stanoveny pomocí vzorků od subjektů zařazených ze čtyř geograficky odlišných klinických center v Severní Americe. Populace subjektů byla tvořena 529 muži, u nichž bylo plánováno provedení biopsie prostaty. Demografické údaje subjektu jsou uvedeny níže:

- Průměrný věk ± směrodatná odchylka = 64 ± 8 let (medián 63, rozsah 32 až 89)
- Průměrná hladina PSA v séru = 7,9 ± 21,9 µg/l (5,6; 0,3 až 484)
- Průměrný objem prostaty (stanoveno pomocí transrektálního ultrazvuku) = 44 ± 25 cc (39, 5 až 225)
- 34 % (180/529) biopticky pozitivních pro karcinom prostaty

Obrázek 3 ukazuje korelaci skóre PCA3 s pravděpodobností pozitivní biopsie. Když vzrostlo skóre PCA3, zvýšila se u subjektů incidence bioptických vzorků s pozitivitou karcinomu.



**Obrázek 3. Korelace skóre PCA3 s pravděpodobností pozitivní biopsie**

Analýza operační charakteristika příjemce (ROC) byla provedena pomocí biopsie prostaty jako referenční metoda v souladu s CLSI GP10-A (1995) (4). Pro test Progensa PCA3 byla plocha pod křivkou (AUC) 0,685 (95 % interval spolehlivosti = 0,637 až 0,733). Tabulka 6 ukazuje diagnostickou senzitivitu a specifitu při různých mezních hodnotách skóre PCA3. Každá laboratoř by měla stanovit mezní hodnotu pro diagnostickou senzitivitu nebo specifitu (viz *Interpretace výsledků*).

**Tabulka 6: Diagnostická senzitivita a specifita testu Progensa PCA3 při různých mezních hodnotách skóre PCA3**

Mezní hodnota skóre PCA3	5	10	15	25	35	50	95
<b>Senzitivita</b>	96 %	85 %	77 %	63 %	53 %	41 %	17 %
<b>Specifita</b>	14 %	33 %	47 %	61 %	74 %	84 %	95 %

#### 2. Studie stability vzorku

- Stabilita v plné moči: První porce moči byla odebrána od 10 subjektů a uložena při teplotě 2 °C až 8 °C nebo 30 °C před zpracováním přidáním transportního média na moč (UTM). Při teplotě 2 °C až 8 °C byl pozorován významný rozpad

PCA3 RNA a PSA RNA u některých vzorků po 4 hodinách. Proto musí být plná moč zpracována do 4 hodin. Při teplotě 30 °C byla pozorována významná degradace za méně než 1 hodinu. Proto musí být plná moč vždy zchlazena nebo uchovávána na ledu předtím, než bude provedeno její zpracování.

- b. Stabilita ve zpracované moči: Dvanáct vzorků bylo inkubováno při teplotě 4 °C nebo 30 °C po dobu až 38 dnů. Při teplotě 4 °C byla PCA3 RNA a PSA RNA stabilní po dobu 21 dnů; při teplotě 30 °C po dobu 5 dnů. Vzorky uložené při teplotě -20 °C a -70 °C prokázaly stabilitu PCA3 RNA a PSA RNA po dobu až 90 dnů.
- c. Stabilita při zmrazení a rozmrazení: Vzorky byly 6krát cyklovány mezi 37 °C a -70 °C. Nebyl pozorován pokles úrovní kopií PCA3 RNA nebo PSA RNA.

## B. Analytické výsledky

### 1. Analytická senzitivita

Panel analytické senzitivity tvořený ředěným *in vitro* RNA transkriptem byl použit pro hodnocení senzitivity testu. Jeden operátor testoval panel ve dvanácti cyklech u pěti replikátů pomocí jedné šarže na reagentii. Mez detekce a mez kvantifikace byly vypočteny podle CLSI EP17-A (2004) (5). Mez detekce analytu PCA3 byla 80 kopií/ml a pro analyt PSA byla 1 438 kopií/ml. Kvantifikační mez obou analytů byl kalibrátor 2.

### 2. Analytická specifická

- a. Nespletený transkript: Test Progensa PCA3 byl navržen pro detekci pouze spletené exon 3-exon 4 PCA3 RNA specifické pro karcinom prostaty (2). Test nedetekoval 1 milion kopií/ml nespletené PCA3 RNA významně nad pozadím.
- b. PCA3 RNA specifická pro prostatu v moči: Vzorky od subjektů po radikální prostatektomii (n = 97) byly testovány za použití testu Progensa PCA3 a hladiny PCA3 RNA byly srovnávány s hladinami od subjektů před biopsií (n = 464). Medián PCA3 RNA kopií/ml byl pod mezí detekce pro vzorky subjektů po prostatektomii, zatímco medián PCA3 RNA kopií/ml pro vzorky subjektů před biopsií byl 7 243 kopií/ml. Tyto údaje potvrzují, že PCA3 RNA v moči je z prostaty.
- c. Tkáňová specifická: Celková RNA byla extrahována z tkání dvou unikátních mužských dárců na typ tkáně, byla přidána k ředidlu vzorku (10 ng na reakci) a testována testem Progensa PCA3. Tkáň prostaty byla jediným typem detekovaným nad mezí detekce PCA3 RNA typů tkání uvedených v Tabulka 7.

Tabulka 7: Typy mužské tkáně testované pro PCA3 RNA

Typ tkáně	
Močový měchýř (normální)	Ledvina
Močový měchýř (nádor)	Penis
Kostní dřeň	Prostata
Chámovod	Semenný váček
Nadvarle	Varle

- d. Interferující látky: Látky uvedené v Tabulka 8 byly přidány k alikvotním podílům smíchané zpracované mužské moči. Vzorky byly testovány pomocí testu Progensa PCA3 v souladu s CLSI EP7-A2 (2005) (6). Při uvedených koncentracích nebyla v testu pozorována žádná interference.



Tabulka 8: Látky testované na interferenci s testem Progensa PCA3

Terapeutické prostředky		Terapeutické prostředky, pokračování	
Látka	Testovaná koncentrace	Látka	Testovaná koncentrace
Acetaminofen/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	Serenoa repens	1 600 mg/l
Difenhydramin	19,6 µmol/l	Selen	0,275 mg/l
Acetaminofen	1 324 µmol/l		
Kyselina acetylsalicylová	3,62 mmol/l		
		Složky moči	
		Látka	Testovaná koncentrace
Ibuprofen	2 425 µmol/l	Kyselina močová	1,4 mmol/l
Furosemid	181 µmol/l	Hemoglobin	2 g/l
Ciprofloxacín	30,2 µmol/l	Bílé krvinky	4,56 x 10 <sup>7</sup> buněk/l
Levaquin	48,6 µmol/l	Červené krvinky	3,06 x 10 <sup>7</sup> buněk/l
Doxycyklin	67,5 µmol/l	Albumin	50 g/l
Fluoxetin hydrochlorid	11,2 µmol/l	Bilirubin (nekonjugovaný)	342 g/l
Flutamid	1 500 mg/l	IgG	60 g/l
Dutasterid	1,5 mg/l		

### 3. Přesnost

Přesnost testu Progensa PCA3 byla hodnocena dle CLSI EP15-A2 (2005) (7). Transkripty PCA3 RNA a PSA RNA byly kvantifikovány UV/VIS spektrofotometrií, byly přidány do zpracované normální ženské moči (bez detekovatelné PCA3 RNA nebo PSA RNA) a koncentrace byly změřeny testem Progensa PCA3. Procentuální (%) výtěžnost byla vypočtena jako poměr naměřených kopií/ml k přidáním kopií/ml a vynásobený 100.

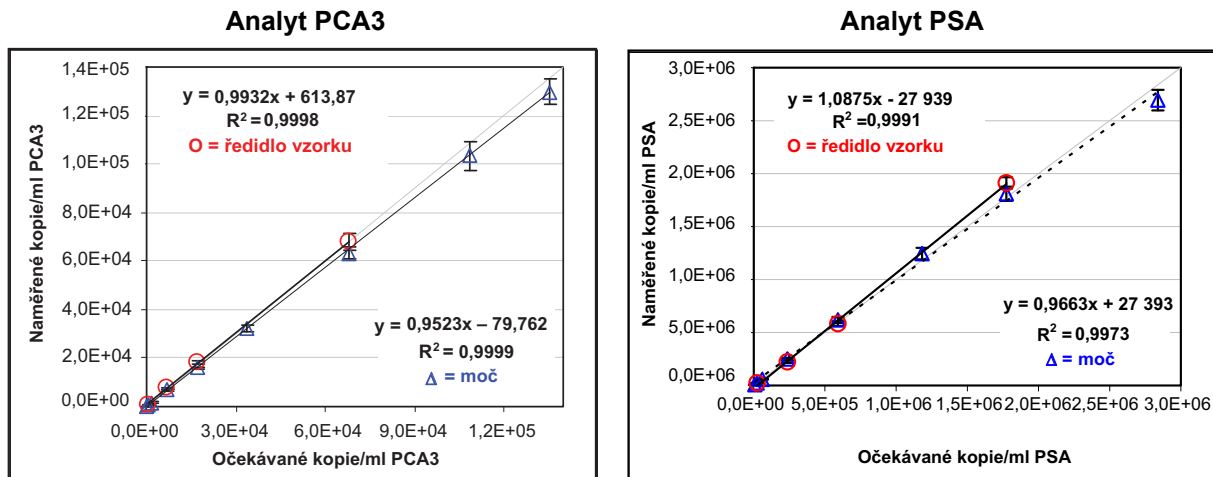
Tabulka 9: Výtěžnost kopií testu Progensa PCA3

Analyt	Známa koncentrace, kopie/ml	Naměřená koncentrace, kopie/ml	% výtěžnost
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. Linearita a rozsah

Lineární rozsah testu Progensa PCA3 byl stanoven dle CLSI EP6-A (2003) (8) na základě lineárně regresní analýzy (nejmenší čtverce). Dvě sady sérií ředění byly připraveny ze vzorků, které obsahovaly vysoké koncentrace PCA3 RNA a PSA RNA.

Jedna sada byla naředěna do zpracované ženské moči a jedna sada do ředidla vzorku. Ředění se pohybovala v celém rozsahu testu mezi nejnižšími a nejvyššími pozitivními kalibrátory pro každý analyt. Pro oba analyty, PCA3 a PSA, ukázaly výsledky měřené testem přímo úměrný vztah mezi testovanými ředěními a hlášeným počtem kopií/ml analytu. Nedošlo k žádnému významnému ředícímu účinku na matrix. Viz Obrázek 4.



Obrázek 4. Linearita testu Progensa PCA3 pro analyty PCA3 a PSA

## 5. Přesnost

Přesnost testu Progensa PCA3 byla hodnocena podle CLSI EP5-A2 (2004) (9). Opakovatelnost je přesnost za podmínek minimální variability a reprodukovatelnost je přesnost za podmínek maximální variability.

Pro opakovatelnost byl připraven trojčlenný testovací panel tvořený z ředěných *in vitro* RNA transkriptů. Jeden operátor v jednom centru testoval panel ve 20 cyklech u 5 replikátů po dobu 20 dnů za použití jedné šarže kalibrátoru a kontroly, šarže reagentie a sady vybavení. Tabulka 10 ukazuje přesnost opakovatelnosti testu Progensa PCA3 v různých úrovních testové koncentrace.

Tabulka 10: Opakovatelnost testu Progensa PCA3

Analyt	Panel Člen	Průměr kopie/ml	Opakovatelnost SD	Opakovatelnost 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 %

Pro reprodukovatelnost byl připraven osmičlenný testovací panel tvořený smíchanými vzorky (1 až 3) a zředěnými *in vitro* RNA transkriptem (4 až 8). Tři operátoři testovali panel v 18 cyklech po dobu 3 dnů za použití jedné šarže kalibrátoru a kontroly, 3 šarží reagentie a 3 sad vybavení. Tabulky 11 a 12 shrnují přesnost celkovou, v rámci cyklu a mezi cykly, přesnost operátora, vybavení a šarže v testu Progensa PCA3 pro kopie/ml analytu a pro skóre PCA3.

Variabilita v rámci cyklu, mezi operátory a mezi cykly byly v sestupném pořadí největší příčinou celkové variability testu. Šarže reagencie a zařízení měly jen malý vliv na celkovou variabilitu testu. Tyto výsledky ukázaly, že test Progensa PCA3 probíhá reprodukovatelně a primární zdroj variability je náhodná chyba (v rámci cyklu).

Tabulka 11: Reprodukovatelnost testu Progensa PCA3: analýza kopií/ml

Analyt	Panel Člen	n	Naměřené kopie/ml	Celkový variační koeficient (CV)	CV v rámci cyklu	CV mezi cykly	CV mezi operátory	CV mezi zařízeními	CV mezi šaržemi
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 %

Tabulka 12: Reprodukovatelnost testu Progensa PCA3: Analýza skóre PCA3

Panel Člen*	n	Průměrné skóre	Celkový variační koeficient (CV)	CV v rámci cyklu	CV mezi cykly	CV mezi operátory	CV mezi zařízeními	CV mezi šaržemi
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 %

\*Členové panelu 4 až 6 obsahovaly pouze PCA3 RNA nebo PSA RNA transkript, a proto nebyly zařazeny do této analýzy.

## Literatura

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<sup>PCA3</sup>-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

Podpora zákazníků: +1 844 Hologic (+1 844 465 6442)  
customersupport@hologic.com

Technická podpora: +1 888 484 4747  
molecularsupport@hologic.com

Další kontaktní informace naleznete na [www.hologic.com](http://www.hologic.com).



**Emergo Europe**  
Prinsessegracht 20  
2514 AP The Hague  
The Netherlands

Hologic, Aptima, DTS, Leader, Progensa, a SB100 jsou ochranné známky nebo registrované ochranné známky společnosti Hologic, Inc. nebo jejích dceřiných společností ve Spojených státech amerických nebo v jiných zemích.  
eppendorf (stylizovaná forma) a REPEATER jsou ochranné známky společnosti Eppendorf AG.  
RAININ je ochranná známka společnosti Rainin Instrument, LLC.  
TECAN a FREEDOM EVO jsou ochranné známky společnosti Tecan Group AG.

Všechny ostatní ochranné známky, které se mohou objevit v tomto příbalovém letáku, jsou majetkem jejich příslušných vlastníků.

©2006 – 2017 Hologic, Inc. Všechna práva vyhrazena.

501377CS Rev. 002

2017-03