

## PROGENSA® PCA3-analys

För *in vitro*-diagnostiskt bruk.

Endast för USA-export.

Avsedd användning .....	1
Sammanfattning och förklaring av analysen .....	1
Metodprinciper .....	1
Reagenser .....	1
Materiel .....	3
Varningar och försiktighetsåtgärder .....	3
Förvarings- och hanteringskrav .....	4
Provtagning, -transport och -förvaring .....	5
Analysförfarande .....	5
Metodanmärkingar .....	8
Kvalitetskontrollförfaranden .....	10
Tolkning av resultat .....	10
Restriktioner .....	13
Prestandaegenskaper .....	13
Litteratur .....	18

### Avsedd användning

PROGENSA PCA3-analys är en *in vitro*-nukleinsyreamplifieringsanalys (NAAT) som detekterar budbärar-RNA (RNA= ribonukleinsyra) i prostatacancerigen 3 (PCA3) 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 för prostataspecifikt antigen (PSA) för prostatacancerscreening har resulterat i biopsidiagnos av mindre, tidigare oupptäckta 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. förstörd 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 (benämns också "PCA3<sup>DD3</sup>" eller "DD3<sup>PCA3H</sup>") är ett icke-kodande, prostataspecifikt mRNA som överuttrycks i prostatacancer celler, med ett medianvärde på en 66-faldig uppreglering jämfört med omkringliggande godartad vävnad (2). Däremot är genuttrycket av PSA likartat i cancer celler och godartade celler; PSA-mRNA-nivåer kan därför användas för att normalisera för mängden prostataspecifikt ribonukleinsyra (RNA) i molekylära analysprover. Lämpligheten av kvantitativ PCA3-baserat molekylär analys av urinsediment (2) och helurin (3) har påvisats.

PROGENSA PCA3-analys utnyttjar helurin som samlats in efter prostatapalpation (DRE) vid vilken varje lob palperas tre gånger. Prostatapalpation medför utsöndring av prostataceller 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-mRNA kvantifieras, och PCA3 Score fastställs baserat på kvoten PCA3-mRNA/PSA-mRNA. Förutom normalisering av PCA3-

signalen, tjänar mätningen av PSA-mRNA 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 nukleinsyreamplifieringsanalyser. Analysen kombinerar teknikerna målinfångning, transkriptionsmedierad amplifiering (TMA) och hybridiseringsskyddsanalys (HPA) för att strömlinjeforma urinprovsbehandling, amplifiera målsekvens-mRNA samt detektera amplikon.

När PROGENSA PCA3-analys utförs i laboratoriet, isoleras målsekvens-mRNA- molekylerna från urinproven 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 Target Capture-system.

Målamplicering 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 primär 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-kopiemallen.

Detektion sker genom att HPA använder ensträngiga, kemiluminiscensmärkta nukleinsyreprober som är komplementära till amplikonen. Separata prober används för varje målamplicon. De märkta nukleinsyreproberna hybridiseras specifikt till amplikonen. Selektionsreagenset skiljer ut hybridiserade och icke-hybridiserade prober genom att inaktivera märkningen på icke-hybridiserade prober. I detekteringssteget mäts den kemiluminiscenssignal som avges av den hybridiserade proben i en luminometer och rapporteras som relativa ljusenheter (RLU).

PCA3- och PSA-mRNA 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 interpoleras från standardkurvan.

### Reagenser

Reagenser och tillhandahållen materiel i PROGENSA PCA3/PSA-analysset listas nedan. Reagens-ID-symboler anges även bredvid respektive reagensnamn.

**PROGENSA PCA3/PSA-analysats, 2 x 100 reaktioner, art.nr 302355 (8 kartonger)**
**PROGENSA PCA3 100-reaktionssats**
**PROGENSA PCA3 kylskåpsförvarad kartong – förvaras vid 2 till 8 °C**

Symbol	Komponent	Kvantitet	Beskrivning
A	PCA3 Amplifieringsreagens	1 x 100 reaktioner	<i>Ej smittbärande nukleinsyra torkad i HEPES-buffrad lösning innehållande &lt;10 % bulkmedel.</i>
E	PCA3/PSA-enzymreagens	1 x 100 reaktioner	<i>Omvänt transkriptas och RNA-polymeras torkade i HEPES-buffrad lösning innehållande &lt;10 % bulkmedel.</i>
P	PCA3-probreagens	1 x 100 reaktioner	<i>Ej smittbärande kemiluminiscens-DNA-prober torkade i succinatbuffrad lösning innehållande &lt;5 % bulkmedel och &lt;5 % litiumlaurylsulfat.</i>

**PROGENSA PCA3 rumstemperaturkartong – förvaras vid 15 till 30 °C**

Symbol	Komponent	Kvantitet	Beskrivning
AR	PCA3 Amplifieringsrekonstitutionslösning	1 x 9,3 mL	<i>Vattenhaltig lösning innehållande konserveringsmedel (&lt;1 % parabener).</i>
ER	PCA3/PSA-enzym Rekonstitutionslösning	1 x 3,3 mL	<i>HEPES-buffrad lösning innehållande ett ytaktivt ämne (10 % Triton X-100) och 20 % glycerol.</i>
PR	PCA3/PSA-probrekonstitutionslösning	1 x 12,4 mL	<i>Succinatbuffrad lösning innehållande &lt;5 % litiumlaurylsulfat.</i>
S	PCA3-PSA-selektionsreagens	1 x 31 mL	<i>Boratbuffrad lösning innehållande ytaktivt ämne (1 % Triton X-100).</i>
TCR	PCA3 Target Capture-reagens	1 x 22 mL	<i>Ej smittbärande nukleinsyra i HEPES-buffrad lösning innehållande fast fas (&lt;0,5 mg/mL).</i>
	Förslutningskort	1 förpackning	
	Rekonstitutionskragar	1 förpackning	

**PROGENSA PCA3 kalibrator- och kontrollats – förvaras vid 2 till 8 °C**

Symbol	Komponent	Kvantitet	Beskrivning
KAL	PCA3-kalibrator 1	1 x 2,0 mL	<i>Fosfatbuffrad lösning innehållande &lt;5 % litiumlaurylsulfat.</i>

Symbol	Komponent	Kvantitet	Beskrivning
KAL	PCA3-kalibratörer 2-5	4 x 1,7 mL	<i>Ej smittbärande PCA3-nukleinsyra i fosfatbuffrad lösning innehållande &lt;5 % litiumlaurylsulfat.</i>
PC	PCA3 positiva kontroller	2 x 1,7 mL	<i>Ej smittbärande PCA3-nukleinsyra i fosfatbuffrad lösning innehållande &lt;5 % litiumlaurylsulfat.</i>

**PROGENSA PSA 100-reaktionssats**
**PROGENSA PSA kylskåpsförvarad kartong – förvaras vid 2 till 8 °C**

Symbol	Komponent	Kvantitet	Beskrivning
A	PSA-amplifieringsreagens	1 x 100 reaktioner	<i>Ej smittbärande nukleinsyra torkad i HEPES-buffrad lösning innehållande &lt;10 % bulkmedel.</i>
E	PCA3/PSA-enzymreagens	1 x 100 reaktioner	<i>Omvänt transkriptas och RNA-polymeras torkade i HEPES-buffrad lösning innehållande &lt;10 % bulkmedel.</i>
P	PSA-probreagens	1 x 100 reaktioner	<i>Ej smittbärande kemiluminiscens-DNA-prober torkade i succinatbuffrad lösning innehållande &lt;5 % bulkmedel och &lt;5 % litiumlaurylsulfat.</i>

**PROGENSA PSA rumstemperaturkartong – förvaras vid 15 till 30 °C**

Symbol	Komponent	Kvantitet	Beskrivning
AR	PSA Amplifieringsrekonstitutionslösning	1 x 9,3 mL	<i>Vattenhaltig lösning innehållande konserveringsmedel (&lt;1 % parabener).</i>
ER	PCA3/PSA-enzym Rekonstitutionslösning	1 x 3,3 mL	<i>HEPES-buffrad lösning innehållande ett ytaktivt ämne (10 % Triton X-100) och 20 % glycerol.</i>
PR	PCA3/PSA-probrekonstitutionslösning	1 x 12,4 mL	<i>Succinatbuffrad lösning innehållande &lt;5 % litiumlaurylsulfat.</i>
S	PCA3/PSA-selektionsreagens	1 x 31 mL	<i>Boratbuffrad lösning innehållande ytaktivt ämne (1 % Triton X-100).</i>
TCR	PSA Target Capture-reagens	1 x 22 mL	<i>Ej smittbärande nukleinsyra i HEPES-buffrad lösning innehållande fast fas (&lt;0,5 mg/mL).</i>
	Förslutningskort	1 förpackning	
	Rekonstitutionskragar	1 förpackning	

## PROGENSA PSA kalibrator och kontrollats – förvaras vid 2 till 8 °C

Symbol	Komponent	Kvantitet	Beskrivning
KAL	PSA-kalibrator 1	1 x 2,0 mL	Fosfatbuffrad lösning innehållande <5 % litiumlaurylsulfat.
KAL	PSA-kalibratorer 2-5	4 x 1,7 mL	Ej smittbärande PSA-nukleinsyra i fosfatbuffrad lösning innehållande <5 % litiumlaurylsulfat.
PC	PSA positiva kontroller	2 x 1,7 mL	Ej smittbärande PSA-nukleinsyra i fosfatbuffrad lösning innehållande <5 % litiumlaurylsulfat.

## APTIMA analysvätskor – förvaras vid 15 till 30 °C (2 kartonger)

Symbol	Komponent	Kvantitet	Beskrivning
W	Tvättlösning	1 x 402 mL	HEPES-buffrad lösning innehållande <2 % natriumdodecylsulfat.
DF	Buffert för inaktiveringsvätska	1 x 402 mL	Bikarbonatbuffrad lösning.
O	Oljereagens	1 x 24,6 mL	Silikonolja.

**Anm.** Alla materiel i PROGENSA PCA3/PSA-analysats kan också köpas separat (se avsnittet *Materiel* för utförlig information).

## Materiel

**Anm.** Materiel som kan fås från Gen-Probe har artikelnummer angivna.

## Nödvändig materiel som inte tillhandahålls

PROGENSA PCA3 Urine Specimen Transport Kit (art.nr 302352)

GEN-PROBE luminometer LEADER HC+ (art.nr 104747)

GEN-PROBE Target Capture-system (TCS) (art.nr 104555)

APTIMA autodetekteringsats (art.nr 301048)

2 eppendorf-pipetter Repeater Plus (art.nr 105725)

Repetitionspipettspetsar (2,5 mL, 5,0 mL och 25,0 mL)

Antingen:

2 vortexblandare för flera rör (art.nr 102160F)

3 bad med cirkulerande vatten (62 °C ± 1 °C, 42 °C ± 1 °C, 62 °C ± 1 °C) (art.nr 104586F)

3 distanselement för vattenbad (artikel.nr 104627)

eller

2 SB100 Dry Heat Bath/vortexblandare (art.nr 105524F) (ytterligare SB100-instrument kan behövas beroende på genomströmningskraven)

Mikropipett, 1000 µL RAININ PR1000 (art.nr 901715)

Spetsar, 1000 µL P1000 (art.nr 105049)

Pipett, eppendorf 20 till 200 µL (art.nr 105726)

Spetsar, pipett - 20 till 200 µL

Blekmedel (min. 5,25 % eller 0,7 M natriumhypokloritlösning)

Plastbehållare med stort lock

Urinprovbehållare av standardtyp, utan konserveringsmedel

Enheter med tio rör (TTU:er) (art.nr TU0022)

Kassetter med tio spetsar (TTC:er) (art.nr 104578)

SysCheck kalibreringsstandard (artikel.nr 301078)

## Valfri materiel

PROGENSA PCA3 100-reaktionssats (art.nr 302354)

PROGENSA PCA 100-reaktionssats (art.nr 302357)

PROGENSA PCA3 kalibrator- och kontrollats (art.nr 302353)

PROGENSA PSA kalibrator- och kontrollats (art.nr 302356)

PROGENSA PCA3/PSA Proficiency Panels (art.nr 302350)

PROGENSA PCA3 Specimen Diluent Kit (art.nr 302351)

APTIMA analysvätskesats (artikel.nr 302002C)

TECAN Freedom EVO 100/4 (art.nr 900932)

PCA3 däckplattenshet, DTS 800 (art.nr 902021)

Reagensbehållare (40 mL kvartsmodul) (art.nr 104765)

Delad reagensbehållare (19 mL x 2-kvartsmodul) (art.nr 901172)

Transportrör (art.nr 302521)

Engångspipettspetsar med filter (1 mL) (Tecan nr 10612513)

Extra, genomträngliga lock (art.nr 302520)

Extra, ogenomträngliga lock (art.nr 103036A)

## Varningar och försiktighetsåtgärder

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

## Laboratorierelaterade

- Använd endast tillhandahållen eller specificerad laboratoriemateriel för engångsbruk.
- lakta sedvanliga säkerhetsrutiner för laboratorier. Ät, drick och rök inte där du arbetar. Bär puderfria handskar, skyddsglasögon och laboratorierockar för engångsbruk vid hantering av urinprover och satsreagenser. Tvätta händerna ordentligt efter hantering av urinprover och satsreagenser.
- 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 det drabbade området tvättas med vatten. Om dessa vätskor spills, ska spillet spädas ut med vatten innan det torkas upp.
- Arbetsytor, pipetter och annan utrustning måste dekontamineras regelbundet med 2,5 till 3,5 % (0,35 till 0,5 M) natriumhypoklorit (blekmedelslösning) (se *Metodanmärkning*).
- Ett separat ställe för post-amplifiering rekommenderas starkt för att minimera amplikonkontamination i analysen. Detta separata ställe ska vara avskilt från pre-amplifieringsområdet, där reagensberedning, målinfångning och amplifiering utförs.
- För att minska risken för att laboratorietrymmen förorenas med amplikon ska laboratorieområdet arrangeras för enkelriktat arbetsflöde från reagensberedning t.o.m. post-amplifiering. Prover, utrustning och reagenser ska inte ställas tillbaka i det område där föregående steg utfördes. Personal ska inte återvända till föregående arbetsområde utan att vidta lämpliga skyddsåtgärder mot kontamination.

## Provrelaterade

- Efter urintillsats måste vätskenivån i transportröret för urinprov ursprungligen ligga mellan de två svarta indikatorstrecken på röretiketten. Annars måste provet underkännas.
- Bibehåll korrekta förvaringsförhållanden vid transport av prover för att säkerställa provernas kvalitet. Provernas stabilitet under andra transportförhållanden än de som rekommenderas har inte utvärderats.
- Utgångsdatum angivna på provtagningsattsarna gäller för provtagningsplatsen och inte provinrättningen. 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. Analysprestanda 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 hantering och kassering ska fastställas av laboratoriechefen. Endast kvalificerad personal med färdigheter i användningen av PROGNSA PCA3-analys och som har lämplig utbildning i hantering av smittförande material ska utföra detta förfarande.
- N. Undvik korskontamination under provhanteringen. Urinprover kan innehåller höga nivåer av mål-mRNA. Se till att provbehållare inte kommer i kontakt med varandra, och kassera använda material utan att förflytta dem över öppna behållare. Om handskar kommer i kontakt med ett prov, ska nya handskar användas för att undvika korskontamination.

#### Analysrelaterade

- O. Använd inte denna sats efter utgångsdatum.
- P. När det gäller PROGNSA PCA3-analysensatsen får inte PCA3-analysreagens med olika partinummer bytas ut mot varandra, blandas eller kombineras (dvs. för varje analyt måste analysreagenserna i den "kylskåpsförvarade" 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. Analysprestanda kan påverkas om felaktigt förvarade analysreagenser används. Se *Förvarings- och hanteringskrav* och *Metodanmärkningar* för specifika anvisningar.
- R. För analysinaktivering (se *Analysförfarande*) måste natriumhypokloritkoncentrationen i blekmedelslösningen vara minst 2,6 % (0,35 M) **efter** 1:1 utspädning med inaktiveringsbuffert. Därför måste blekmedelslösningen ha en utgångskoncentration av natriumhypoklorit på minst 5,25 % (0,7 M) för att nödvändig slutkoncentration för inaktivering ska erhållas.
- S. Spetsar med hydrofoba proppar måste användas. Minst två repetitionspipetter måste avdelas för användning med denna analys: en för användning i pre-amplifieringsstegen och en för användning i 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 beskrivningen i *Metodanmärkningar*.
- T. Vid användning av repetitionspipetter för reagenstillats får pipettspetsarna inte komma i kontakt med reaktionsrören, så att kontaminantöverföring från ett rör till ett annat undviks.
- U. Ordentlig blandning krävs för att erhålla korrekta analysresultat. För fullständig information hänvisas till *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. Säkerhetsdatablad finns på [www.gen-probe.com](http://www.gen-probe.com) och kan erhållas på begäran.

## Förvarings- och hanteringskrav

A. Se Tabell 1 för reagensförvaringsinformation.

Tabell 1: Reagensförvaring

Reagens/Vätska	Förvaring öppnade	Stabilitet öppnade/ rekonstituerade (upp till utgångsdatum)
<b>Amplifieringsreagenser</b>	2 till 8 °C till utgångsdatum	30 dagar vid 2 till 8 °C*
<b>Probreagenser</b>	2 till 8 °C till utgångsdatum	30 dagar vid 2 till 8 °C*
<b>Enzymreagens</b>	2 till 8 °C till utgångsdatum	30 dagar vid 2 till 8 °C*
<b>Target Capture-reagenser</b>	15 till 30 °C till utgångsdatum	30 dagar vid 15 till 30 °C
<b>Amplifieringsrekonstitution-slösning</b>	2 till 30 °C till utgångsdatum	Ej tillämpligt (engångsbruk)
<b>Prob-rekonstitution-slösning</b>	2 till 30 °C till utgångsdatum	Ej tillämpligt (engångsbruk)
<b>Enzym Rekonstitution-slösning</b>	2 till 30 °C till utgångsdatum	Ej tillämpligt (engångsbruk)
<b>Selektionsreagens</b>	2 till 30 °C till utgångsdatum	30 dagar vid 15 till 30 °C
<b>Kalibratorer</b>	2 till 8 °C till utgångsdatum	Ej tillämpligt (enstaka analysomgång)
<b>Kontroller</b>	2 till 8 °C till utgångsdatum	Ej tillämpligt (enstaka analysomgång)
<b>Oljereagens</b>	15 till 30 °C till utgångsdatum	30 dagar vid 15 till 30 °C
<b>Tvättlösning</b>	15 till 30 °C till utgångsdatum	30 dagar vid 15 till 30 °C
<b>Buffert för inaktivering-svätska</b>	15 till 30 °C till utgångsdatum	28 dagar vid 15 till 30 °C

\* Kan användas igen för andra analysomgångar upp till fyra gånger, under förutsättning att den totala tiden vid rumstemperatur inte överstiger 4 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 reagenserna.**
- E. Använd inte reagenser eller vätskor efter utgångsdatum.
- F. PROGNSA 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 Gen-Probe kontaktas före användning.

- H. 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 mellan och blanda eller kombinera inte reagenser från satser med olika partinummer.** 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.

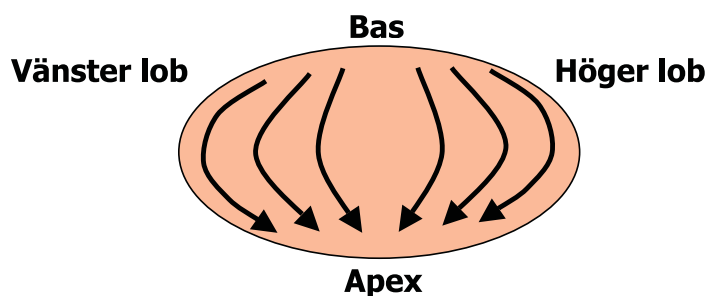
## Provtagning, -transport och -förvaring

PROGENSA PCA3-analys är avsedd att kvantifiera PCA3- och PSA-mRNA 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-mRNA i urin och behandlad urin fastställdes genom övervakning av mRNA-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 före urinprovtagningen:

Palpera prostatan tillräckligt kraftigt så att ytan trycks in ca 1 cm, från basen till apex och från den laterala kanten till medianlinjen på varje lob såsom visas i figuren nedan 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 urinvolym, krävs åtminstone 2,5 mL för PROGENSA PCA3-analys.
4. **Obehandlade urinprover måste, om de inte omedelbart behandlas, förvaras vid 2 till 8 °C eller på is. Det kylda, obehandlade urinprovet måste överföras till transportröret för urinprover inom 4 timmar efter provtagningen. 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 överföringspipetten för engångsbruk. Korrekt urinvolym 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 urinprover vid eller under 30 °C (kan frysas). Transporten måste ske så att proverna med säkerhet når analysinrättningen inom 5 dagar efter provtagningen. Vid mottagning av leveransen kan laboratoriet förvara prover vid 2 till 8 °C i upp till 14 dagar innan de måste kasseras. Om längre förvaringstid krävs, kan prover förvaras vid eller under -20 °C i upp till 90 dagar. Se Tabell 2 för tillåtna förvaringstider vid olika temperaturer.

Tabell 2: Förvaringstider för behandlade urinprover

Förvaringstemperatur	Tid
Förvaring och transport av behandlade prover:	
Vid eller under 30 °C	upp till 5 dagar*
Efter mottagning på analysinrättningen:	
2 till 8 °C	upp till 14 dagar
-20 °C eller under	upp till 90 dagar

\*Tillåten tid för transport vid 30 °C eller under.

2. Behandlade urinprover kan utsättas för upp till 5 frysnings-/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 för urinprover. Om prover behöver fraktas för analys vid en annan inrättning, måste rekommenderade temperaturer upprätthållas. **Undvik stänk och korskontamination.**

**Anm.** Följ kraven i PI650, utfärdad av International Air Transportation Association (IATA), för emballage när urinprover transporteras med allmänna landfordon och med flyg.

## Analysförfarande

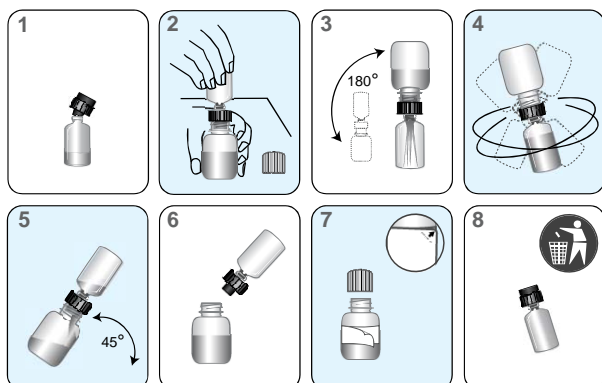
### A. Beredning av arbetsytor

1. Ställ in ett vattenbad på 62 °C ± 1 °C för pre-amplifiering, ett andra vattenbad på 42 °C ± 1 °C (för amplifiering) och ett tredje vattenbad på 62 °C ± 1 °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 denna analys påbörjas ska arbetsytor och pipetter tokas av med 2,5 till 3,5 % (0,35 till 0,5 M) natriumhypoklorit (blekmedelslösning). Låt blekmedelslösningen vara i kontakt med ytorna och pipetterna i minst 1 minut, och skölj sedan med vatten. Låt inte blekmedelslösningen torka. Täck ytan på bänken där reaktionen ska utföras med rena, plastfodrade, absorberande laboratoriebänkskydd.
3. Sätt in tillräckligt med tiopsetskassetter i Target Capture-systemet (TCS). Se till att TCS-tvättflaskan är fylld med tvättlösning och att aspiratorn är ansluten till vakuumpumpen. (Se *Användarhandledning för Target Capture-systemet*.)

B. Reagensrekonstitution och -beredning

Reagensrekonstitution ska utföras innan provöverföringen påbörjas.

1. För att rekonstituera amplifierings-, enzym- och probreagenser, ska flaskan med frystorkad reagens kombineras med rekonstitutionslösningen. Om rekonstitutionslösningen förvarats i kylskåp ska den 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 den torkade reagensampullen och sätt in rekonstitutionskragens skårade ände ordentligt i ampullöppningen (Figur 2, steg 1).
  - c. Öppna matchande rekonstitutionslösning och lägg locket på en ren, täckt arbetsyta. Håll lösningsflaskan på bänken och sätt i rekonstitutionskragens andra ände ordentligt i flaskan (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 rör sedan försiktigt om lösningen i glasampullen för att blanda. Undvik skumbildning när flaskan virvlas (Figur 2, steg 4).
  - e. Invertera enheten vid 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 på locket på plastflaskan igen och dra av och kassera den översta etiketten (Figur 2, steg 7). På den återstående flasketiketten noteras operatörens initialer, rekonstitutionsdatum och partinumret för det frystorkade reagentet på alla rekonstituerade reagensampuller. Var noga med att notera analyten (PCA3 eller PSA) på probreagensampullerna.
  - h. Kassera både rekonstitutionskragen och glasampullen (figur 2, steg 8).
  - i. Kassera alla oanvända reagenser efter 30 dagar eller, om detta inträffar först, på utgångsdatumet.
2. Tidigare rekonstituerade prob-, amplifierings- och enzymreagenser måste uppnå rumstemperatur (15 till 30 °C) innan analysen påbörjas. Se *Förvarings- och hanteringskrav vid pooling av återstående 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 amplifieringsreagens innehåller utfällning som inte återgår till lösning 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 för målnfångning, 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 tiorörshetens (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.** Kalibratorer 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. Lämnar inte tomma reaktionsrör mellan kalibratorer, kontroller och prover. Vid användning av TECAN Freedom EVO 100/4-instrument 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-position	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	Okänd	Okänd

\*PCA3 och PSA positiva kalibratorer och kontroller har fastställda värden, så det faktiska koncentrationer (kopior/mL) för kalibratorerna 2 till 5 och kontrollerna A och B kommer att vara något olika de målkoncentrationer som finns i tabellen, och varierar från parti till parti. De fastställda värdena tillhandahålls på ett kort i förpackningen av 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 kontrollsatparti. 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 GEN-PROBE Worklist Editor på en dator i pre-amplifieringsområdet. För användning av Worklist Editor hänvisas till *Snabbguide* eller *Användarhandledning för GEN-PROBE Worklist Editor*. Om TECAN Freedom EVO 100/4-instrument 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 försiktigt inverteras med jämna intervall under uppvärmningsperioden. Se Metodanmärkningar för information om utfällning som inte löser sig och för hantering av frysta prover.

## G. Pre-amplifiering

Pre-amplifieringstemperaturen måste vara 15 till 30 °C. Kör båda ställen parallellt. Om SB100 Dry Heat Bath/vortexblandare används, hänvisas till tillämpningsbladet SB100. Om TECAN Freedom EVO 100/4-instrument används, hänvisas 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 kalibratör 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 återstående prov och förvara det 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 *Metodanmärkningar*). 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 ledningen och så att alla tio munstyckena avger ett stadigt vätskeflöde.

10. Slå på vakuumpumpen och koppla loss suggrenröret vid den första kopplingen mellan suggrenröret och ventilklaftsflaskan. Se till att vakuumanometern uppfyller läckagetestspezifikationen. Det kan ta 15 sekunder innan denna avläsning erhålls. Anslut grenröret igen och se till att vakuumanometern uppfyller vakuumnivåspezifikationen. Låt vakuumpumpen vara på tills samtliga Target Capture-steg är slutförda och slangen till suggrenröret är helt torr.

Se bladet med vakuumspezifikationer för Target Capture-systemet på baksidan av *Användarhandledningen för Target Capture-systemet* eller kontakta Gen-Probe teknisk support för ytterligare information.

11. Anslut suggrenröret ordentligt till den första uppsättningen 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 utförts ska spetsarna matas tillbaka in 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:et. 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 såsom i Steg 11 och Steg 12.
17. Efter den sista aspirationen ska stället avlägsnas från TCS-basen och rören synas för att säkerställa att all vätska har aspirerats och att alla rör innehåller magnetiska partikelpellets. Om vätska syns, ska stället placeras på TCS-basen igen 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 på ett reaktionsställ (Steg 6 och 7 nedan) måste utföras inom 90 sekunder.**

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

1. Tillsätt 75 µL rekonstituerat analytspecifikt amplifieringsreagens i varje reaktionsrör med repetitionspipetten. 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 °C ± 1 °C i 10 ± 5 minuter.
5. Överför stället till ett vattenbad vid 42 °C ± 1 °C i 5 ± 2 minuter.
6. Med stället i vattenbadet avlägsnas förslutningskortet försiktigt och 25 µL rekonstituerat 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 avkylning av rören.
8. Inkubera stället vid 42 °C ± 1 °C i 60 ± 5 minuter.

## I. Post-amplifiering

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

## 1. Hybridisering

- a. Avlägsna stället från vattenbadet i pre-amplifieringssteget och överför det till området för post-amplifieringssteget. Tillsätt 100 µL rekonstituerad, analytspecifik probreagens 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. Tillsätt 250 µL selektionsreagens i varje rör med repetitionspipetten. 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 luminometern LEADER HC+ genom att placera en tom TTU i kassettposition nummer ett och utför protokollet TVÅTT en gång.
2. Se till att det finns tillräckligt med Auto Detect 1 och 2 för att analysen ska kunna slutföras.
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 senast 2 timmar efter avslutandet av inkubationen i selektionssteget (62 °C).
5. Bered en buffrad lösning för blekmedelsinaktivering genom att blanda lika volym 5,25 % (0,7 M) natriumhypoklorit och buffert för inaktiveringsvätska i en plastbehållare med stort lock. Etikertera och skriv utgångsdatumet på plastbehållaren. Denna buffrade blekmedelslösning för inaktivering är stabil i 4 veckor vid rumstemperatur.
6. När analysomgången är färdig, genererar analysprogrammet två rapporter, en räkörningsrapport och en kvotrapport, om analysomgångarna varit av typen med 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 den buffrade blekmedelslösningen. Låt TTU:erna stå i behållaren i 15 minuter före kassering. Rutiner för hantering och kassering ska fastställas av laboratoriechefen.

## Metodanmärkningar

## A. Provbereidning

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 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 så 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. Visuellt kontroll av den volym som pipetterats ned i TTU:n rekommenderas för att säkerställa korrekt volymöverföring. Korrekt volym krävs för noggranna resultat.
2. Se till att pipettspetsen sitter korrekt på pipetten och kontrollera att volyminställningen är korrekt. Visuellt kontroll av volyminställningen i slutet av varje TTU (vart 10:e rör) rekommenderas. Släpp pipettkolven långsamt och stadigt vid uppdragning av provet för att undvika generation av skum och bubblor.

## C. Reagenser

1. Probekonstitutionslösning kan utfällas vid förvaring. Värm lösningen vid  $62\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  i 1 till 2 minuter. Efter detta uppvärmningssteg får probekonstitutionslösningen användas även om utfällning finns kvar. Efter resuspendering ska ampullen blandas försiktigt genom inversion.
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. Target Capture-, amplifierings-, hybridiserings- och selektionsstegen är temperaturberoende. Det är därför absolut nödvändigt att vattenbadens temperaturer hålls inom angivna temperaturintervall.
2. Rumstemperatur definieras som 15 till  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## E. Tid

Target Capture-, amplifierings-, hybridiserings- och selektionsstegen är temperaturberoende. 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 förslutningskortet.

## G. Vattenbad

1. Vattennivån i vattenbadet måste hållas vid 3,8 till 5,0 cm (1,5 till 2,0 in), mätt från den stödjande metallbrickan (i botten på vattenbadet) 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

Laboratoriebänksytor och pipetter måste dekontamineras regelbundet med 2,5 till 3,5 % (0,35 till 0,5 M) natriumhypoklorit (blekmedelslösning). Låt blekmedelslösningen vara i kontakt med ytorna i minst 1 minut och skölj sedan med vatten. **Låt inte blekmedelslösningen torka.** Klorlösningar kan punktkorrodera utrustning och metall. Skölj noga av blekmedel från utrustning 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. Håll 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. Håll 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 rör om 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 ytan på spetsarna i tvättbuffertejektorn med pappershanddukar fuktade med 2,5 till 3,5 % (0,35 till 0,5 M) natriumhypokloritlösning (blekmedel). Skölj med vatten efter blekmedelssteget och torka sedan ytorna helt med pappershanddukar.

## 5. Ställ

Sänk ned stället i 2,5 till 3,5 % (0,35 till 0,5 M) natriumhypoklorit (blekmedelslösning) och se till att de täcks av lösningen. Håll ställen 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 iaktas under analysförfarandet.
2. TTU:er måste dekontamineras med buffrat blekmedel såsom beskrivs 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 PROGENSA PCA3-analys. 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 dosrespons-kalibreringskurvan (3). För ytterligare information hänvisas till *Användarhandledning för PROGENSA 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 PROGENSA 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-mRNA-kopior/PSA-mRNA-kopior multiplicerat med 1 000. Score kan endast beräknas utifrån resultat från giltiga analysomgångar och prover. Ogiltiga analysomgångar och prover måste analyseras igen 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. Laboratorieförhållanden fastställer gränsvärdet (se *Prestandaegenskaper* för ytterligare information).

Under vissa förhållanden tillhandahålls ett PCA3 Score-intervall ( $>[\text{Beräknat Score}]$  eller  $<[\text{Beräknat Score}]$ ). Om  $<[\text{Beräknat Score}]$  ligger under gränsvärdet, ska resultatet tolkas som NEGATIVT. Om  $>[\text{Beräknat Score}]$  ligger över gränsvärdet, ska resultatet tolkas som POSITIVT. Om ett numeriskt värde krävs, kan provutspädning och omanalys skapa 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 räkörningsrapporten och kvotrapporten anges informationen i formatet "s:a". Analysomgångsspecifika statuskoder ("s") anges före (till vänster om) kolonet och analys-specifika analyskoder ("a") anges efter (till höger om) kolonet. Analys-specifika 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 rapporteras i kvotrapporten och inga status- eller analyskoder förekommer i PCA3- eller PSA-statuskolumnen, betyder detta att båda analyterna var giltiga och inom gränsvärdena. 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 4a eller Tabell 4b 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 innehåller undantagssammanfattningen inga prover alls. I dessa fall krävs inga ytterligare åtgärder.

Om undantagssammanfattningen innehåller ett prov/prover för analysomgångar med på varandra följande analyser där båda analytanalysomgångarna är giltiga, hänvisas till Tabell 4a för anvisningar.

För enskilda analytanalysomgångar hänvisas till *Tolkning av status- och analyskoder*. I analysomgångar med på varandra följande analyser där en analytanalysomgång är ogiltig, ska den ogiltiga analysomgången göras 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 replikat gör ett prov ogiltigt (se *Kvalitetskontrollförfaranden* för ytterligare information).

Tabell 4a: Scenario för undantagssammanfattning för PROGENSA PCA3-analys

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

\*Gäller endast för ogiltiga prover inom en giltig analysomgång.

\*\*För värden utanför gränsvärdesintervallet beräknas "Beräknat Score" med användning av kopienivån 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 4b för anvisningar.

Tabell 4b: Scenario för kvotrapport för PROGENSA PCA3-analys

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

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

## D. Omanalys

## 1. Riktlinjer för omanalys

- 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.**
- Alla ogiltiga analysomgångar måste upprepas och alla ogiltiga prover från giltiga analysomgångar måste omanalyseras.
- Omanalysera prov/prover med användning av en ny uppsättning kalibratorer och kontroller.
- Korrekt förvaring av återstående prover före omanalys är väsentlig (se *Provtagning, -transport och -förvaring* för ytterligare information).
- 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

- 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].
- Invertera det behandlade urinprovet för att blanda det före utspädning av provet. Rekommenderad, men ej nödvändig, utspädning är 1:10 med användning av PROGNSA PCA3-provutspädningssats. I en ampull av lämplig storlek tillsätts 1 800 µL provspädningsmedel och 200 µL prov. Sätt ett lock på röret och invertera fem gånger för att blanda fullständigt. Spädningsfaktorn kommer att anges som "10" i analysomgångens arbetslista. Om båda analyterna ska omanalyseras, ska volymerna dubbleras (använd 3 600 µL provspädningsmedel och 400 µL prov). Se bipacksedeln för PROGNSA PCA3-provutspädningssats. Analysera det utspädda provet med analysen.
- Om provresultatet vid omanalys är över gränsvärdesintervallet igen, krävs ytterligare utspädning tills det interpolerade provresultatet ligger inom intervallet för kalibratorerna. Ytterligare utspädning av den första 1:10-utspädningen är tillåten, förutsatt att den första 1:10-utspädningen förvarats korrekt (se *Provtagning, -transport och -förvaring* för ytterligare information).

## Restriktioner

- PROGENSA PCA3-analys ska inte användas för patienter som tar läkemedel som 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.
- 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.
- Användning av denna analys förbehålls personal som har utbildning i förfarandet. Underlåtenhet att följa anvisningarna i denna bipacksedel kan ge felaktiga resultat.
- Varje laboratorium måste utföra oberoende validering av en LIS-överföringsprocess.
- Tillförlitliga resultat är beroende av korrekt urinprovtagning. Eftersom transportsystemet som används för denna analys inte medger att man mikroskopiskt bekräftar att provet är korrekt taget, är det nödvändigt att kliniker utbildas i korrekt provtagningsteknik. Se *Provtagning, -transport och -förvaring* för anvisningar. För utförlig information hänvisas till bipacksedeln i PROGNSA PCA3 transportsats för urinprover.
- Resultat från PROGNSA PSA3-analyser ska tolkas tillsammans med andra laboratorie- och kliniska data tillgängliga för klinikern. (Analysresultat kan påverkas av olämplig provtagning, olämplig provförvaring, tekniska fel eller provsammanblandning.)

## Prestandaegenskaper

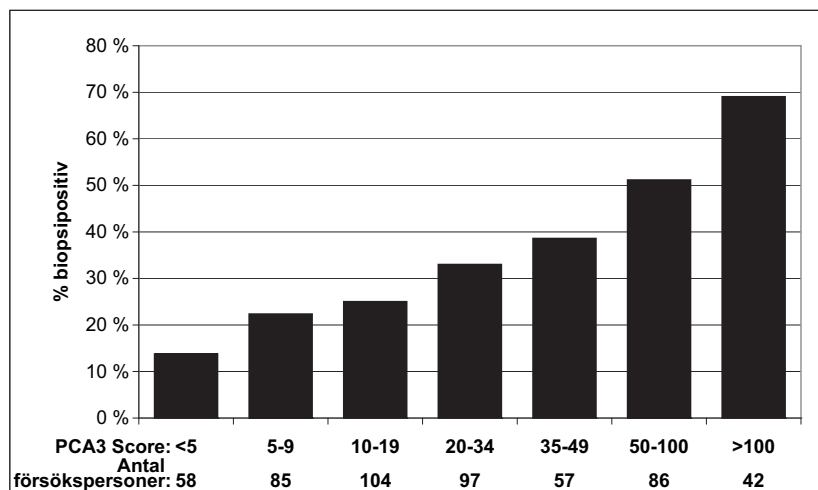
## A. Kliniska resultat

## 1. Diagnostisk sensitivitet och specificitet

Prestandaegenskaper för PROGNSA 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:

- Genomsnittsalder  $\pm$  SD =  $64 \pm 8$  år (medianvärde 63, intervall 32 till 89)
- Genomsnittlig serum-PSA-nivå =  $7,9 \pm 21,9$  µg/L (5,6, 0,3 till 484)
- Genomsnittlig prostatavolym (mätt med transrektalt ultraljud) =  $44 \pm 25$  cm<sup>3</sup> (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.

ROC-analys (ROC = receiver operating characteristic) 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 5 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 5: Diagnostisk sensitivitet och specificitet vid olika PCA3 Score-gränsvärden för PROGENSA PCA3-analys

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

2. Provstabilitetsstudier

- a. Stabilitet i helurin: Förstaportionsurin samlades in från 10 försökspersoner och förvarades vid 2 till 8 °C eller vid 30 °C före behandling genom tillsats till urintransportmedierna (UTM). Vid 2 till 8 °C observerades betydande nedbrytning av PCA3- och PSA-mRNA 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 eller 30 °C i upp till 38 dagar. Vid 4 °C var PCA3- och PSA-mRNA stabila i 21 dagar; vid 30 °C, i 5 dagar. Prover som förvarades vid -20 och -70 °C uppvisade PCA3- och PSA-mRNA-stabilitet i upp till 90 dagar.
- c. Stabilitet vid frysning/upptining: Prover cyklades mellan 37 och -70 °C sex gånger. Ingen minskning i PCA3- eller PSA-mRNA-kopienivåer observerades.

B. Analytiska resultat

1. Analytisk sensitivitet

En analytisk sensitivitetspanel bestående av utspätt *in vitro*-mRNA-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 1438 kopior/mL. Kvantifieringsgränsen för båda analyterna var Kalibrator 2.

2. Analytisk specificitet

- a. Osplitsat transkript: Analysen hade utformats för att endast detektera det prostatacancerspecifika exon 3-exon 4-splitsad PCA3-mRNA:et (2). Analysen detekterade inte 1 miljon kopior/mL osplitsad PCA3-mRNA signifikant över bakgrunden.
- b. Prostataspecificitet för PCA3-mRNA i urin: Prover tagna från försökspersoner som genomgått radikal prostatektomi (n = 97) analyserades med PROGENSA PCA3-analys, och PCA3-mRNA-nivåerna jämfördes med nivåerna hos försökspersoner före biopsi (n = 464). Medianvärdet för PCA3-mRNA-koncentrationen (kopior/mL) låg under analysens detektionsgräns för prover från försökspersoner som genomgått prostatektomi, medan medianvärdet för PCA3-mRNA-koncentrationen (kopior/mL) för prover från försökspersoner före biopsi var 7243 kopior/mL; dessa data bekräftar att PCA3-mRNA 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 typ som detekterades över PCA3-mRNA-detektionsgränsen för de vävnadstyper som listas i Tabell 6.

**Tabell 6: Vävnadstyper från män analyserades för PCA3-mRNA**

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

- d. Interfererande substanser: De substanser som listas i Tabell 7 tillsattes alikvoter av poolat, behandlat urin från män. Proverna analyserades med PROGENSA PCA3-analys enligt CLSI EP7-A2 (2005) (6). Vid de angivna koncentrationerna observerades ingen analysinterferens.

**Tabell 7: 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	1600 mg/L
Difenhydramin	19,6 µmol/L	Selen	0,275 mg/L
Paracetamol	1324 µmol/L		
Acetylsalicylsyra	3,62 mmol/L	<b>Urinens beståndsdelar</b>	
Ibuprofen	2425 µmol/L	<b>Substans</b>	<b>Analyskoncentration</b>
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 <sup>7</sup> celler/L
Doxycyclin	67,5 µmol/L	Erythrocyter	3,06 x 10 <sup>7</sup> celler/L
Fluoxetinhydroklorid	11,2 µmol/L	Albumin	50 g/L
Flutamid	1500 mg/L	Bilirubin (okonjugerat)	342 g/L
Dutasterid	1,5 mg/L	IgG	60 g/L

3. Noggrannhet

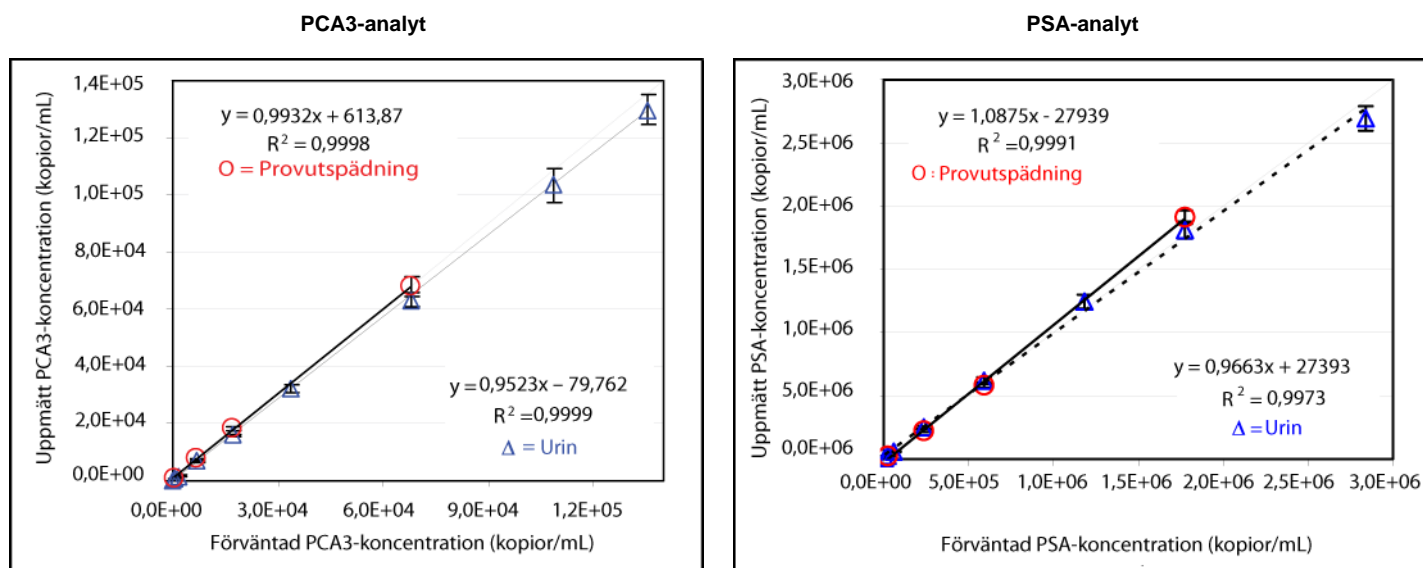
Noggrannheten hos PROGNSA PCA3-analys utvärderades enligt CLSI EP15-A2 (2005) (7). PCA3- och PSA-mRNA-transkript kvantifierades med ultraviolet/visuell spektrofotometri och tillsattes i behandlade, normala urinprover från kvinnor (ingen detekterbar PCA3- eller PSA-mRNA), varefter koncentrationer mättes genom PROGNSA PCA3-analys. Procentuellt (%) utbyte beräknades som förhållandet mellan uppmätt koncentration (kopior/mL) och tillsatta koncentration (kopior/mL), multiplicerat med 100.

Tabell 8: Kopieutbyte vid PROGNSA 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

Det linjära intervallet vid PROGNSA PCA3-analys bestämdes enligt CLSI EP6-A (2003) (8) baserat på linjär regressionsanalys (minsta kvadratmetoden). Två grupper av utspädningsserier bereddes från prover innehållande hög koncentration av PCA3- och PSA-mRNA. En uppsättning spädades i behandlad urin från kvinnor och en uppsättning spädades i provspädningsmedel. Spädningarna sträckte sig över hela analysintervall 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. PROGNSA PCA3-analyslinearitet för PCA3- och PSA-analyter

5. Precision

Analysprecisionen 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*-mRNA-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 9 visar repeterbarhetsprecisionen för PROGNSA PCA3-analys vid olika analyskoncentrationsnivåer.

Tabell 9: PROGNSA PCA3-analysrepeterbarhet

Analyt	Panel Komponent	Genomsnitt kopior/mL	Repeterbarhet SD	Repeterbarhet 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*-mRNA-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 10 och 11 sammanfattar total, inom-analysomgångs-, mellan-analysomgångs-, operatörs-, utrustnings- och partiprecision för PROGNSA PCA3-analys avseende koncentration (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 visade litet bidrag till total analysvarians. Dessa resultat visar att analysen uppvisar reproducerbarhet och att den primära källan för variationer är slumpfel (inom-analysomgång).

Tabell 10: PROGNSA PCA3-analysreproducerbarhet: Kopia/mL-analys

Analyt	Panel Komponent	n	Uppmätt kopior/mL	Totalt VK	Inom-analysomgångs-VK	Mellan-analysomgångs-VK	VK, mellan-operatörs	VK, mellan-utrustnings	VK, mellan-parti
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 11: PROGNSA PCA3-analysreproducerbarhet: PCA3 Score-analys

Panel Komponent*	n	Score-medelvärde	Totalt VK	Inom-analysomgångs-VK	Mellan-analysomgångs-VK	VK, mellan-operatörs	VK, mellan-utrustnings	VK, mellan-parti
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-mRNA-transkript och inkluderades därför inte i denna analys.

## Litteratur

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<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.

### Utvecklad, tillverkad och distribuerad av:



Gen-Probe Incorporated  
San Diego, CA 92121, USA

Amerikansk och internationell kontaktinformation:

Kundservice: +1 858 410 8002 customerservice@gen-probe.com

Teknisk support: +1 858 410 8511 technicalsupport@gen-probe.com

Samtal från USA och Kanada utan rikssamtalsavgift:

Kundservice: +1 800-523 5001

Teknisk support: +1 888 484 4747

www.gen-probe.com

**EC REP**

EMERGO EUROPE  
Molenstraat 15  
2513 BH, The Hague  
The Netherlands

GEN-PROBE, GEN-PROBE och design, APTIMA, DTS, LEADER, PROGNSA och SB100 är varumärken som tillhör Gen-Probe Incorporated. Eppendorf (stiliserat) är ett varumärke som tillhör Eppendorf AG.

RAININ är ett varumärke som tillhör Rainin Instrument, LLC.

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

Andra märkesnamn som kan förekomma i denna bipacksedel tillhör respektive ägare.

© 2006-2011 Gen-Probe Incorporated.

501377SV Rev. C

2011-05