

PROGENSA™ PCA3 Assay

Per l'uso diagnostico *in vitro*.

Solo per l'esportazione dagli U.S.A.

Finalità d'uso	1
Sommario e spiegazione della prova	1
Principi della procedura	1
Reagenti	1
Materiali	3
Avvertenze e precauzioni	3
Requisiti di manipolazione e conservazione	4
Raccolta, trasporto e magazzinaggio dei campioni	5
Procedura di analisi	6
Note procedurali	9
Procedure di controllo della qualità	10
Interpretazione dei risultati	10
Limiti	13
Caratteristiche delle prestazioni	13
Bibliografia	18

Finalità d'uso

Il PROGENSA™ PCA3 Assay è una prova di amplificazione dell'acido nucleico (NAAT) *in vitro* che rileva l'acido ribonucleico messaggero (mRNA) del gene 3 del Cancro alla Prostata (PCA3) in campioni di urina maschile per generare un punteggio definito "PCA3 Score". Il PCA3 Score è concepito per l'uso insieme ad algoritmi diagnostici standard di cura come ausilio nella diagnosi del cancro alla prostata.

Sommario e spiegazione della prova

L'uso della prova dell'antigene sierico specifico della prostata (PSA) per lo screening del cancro alla prostata ha portato alla diagnosi biotipica di tumori più piccoli e precedentemente non rilevati (1), creando così un nuovo dilemma diagnostico: solo una frazione di uomini che presentano aumentati livelli di PSA sierico hanno un cancro alla prostata rilevabile. Gli uomini con almeno una biopsia negativa spesso presentano livelli persistentemente aumentati di PSA sierico, dovuti principalmente a prostate ingrossate e ad iperplasia prostatica benigna (IPB). Eppure, una proporzione significativa di uomini con livelli leggermente aumentati di PSA sierico (2,5-4,0 µg/l) presentano, o svilupperanno, un cancro alla prostata clinicamente significativo (1). Sebbene la biopsia resti il "gold standard" per il rilevamento del cancro alla prostata, test più accurati, con una migliore specificità, sono necessari per aiutare a guidare la decisione di eseguire una biopsia della prostata.

Il PCA3 (noto anche come "PCA3^{DD3}" o "DD3^{PCA3}") è un mRNA non codificante specifico della prostata che viene iperespresso in elevate quantità nelle cellule cancerose della prostata, con un livello mediano di 66 volte superiore alla norma rispetto al tessuto benigno adiacente (2). In contrasto, l'espressione del gene PSA è simile nelle cellule cancerose e in quelle benigne; i livelli di mRNA del PSA possono quindi essere usati per standardizzare la quantità di acido ribonucleico (RNA) specifico della prostata nei campioni per analisi molecolari. È stata dimostrata l'attuabilità di analisi molecolari quantitative basate su PCA3 partendo da sedimenti di urina (2) e da urina intera (3).

Il PROGENSA PCA3 Assay utilizza urina intera raccolta a seguito di esame digito-rettale (DRE) consistente in tre pressioni per ciascun lobo. Il DRE libera le cellule della prostata - attraverso il sistema di dotti di quest'ultima - nel tratto urinario, dove possono essere raccolte nell'urina di primo getto. L'urina viene trattata mediante l'aggiunta del Mezzo di

trasporto dell'urina (UTM), che provoca la lisi delle cellule e stabilizza l'RNA. Gli mRNA di PCA3 e PSA vengono quantificati, e il PCA3 Score viene determinato in base al rapporto dell'mRNA di PCA3 e PSA. Oltre a standardizzare il segnale del PCA3, la misurazione dell'mRNA del PSA serve anche a confermare che il prodotto di RNA specifico della prostata è sufficiente a generare un risultato valido. Un PCA3 Score superiore è correlato ad una più alta probabilità di una biopsia della prostata positiva.

Principi della procedura

Il PROGENSA PCA3 Assay è composto da due prove quantitative di amplificazione degli acidi nucleici. Il dosaggio combina le tecnologie del target capture, dell'Amplificazione mediata dalla trascrizione (TMA) e del Dosaggio con protezione dell'ibridizzazione (HPA) per - rispettivamente - sveltire l'analisi dei campioni di urina, amplificare l'mRNA target e rilevare l'amplicon.

Quando il PROGENSA PCA3 Assay viene eseguito in laboratorio, le molecole di mRNA target vengono isolate dai campioni di urina mediante target capture. Gli oligonucleotidi ("oligonucleotidi di cattura") che sono complementari alle regioni specifiche della sequenza dei target vengono ibridizzati ai target presenti nel campione di urina. Per ciascun target viene usato un oligonucleotide di cattura separato. Il target ibridizzato viene quindi catturato su microparticelle magnetiche che vengono separate dal campione di urina in un campo magnetico. Processi di lavaggio vengono utilizzati per rimuovere i componenti estranei dal tubo di reazione. I procedimenti di separazione magnetica e lavaggio vengono eseguiti con un sistema di target capture.

L'amplificazione del target si verifica mediante TMA, che è un metodo di amplificazione degli acidi nucleici basato su trascrizione che utilizza due enzimi, la trascrittasi inversa del virus della leucemia murina di Moloney (MMLV) e la polimerasi dell'RNA T7. Per ciascun target viene usata una serie univoca di primer. La trascrittasi inversa viene usata per generare una copia di acido desossiribonucleico (DNA) (contenente una sequenza promotrice per la polimerasi dell'RNA T7) della sequenza target. La polimerasi dell'RNA T7 produce copie multiple di amplicon di RNA dal modello della copia di DNA.

Il rilevamento viene ottenuto mediante HPA usando sonde di acido nucleico con filamento unico e marcatura chemiluminescente che sono complementari all'amplicon. Per ciascun amplicon di target vengono usate sonde separate. Le sonde di acido nucleico marcate si ibridizzano specificamente con l'amplicon. Il reagente Selection si differenzia fra sonde ibridizzate e non ibridizzate inattivando la marcatura sulle sonde non ibridizzate. Durante il processo di rilevamento, il segnale chemiluminescente prodotto dalla proba ibridizzata viene misurato in un luminometro e viene riferito come Unità relative di luce (Relative Light Unit o RLU).

Gli mRNA di PCA3 e PSA vengono quantificati in tubi di reazione separati e viene determinato il PCA3 Score. I calibratori contenenti quantità note di trascrizione di RNA di PCA3 o PSA vengono inclusi in ogni seduta di dosaggio e usati per generare una curva standard. I controlli di PCA3 e PSA vengono anch'essi inclusi per verificare l'accuratezza dei risultati interpolati in base alla curva standard.

Reagenti

Reagenti e materiali forniti nel PROGENSA PCA3/PSA Assay Kit per il PROGENSA PCA3 Assay sono indicati sotto. Sono indicati anche i simboli di identificazione dei reagenti, accanto al rispettivo nome del reagente.

PROGENSA™ PCA3/PSA Assay Kit, 2 x 100 reazioni, N. di parte 302355 (8 scatole)

PROGENSA PCA3 100-Reaction Kit

PROGENSA PCA3 Scatola refrigerata - Conservare a 2 °C - 8 °C			
Simbolo	Componente	Quantità	Descrizione
A	PCA3 Reagente di amplificazione	1 X 100 reazioni	Acidi nucleici non infettivi liofilizzati in soluzione tamponata con HEPES contenente <10% di agente strutturante.
E	Reagente enzimatico PCA3/ PSA	1 X 100 reazioni	Transcrittasi inversa e polimerasi dell'RNA liofilizzate in soluzione tamponata con HEPES contenente <10% di agente strutturante.
P	Reagente sonda PCA3	1 X 100 reazioni	Sonde di DNA non infettive chemiluminescenti liofilizzate in soluzione tamponata con succinato contenente <5% di agente strutturante e <5% di lauril solfato di litio.

PROGENSA PCA3 Scatola a temperatura ambiente - Conservare a 15 °C - 30 °C

Simbolo	Componente	Quantità	Descrizione
AR	PCA3 Soluzione di ricostituzione di amplificazione	1 X 9,3 ml	Soluzione acquosa contenente conservanti (<1% di parabenzoiati).
ER	Enzima PCA3/ PSA Soluzione di ricostituzione	1 X 3,3 ml	Soluzione tamponata con HEPES contenente un surfattante (Triton X-100 al 10%) e glicerolo al 20%.
PR	Soluzione di ricostituzione della sonda PCA3/PSA	1 X 12,4 ml	Soluzione tamponata con succinato contenente <5% di lauril solfato di litio.
S	PCA3/PSA Reagente Selection	1 X 31 ml	Soluzione tamponata con borato contenente surfattante (Triton X-100 all'1%).
TCR	Reagente PCA3 Target Capture	1 X 22 ml	Acido nucleico non infettivo in soluzione tamponata con HEPES contenente fase solida (<0,5 mg/ml).
	Carte adesive protettive	1 confezione	
	Collari di ricostituzione	1 confezione	

PROGENSA PCA3 Kit di calibratori e controlli - Conservare a 2 °C - 8 °C

Simbolo	Componente	Quantità	Descrizione
CAL	Calibratore 1 PCA3	1 X 2,0 ml	Soluzione tamponata con fosfato contenente <5% di lauril solfato di litio.

Simbolo	Componente	Quantità	Descrizione
CAL	Calibratori PCA3 2-5	4 X 1,7 ml	Acido nucleico di PCA3 non infettivo in soluzione tamponata con fosfato contenente <5% di lauril solfato di litio.
PC	Controlli positivi PCA3	2 X 1,7 ml	Acido nucleico di PCA3 non infettivo in soluzione tamponata con fosfato contenente <5% di lauril solfato di litio.

PROGENSA PSA 100-Reaction Kit

PROGENSA PSA Scatola refrigerata - Conservare a 2 °C - 8 °C			
Simbolo	Componente	Quantità	Descrizione
A	Reagente di amplificazione del PSA	1 X 100 reazioni	Acidi nucleici non infettivi liofilizzati in soluzione tamponata con HEPES contenente <10% di agente strutturante.
E	Reagente enzimatico PCA3/ PSA	1 X 100 reazioni	Transcrittasi inversa e polimerasi dell'RNA liofilizzate in soluzione tamponata con HEPES contenente <10% di agente strutturante.
P	Reagente sonda PSA	1 X 100 reazioni	Sonde di DNA non infettive chemiluminescenti liofilizzate in soluzione tamponata con succinato contenente <5% di agente strutturante e <5% di lauril solfato di litio.

PROGENSA PSA Scatola a temperatura ambiente - Conservare a 15 °C - 30 °C

Simbolo	Componente	Quantità	Descrizione
AR	PSA Soluzione di ricostituzione di amplificazione	1 X 9,3 ml	Soluzione acquosa contenente conservanti (<1% di parabenzoiati).
ER	Enzima PCA3/ PSA Soluzione di ricostituzione	1 X 3,3 ml	Soluzione tamponata con HEPES contenente un surfattante (Triton X-100 al 10%) e glicerolo al 20%.
PR	Soluzione di ricostituzione della sonda PCA3/PSA	1 X 12,4 ml	Soluzione tamponata con succinato contenente <5% di lauril solfato di litio.
S	PCA3/PSA Reagente Selection	1 X 31 ml	Soluzione tamponata con borato contenente surfattante (Triton X-100 all'1%).
TCR	Reagente PSA Target Capture	1 X 22 ml	Acido nucleico non infettivo in soluzione tamponata con HEPES contenente fase solida (<0,5 mg/ml).
	Carte adesive protettive	1 confezione	

PROGENSA PSA Scatola a temperatura ambiente - Conservare a 15 °C - 30 °C

Simbolo	Componente	Quantità	Descrizione
	Collari di ricostituzione	1 confezione	

PROGENSA PSA Kit di calibratori e controlli - Conservare a 2 °C - 8 °C

Simbolo	Componente	Quantità	Descrizione
CAL	Calibratore 1 PSA	1 X 2,0 ml	<i>Soluzione tamponata con fosfato contenente <5% di lauril solfato di litio.</i>
CAL	Calibratori PSA 2-5	4 X 1,7 ml	<i>Acido nucleico di PSA non infettivo in soluzione tamponata con fosfato contenente <5% di lauril solfato di litio.</i>
PC	Controlli positivi PSA	2 X 1,7 ml	<i>Acido nucleico di PSA non infettivo in soluzione tamponata con fosfato contenente <5% di lauril solfato di litio.</i>

APTIMA® Assay Fluids - Conservare a 15 °C - 30 °C (2 scatole)

Simbolo	Componente	Quantità	Descrizione
W	Soluzione di lavaggio	1 X 402 ml	<i>Soluzione tamponata HEPES contenente <2% di dodecilsolfato di sodio.</i>
DF	Tampone per liquido di disattivazione	1 X 402 ml	<i>Soluzione tamponata con bicarbonato.</i>
O	Reagente oleoso	1 X 24,6 ml	<i>Olio di silicone.</i>

Nota – Tutti i materiali inclusi nel PROGENSA PCA3/PSA Assay Kit possono anche essere acquistati separatamente (vedere la sezione *Materiali* per dettagli in merito).

Materiali

Nota – I materiali disponibili presso la Gen-Probe hanno indicati i rispettivi numeri di parte.

Materiali richiesti ma non forniti

PROGENSA™ PCA3 Urine Specimen Transport Kit (N. di parte 302352)

GEN-PROBE® LEADER® HC+ Luminometer (N. di parte 104747F)

Sistema GEN-PROBE® Target Capture (TCS) (N. di parte 104555F)

APTIMA® Auto Detect Kit (N. di parte 301048)

2 pipettatori Eppendorf Repeater Plus (N. di parte 305725)

Puntali per pipettatori a ripetizione (2,5 ml, 5,0 ml, 25,0 ml)

Uno dei seguenti articoli:

2 miscelatori vortex per unità multiprovetta (N. di parte 102160F)

3 bagni di acqua circolante (62 °C ± 1 °C, 42 °C ± 1 °C, 62 °C ± 1 °C) (N. di parte 104586F)

3 inserti per bagni di acqua (N. di parte 104627)

Oppure:

2 SB100® Dry Heat Bath/Vortexer (N. di parte 105524F) (Ulteriori strumenti SB100 potrebbero essere richiesti, a seconda della produttività desiderata)

Micropipettatore, 1000 µl RAININ PR1000 (N. di parte 104216)

Puntali, 1000 µl PR1000 (N. di parte 105049)

Pipettatore, Eppendorf 20-200 µl (N. di parte 105726)

Puntali, pipetta da 20-200 µl

Candeggina (soluzione di ipoclorito di sodio, al 5,25% o 0,7 M minimo)

Contenitore di plastica con coperchio grande

Contenitori standard per la raccolta di urina, senza conservanti

Materiali disponibili presso la Gen-Probe

PROGENSA™ PCA3 100-Reaction Kit (N. di parte 302354)

PROGENSA™ PSA 100-Reaction Kit (N. di parte 302357)

PROGENSA™ PCA3 Calibrators and Controls Kit (N. di parte 302353)

PROGENSA™ PSA Calibrators and Controls Kit (N. di parte 302356)

PROGENSA™ PCA3/PSA Proficiency Panels (N. di parte 302350)

PROGENSA™ PCA3 Specimen Diluent Kit (N. di parte 302351)

APTIMA® Assay Fluids Kit (N. di parte 302002C)

Unità a dieci provette (TTU) (N. di parte TU0022)

Vassoi con dieci puntali (TTC) (N. di parte 304578)

SysCheck (N. di parte 301078)

Materiali opzionali

TECAN Freedom EVO 100/4 (N. di parte 900932)

Gruppo piastra del piano PCA3, DTS® 800 (N. di parte 902021)

Serbatoio del reagente (modulo per quarto da 40 ml) (N. di parte 104765)

Serbatoio del reagente diviso (modulo per quarto da 19 ml x 2) (N. di parte 901172)

Provette di trasporto (N. di parte 302521)

Puntali monouso di pipetta con filtro (1 ml) (N. Tecan 10612513)

Cappucci penetrabili sostitutivi (N. di parte 302520)

Cappucci non penetrabili sostitutivi (N. di parte 103036A)

Avvertenze e precauzioni

- Per l'uso diagnostico *in vitro*.
- Solo per l'esportazione dagli U.S.A.

Pertinenti al laboratorio

- Usare solo contenitori da laboratorio monouso forniti o indicati in modo specifico come monouso.
- Adottare le consuete precauzioni di laboratorio. Non mangiare, bere né fumare nelle aree di lavoro. Indossare guanti monouso senza talco, occhiali protettivi e camici da laboratorio quando si maneggiano campioni di urina e reagenti del kit. Lavarsi accuratamente le mani dopo aver maneggiato campioni di urina e reagenti del kit.
- Avvertenza: irritanti, corrosivi.** Evitare di fare entrare in contatto l'Auto Detect 1 e l'Auto Detect 2 con la pelle, gli occhi e le mucose. Se questi liquidi vengono a contatto con pelle od occhi, risciacquare con acqua le zone colpite. In caso di versamento accidentale di questi liquidi, diluire il versamento con acqua prima di asciugarlo.
- Superfici di lavoro, pipettatori e altre apparecchiature devono essere decontaminati regolarmente con ipoclorito di sodio al 2,5%-3,5% (0,35 M-0,5 M) (soluzione di candeggina) (vedere *Note procedurali*).
- Per ridurre al minimo la contaminazione da amplicon nel dosaggio, si raccomanda caldamente di disporre di un'area separata per la post-amplificazione. Quest'area dedicata dovrebbe essere lontana-

dall'area di pre-amplificazione, dove hanno luogo la preparazione del reagente, la cattura del target e l'amplificazione.

- H. Per contribuire ad evitare la contaminazione da amplicon del laboratorio, disporre le aree secondo un flusso di lavoro unidirezionale, dalla preparazione del reagente fino alla post-amplificazione. Campioni, apparecchiature e reagenti non vanno riportati nell'area nel quale è stato eseguito un procedimento precedente. Il personale non dovrebbe ritornare nelle aree di lavoro precedenti senza le adeguate salvaguardie contro la contaminazione.

Pertinenti ai campioni

- I. Dopo l'aggiunta dell'urina, il livello del liquido nella provetta di trasporto del campione di urina deve rientrare inizialmente fra le due righe indicatrici nere marcate sull'etichetta della provetta. In caso contrario, il campione va rifiutato.
- J. Mantenere le corrette condizioni di conservazione durante la spedizione del campione, per assicurarne l'integrità. La stabilità del campione in condizioni di spedizione diverse da quelle raccomandate non è stata determinata.
- K. Le date di scadenza indicate nei kit per la raccolta si rivolgono al centro di raccolta e non alla struttura di analisi. I campioni raccolti in qualsiasi momento prima della data di scadenza indicata nel kit di raccolta, e che siano trasportati e conservati seguendo le istruzioni dell'insero informativo della confezione, sono validi per l'analisi anche se la data di scadenza della provetta di raccolta è passata.
- L. Conservare tutti i campioni alle temperature specificate. L'esecuzione del dosaggio potrebbe essere influenzata dall'uso di campioni conservati in modo erraneo. Vedere *Raccolta, trasporto e magazzino dei campioni* per istruzioni specifiche.
- M. I campioni di urina potrebbero essere infettivi. Nell'eseguire questo dosaggio, adottare le precauzioni universali. Metodi adeguati di manipolazione e smaltimento vanno stabiliti dal direttore del laboratorio. Questa procedura va svolta solo da personale adeguatamente qualificato e competente nell'uso del PROGENSA PCA3 Assay, e adeguatamente addestrato nella manipolazione di materiali infettivi.
- N. Durante i procedimenti di manipolazione di campioni, evitare la contaminazione incrociata. I campioni di urina possono contenere livelli elevati di mRNA target. Assicurarsi che i contenitori dei campioni non vengano in contatto reciproco ed eliminare i materiali usati senza passare sopra i contenitori aperti. Se i guanti entrano in contatto con un campione, cambiarli per evitare la contaminazione incrociata.

Pertinenti al dosaggio

- O. Non usare questo kit dopo la data di scadenza. **Non scambiare, mescolare o combinare reagenti provenienti da kit con numeri di lotto diversi.**
- P. Conservare tutti i reagenti del dosaggio alle temperature specificate. L'esecuzione del dosaggio potrebbe essere influenzata dall'uso di reagenti di dosaggio conservati in modo erraneo. Vedere *Requisiti di manipolazione e conservazione e Note procedurali* per istruzioni specifiche.
- Q. Per la disattivazione del dosaggio (vedere *Procedura di analisi*), la concentrazione minima della candeggina deve essere di ipoclorito di sodio al 2,6% (0,35 M) **dopo** la diluizione 1:1 con il tampone di disattivazione. La candeggina iniziale, dunque, deve essere come minimo composta da ipoclorito di sodio al 5,25% (0,7 M) per poter ottenere la concentrazione finale richiesta per la disattivazione.
- R. Vanno usati puntali con tappi idrofobi. A questo dosaggio vanno dedicati come minimo due pipettatori a ripetizione: uno per l'uso nei procedimenti di pre-amplificazione ed uno per l'uso nei procedimenti di post-amplificazione. A meno che non si usi lo strumento TECAN Freedom EVO 100/4, occorre dedicare un

micropipettatore al trasferimento dei campioni. Tutti i pipettatori vanno puliti regolarmente come descritto in *Note procedurali*.

- S. Quando si usano pipettatori a ripetizione per l'aggiunta dei reagenti, non toccare il tubo di reazione con il puntale del pipettatore, onde evitare il carryover da una provetta all'altra.
- T. Per ottenere risultati accurati del dosaggio occorre una miscelazione adeguata. Per dettagli completi, vedere *Note procedurali*.
- U. Ai procedimenti di pre-amplificazione, amplificazione e post-amplificazione vanno dedicati bagni di acqua separati.
- V. Alcuni reagenti di questo kit presentano etichette con simboli di rischio e sicurezza, in osservanza della Direttiva europea 1999/45/CE, e vanno manipolati di conseguenza. Schede sulla sicurezza dei materiali possono essere visualizzate presso il sito www.genprobe.com e sono disponibili dietro richiesta.

Requisiti di manipolazione e conservazione

- A. Per informazioni sulla conservazione dei reagenti, consultare la Tabella 1.

Tabella 1 – Conservazione dei reagenti

Reagente/ Liquido	Conservazione dei prodotti non aperti	Aperti/Ricostituiti Stabilità (fino alla data di scadenza)
Reagenti di amplificazione	2 °C - 8 °C fino alla data di scadenza	30 giorni a 2 °C - 8 °C*
Reagenti sonda	2 °C - 8 °C fino alla data di scadenza	30 giorni a 2 °C - 8 °C*
Reagente enzimatico	2 °C - 8 °C fino alla data di scadenza	30 giorni a 2 °C - 8 °C*
Reagenti Target Capture	15 °C - 30 °C fino alla data di scadenza	30 giorni a 15 °C - 30 °C
Soluzione di ricostituzione di amplificazione	2 °C - 30 °C fino alla data di scadenza	N/P (monouso)
Soluzione di ricostituzione della sonda	2 °C - 30 °C fino alla data di scadenza	N/P (monouso)
Soluzione di ricostituzione dell'enzima	2 °C - 30 °C fino alla data di scadenza	N/P (monouso)
Reagente Selection	2 °C - 30 °C fino alla data di scadenza	30 giorni a 15 °C - 30 °C
Calibratori	2 °C - 8 °C fino alla data di scadenza	N/P (seduta singola)
Controlli	2 °C - 8 °C fino alla data di scadenza	N/P (seduta singola)
Reagente oleoso	15 °C - 30 °C fino alla data di scadenza	30 giorni a 15 °C - 30 °C
Soluzione di lavaggio	15 °C - 30 °C fino alla data di scadenza	30 giorni a 15 °C - 30 °C
Tampone per liquido di disattivazione	15 °C - 30 °C fino alla data di scadenza	28 giorni a 15 °C - 30 °C

* Si può usare di nuovo per altre sedute di dosaggio fino a quattro volte, purché la quantità totale di tempo in cui resta a temperatura ambiente non sia superiore alle 4 ore.

- B. **Non conservare il reagente Target Capture a temperature inferiori a 15 °C.**
- C. Il reagente sonda e il reagente sonda ricostituito sono fotosensibili. Proteggere questi reagenti da una prolungata esposizione alla luce durante il magazzinaggio e la preparazione all'uso.
- D. **Non congelare i reagenti.**
- E. Non usare i reagenti né i liquidi dopo la data di scadenza.
- F. I calibratori ed i controlli PROGNSA PCA3 e PSA sono flaconi da utilizzare per un'unica seduta e vanno smaltiti dopo l'uso.
- G. Cambiamenti nell'aspetto fisico del reagente fornito possono indicare instabilità o deterioramento di questi materiali. Se si notano cambiamenti nell'aspetto fisico dei reagenti una volta che siano stati rimessi in sospensione (per es. evidenti cambiamenti nel colore o nella torbidità del reagente indicativi di contaminazione microbica), contattare l'Assistenza tecnica Gen-Probe prima dell'uso.
- H. Avanzi di reagenti aperti o ricostituiti possono essere usati in dosaggi successivi se sono stati conservati adeguatamente dopo l'uso iniziale. Il reagente avanzato può essere unito a reagenti appena preparati o ad altri reagenti avanzati dello stesso lotto. **Non scambiare, mescolare o combinare reagenti provenienti da kit con numeri di lotto diversi.** Nessun componente del reagente raggruppato può superare i limiti di conservazione dei reagenti aperti o ricostituiti. Assicurarsi che il reagente raggruppato sia stato miscelato accuratamente e che sia stato preparato un volume sufficiente a fornire abbastanza reagente per un'intera seduta di dosaggio.

Raccolta, trasporto e magazzinaggio dei campioni

Il PROGNSA PCA3 Assay è concepito per la quantificazione dell'mRNA di PCA3 e PSA nell'urina di primo getto raccolta dopo un DRE consistente in tre pressioni per ciascun lobo. L'urina viene trattata usando il PROGNSA PCA3 Urine Specimen Transport Kit. La stabilità dell'mRNA di PCA3 e PSA nell'urina e nell'urina trattata è stata stabilita monitorando i livelli delle copie di mRNA nei campioni di urina raccolti seguendo le istruzioni indicate sotto.

- A. Istruzioni per la raccolta e il trattamento dei campioni di urina
 1. Si consiglia di chiedere al paziente di bere una grande quantità d'acqua (circa 500 ml) per essere certi di ottenere una quantità di urina sufficiente per la raccolta.
 2. Subito prima della raccolta di urina, eseguire un esame digito-rettale (DRE) come descritto sotto.

Applicare pressione sulla prostata, abbastanza da comprimere la superficie di circa 1 cm, dalla base all'apice e dalla linea laterale a quella mediana per ciascun lobo, come illustrato nella Figura 1. **Eseguire esattamente tre pressioni per ciascun lobo. Questa operazione non va intesa come un massaggio prostatico.**

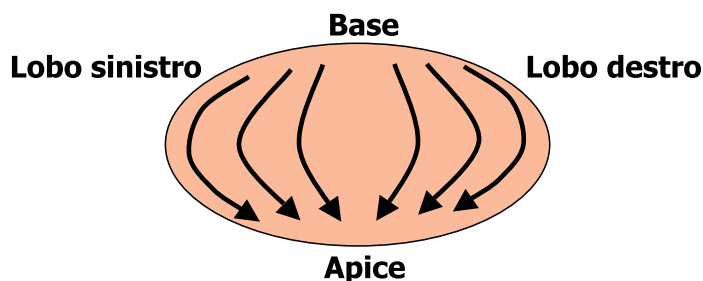


Figura 1. Giusta direzione della pressione applicata alla prostata

3. Dopo il DRE, chiedere al paziente di raccogliere l'urina di primo getto (circa 20-30 ml del getto di urina iniziale) in una coppetta per raccolta adeguatamente etichettata. Deve essere il campione di urina del primo getto successivo al DRE. Usare una coppetta per raccolta priva di qualsiasi conservante. Se un paziente non riesce a interrompere il flusso di urina e fornisce

una quantità di urina superiore ai primi 20-30 ml richiesti, conservare l'intero volume fornito. Se il paziente non è in grado di fornire il volume di urina richiesto, si tenga presente che per eseguire il PROGNSA PCA3 Assay sono necessari almeno 2,5 ml di urina.

4. **I campioni di urina non trattati, se non vengono trattati immediatamente, devono essere mantenuti ad una temperatura compresa fra 2 e 8 °C, oppure conservati sotto ghiaccio. Il campione di urina raffreddato e non trattato va trasferito nella provetta di trasporto del campione di urina entro 4 ore dalla raccolta. Non congelare i campioni di urina non trattati.**
 5. Per trattare i campioni di urina, chiuderli bene e capovolgerli 5 volte per rimettere le cellule in sospensione. Togliere il cappuccio della provetta di trasporto del campione di urina e poi, con la pipetta di trasferimento monouso fornita, trasferire nella provetta 2,5 ml di urina raccolta. Il giusto volume di urina sarà stato aggiunto quando il livello del liquido si troverà fra le righe di riempimento nere stampate sull'etichetta della provetta di trasporto del campione di urina.
 6. Richiudere bene il cappuccio sulla provetta di trasporto del campione di urina e capovolgere 5 volte il campione per miscelarlo. Questo sarà ora il campione di urina trattato.
- B. Trasporto e conservazione dei campioni prima dell'analisi
 1. I campioni di urina trattati devono essere trasportati al laboratorio nella provetta di trasporto del campione di urina ad una temperatura pari o inferiore a 30 °C (possono essere congelati). Devono essere prese disposizioni per il trasporto per assicurare che i campioni vengano ricevuti presso il laboratorio di analisi entro 5 giorni dalla raccolta. Una volta ricevuta la spedizione, il laboratorio può conservare i campioni ad una temperatura compresa fra 2 e 8 °C per un massimo di 14 giorni. Dopodiché il campione dovrà essere smaltito. Se sono necessari periodi più lunghi, i campioni possono essere conservati ad una temperatura pari o inferiore a -20 °C per un massimo di 90 giorni. Consultare la Tabella 2 per i tempi di conservazione permessi a diverse temperature.

Tabella 2 – Durata di conservazione dei campioni di urina trattati

Temperatura di conservazione	Tempo
Conservazione e spedizione dei campioni trattati:	
a 30 °C o temperatura inferiore	fino a 5 giorni*
Dopo la ricezione presso il laboratorio di analisi:	
da 2 a 8 °C	fino a 14 giorni
-20 °C o temperatura inferiore	fino a 90 giorni

*Tempo massimo per la spedizione a 30 °C o temperature inferiori.

2. I campioni di urina trattati possono essere sottoposti a 5 cicli di congelamento-scongelo.
- C. Conservazione dei campioni dopo l'analisi:
 1. I campioni che sono stati analizzati devono essere conservati su una rastrelliera in posizione verticale.
 2. Le provette di trasporto dei campioni di urina, se non vengono richiuse con un cappuccio intatto, vanno coperte con una nuova barriera pulita di plastica o alluminio.
 3. Se i campioni dosati devono essere congelati o spediti, rimuovere i cappucci penetrabili dalle provette di trasporto dei campioni di urina e sostituirli con nuovi cappucci non penetrabili. Se i campioni devono essere spediti per essere

sottoposti ad analisi in un'altra struttura, occorre mantenere le temperature raccomandate. **Evitare gli schizzi e la contaminazione incrociata.**

Nota – Attenersi ai requisiti sull'imballaggio della norma PI650 dell'Associazione IATA (International Air Transportation Association) per il trasporto dei campioni di urina con i normali vettori aerei o terrestri.

Procedura di analisi

A. Preparazione dell'area di lavoro

1. Regolare un bagno di acqua su $62\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ per la pre-amplificazione, un secondo bagno di acqua su $42\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ per l'amplificazione ed un terzo su $62\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ per la post-amplificazione. Assicurarsi che i bagni di acqua contengano una quantità d'acqua sufficiente (vedere *Note procedurali*). Se si usa l'*SB100 Dry Heat Bath/Vortexer*, consultare la *Scheda applicativa dell'SB100 Dry Heat Bath/Vortexer per il PROGENSA PCA3 Assay (Scheda applicativa dell'SB100)*.
2. Prima di iniziare il dosaggio, pulire le superfici di lavoro ed i pipettatori passandovi sopra ipoclorito di sodio al 2,5% - 3,5% (0,35 M - 0,5 M) (soluzione di candeggina). Lasciare la soluzione di candeggina a contatto con superfici e pipettatori per almeno 1 minuto, quindi risciacquare con acqua. Non permettere alla soluzione di candeggina di asciugarsi. Coprire la superficie del banco sul quale verrà eseguita la reazione con coperture da banco di laboratorio pulite, assorbenti e con parte posteriore plasticata.
3. Disporre un numero sufficiente di vassoi con dieci puntali nel Sistema Target Capture (TCS). Assicurarsi che la bottiglia di lavaggio del TCS sia piena di soluzione di lavaggio e che l'aspiratore sia collegato alla pompa di aspirazione. (Consultare il *Manuale d'uso del Sistema Target Capture*.)

B. Ricostituzione e preparazione dei reagenti

Prima di iniziare il trasferimento dei campioni, occorre eseguire la ricostituzione dei reagenti.

1. Per ricostituire i reagenti di amplificazione, enzimatico e sonda, unire le bottiglie di reagente liofilizzato alla soluzione di ricostituzione. Se sono refrigerate, lasciare che le soluzioni di ricostituzione raggiungano la temperatura ambiente prima di usarle.

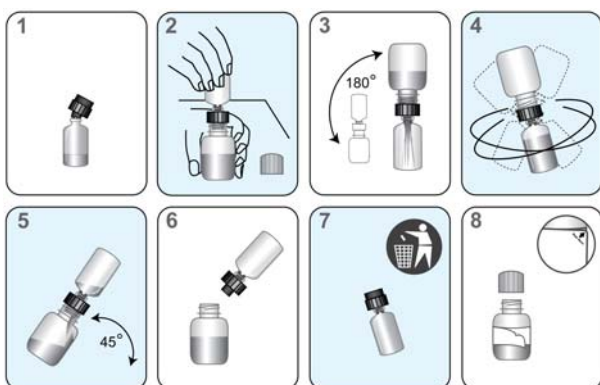


Figura 2. Processo di ricostituzione

- a. Abbinare l'appropriata soluzione di ricostituzione al suo reagente liofilizzato. Verificare che i flaconi abbiano etichette dello stesso colore per assicurarsi che siano abbinati correttamente.
- b. Aprire il flacone del reagente liofilizzato e inserire con fermezza l'estremità indentata del collare di ricostituzione nell'apertura del flacone (Figura 2, Procedimento 1).

- c. Aprire la soluzione di ricostituzione corrispondente e disporre il cappuccio su una superficie di lavoro pulita e coperta. Tenendo la bottiglia della soluzione sul banco, inserire con fermezza l'altra estremità del collare di ricostituzione nella bottiglia (Figura 2, Procedimento 2).
- d. Capovolgere lentamente le bottiglie assemblate. Permettere alla soluzione di scendere dalla bottiglia nel flacone di vetro (Figura 2, Procedimento 3). Attendere che il reagente liofilizzato vada in soluzione, quindi agitare ruotando delicatamente la soluzione nel flacone di vetro per miscelarla. Evitare di formare schiuma mentre si agita la bottiglia con movimento rotatorio (Figura 2, Procedimento 4).
- e. Capovolgere il gruppo e inclinarlo ad un angolo di 45° per ridurre al minimo la formazione di schiuma (Figura 2, Procedimento 5). Lasciar scendere tutto il liquido di nuovo nella bottiglia di plastica.
- f. Rimuovere il collare di ricostituzione e il flacone di vetro (Figura 2, Procedimento 6) e smaltirli (Figura 2, Procedimento 7).
- g. Incappucciare di nuovo la bottiglia di plastica e staccare e smaltire l'etichetta superiore (Figura 2, Procedimento 8). Sulla restante etichetta della bottiglia annotare le iniziali dell'operatore, la data di ricostituzione ed il numero di lotto del reagente liofilizzato su tutti i flaconi di reagente ricostituito. Assicurarsi di annotare l'analita (PCA3 o PSA) sui flaconi del reagente sonda.
- h. Eliminare il reagente ricostituito dopo 30 giorni o entro la data di scadenza, a seconda di quale data cada per prima.

2. Reagenti sonda, di amplificazione ed enzimatico precedentemente ricostituiti devono essere portati a temperatura ambiente ($15\text{ }^{\circ}\text{C} - 30\text{ }^{\circ}\text{C}$) prima di iniziare il dosaggio. Se si raggruppano reagenti avanzati, consultare *Requisiti di manipolazione e conservazione*. Se il reagente di amplificazione ricostituito contiene precipitato che non rientra in soluzione a temperatura ambiente, riscaldarlo a $62\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 1-2 minuti nell'area di pre-amplificazione. Se il reagente sonda ricostituito contiene precipitato che non rientra in soluzione a temperatura ambiente, riscaldarlo a $62\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 1-2 minuti nell'area di post-amplificazione. Dopo questi procedimenti di riscaldamento, i reagenti ricostituiti possono essere usati anche se resta del precipitato residuo. Dopo la risospensione, miscelare i flaconi capovolgendoli delicatamente.

C. Approntamento delle rastrelliere

Il pipettatore a ripetizione usato nella cattura del target, nel trasferimento del campione e nell'amplificazione va dedicato esclusivamente a questi procedimenti (vedere *Avvertenze e precauzioni*).

1. Approntare una rastrelliera per l'analita PCA3 ed un'altra rastrelliera per l'analita PSA.
Nota – Se il numero di campioni è abbastanza basso, entrambi gli analiti possono essere analizzati in un'unica rastrelliera. Se si usa lo strumento TECAN Freedom EVO 100/4, per ciascun analita va usata una rastrelliera separata. Non si possono analizzare più di due rastrelliere complete (20 TTU) alla volta.
2. Nella/e rastrelliera/e per unità a dieci provette (TTU), disporre abbastanza TTU da poter alloggiare i calibratori, i controlli ed i campioni per ciascun analita.
3. Etichettare le TTU con gli ID campione. La Tabella 3 descrive l'aggiunta di calibratori, controlli e campioni. Avviare i calibratori PSA su una nuova TTU.

Nota – I calibratori vanno eseguiti in tre replicati ed i controlli in due replicati ciascuno, e devono essere eseguiti sulla stessa rastrelliera dei campioni. I campioni vanno eseguiti in replicato. Non lasciare tubi di reazione vuoti fra calibratori, controlli e campioni. Se si usa lo strumento TECAN Freedom EVO 100/4, consultare la *Scheda applicativa del TECAN Freedom EVO 100/4 per il PROGENSA PCA3 Assay (Scheda applicativa del TECAN Freedom EVO)* per ulteriori istruzioni.

Tabella 3 – Esempio di approntamento di rastrelliera

Rastrelliera Posizione	Campione Descrizione	*Concentrazione PCA3 target (c/ml)	*Concentrazione PSA target (c/ml)
Da 1 a 3	Calibratore 1	0	0
Da 4 a 6	Calibratore 2	250	7.500
Da 7 a 9	Calibratore 3	2.500	75.000
Da 10 a 12	Calibratore 4	25.000	750.000
Da 13 a 15	Calibratore 5	125.000	3.000.000
Da 16 a 17	Controllo A	1.250	37.500
Da 18 a 19	Controllo B	62.500	1.500.000
Da 20 a n	Campione	non noto	non noto

*Calibratori e controlli positivi di PCA3 e PSA sono valori assegnati, quindi i valori effettivi di c/ml per i Calibratori da 2 a 5 e per i Controlli A e B saranno leggermente diversi dalle concentrazioni target indicate nella tabella, e varieranno da un lotto all'altro. I valori assegnati verranno forniti su una scheda contenuta nella confezione dei flaconi di calibratore e controllo, e sono usati per la calibrazione e per la determinazione della validità della seduta.

D. Verifica delle informazioni sulle concentrazioni

Verificare con l'amministratore di sistema del PROGENSA PCA3 Assay Software che siano state immesse le informazioni sulle concentrazioni per i lotti dei kit di calibratori e controlli PROGENSA PCA3 e PSA analizzati. Per ulteriori informazioni, consultare la *Guida di riferimento rapido per il PROGENSA PCA3 Assay (Guida di riferimento rapido)* o il *Manuale d'uso dell'amministratore di sistema del PROGENSA PCA3 Assay Software*.

Nota – Si richiede l'immissione delle informazioni sulle concentrazioni **prima dell'uso iniziale** di ciascun nuovo lotto di kit di calibratori e controlli. Le sedute successive che impiegano calibratori e controlli derivanti dallo stesso lotto di kit non richiedono ulteriore azione.

E. Approntamento del Worklist Editor

Generare una lista di lavoro per la seduta del dosaggio usando il GEN-PROBE Worklist Editor su un computer situato nell'area di pre-amplificazione. Per l'uso del Worklist Editor, consultare la *Guida di riferimento rapido* o il *Manuale d'uso del GEN-PROBE Worklist Editor*. Se si usa lo strumento TECAN Freedom EVO 100/4, consultare anche la *Scheda applicativa del TECAN Freedom EVO* per ulteriori istruzioni.

F. Pre-amplificazione

L'ambiente di pre-amplificazione deve trovarsi a temperature comprese fra 15 e 30 °C. Analizzare in parallelo entrambe le rastrelliere. Se si usa l'SB100 Dry Heat Bath/Vortexer, consultare la *Scheda applicativa dell'SB100*. Se si usa lo strumento TECAN Freedom EVO 100/4, consultare la *Scheda applicativa del TECAN Freedom EVO* per ulteriori istruzioni.

1. Prima dell'analisi, lasciare che calibratori e controlli raggiungano la temperatura ambiente.

2. Prima dell'analisi, lasciare che i campioni raggiungano la temperatura ambiente. **Non mettere i campioni sul vortex.** I campioni vanno miscelati mediante inversione. Se i campioni contengono precipitati, riscaldarli a 37 °C per un massimo di 5 minuti. Nel caso in cui il precipitato non rientri in soluzione, assicurarsi che non impedisca l'erogazione del campione.
3. Miscelare accuratamente il reagente Target Capture (TCR) mediante inversione o con movimento rotatorio. Usando il pipettatore a ripetizione, aggiungere 100 µl di TCR specifico dell'analita al tubo di reazione appropriato.
4. Forare il cappuccio del flacone del calibratore con il micropipettatore e aggiungere 400 µl del calibratore al tubo di reazione appropriatamente etichettato. Usando lo stesso puntale di pipetta, prelevare aggiunte di replicato dal flacone attraverso il cappuccio forato. Usare nuovi puntali di pipetta per ciascun flacone di calibratore. Ripetere per l'aggiunta di controlli e campioni. Coprire e salvare eventuali campioni avanzati, e conservarli ad una temperatura di 8 °C o inferiore (vedere *Raccolta, trasporto e magazzinaggio dei campioni* per ulteriori informazioni) nel caso che fosse necessario ripetere l'analisi.
5. Coprire le TTU con le carte adesive protettive e agitare delicatamente a mano la rastrelliera. **Non metterla sul vortex.** Incubare la rastrelliera a 62 °C ± 1 °C in un bagno di acqua per 30 ± 5 minuti.
6. Estrarre la rastrelliera dal bagno di acqua e asciugare il fondo delle provette su un materiale assorbente.
7. Assicurarsi che le carte adesive protettive siano bene alloggiato. Se necessario, sostituirle con altre carte adesive protettive nuove e sigillare bene le TTU.
8. Agitare la rastrelliera per 60 secondi, mettendola sul miscelatore vortex per unità multiprovetta (vedere *Note procedurali*). Iniziare l'agitazione su vortex entro 2 minuti dalla rimozione della rastrelliera dal bagno di acqua.
9. Senza rimuovere le carte adesive protettive, incubare la rastrelliera a temperatura ambiente per 30 ± 5 minuti.
10. Mettere la rastrelliera sulla base magnetica del TCS per 5-10 minuti, con la linguetta frontale rivolta in avanti. Caricare la rastrelliera per TTC con i TTC.
11. Eseguire il priming delle linee della pompa della stazione di dispensazione pompando soluzione di lavaggio attraverso il collettore di dispensazione. Pompare attraverso il sistema abbastanza liquido da eliminare le bolle d'aria nella linea e da far erogare da tutti e dieci i beccucci un flusso costante di liquido.
12. Accendere la pompa di aspirazione e scollegare il collettore di aspirazione in corrispondenza del primo connettore fra il collettore di aspirazione e la bottiglia di cattura. Assicurarsi che il misuratore del vuoto soddisfi la specifica di verifica perdite d'aria. Per ottenere questa lettura potrebbero essere necessari 15 secondi. Ricollegare il collettore e assicurarsi che il misuratore del vuoto soddisfi la specifica di livello del vuoto. Lasciare accesa la pompa di aspirazione fino al completamento di tutti i procedimenti di target capture.
Consultare la scheda delle specifiche di aspirazione del Sistema Target Capture, situata sul retro del *Manuale d'uso del Sistema Target Capture* o contattare l'Assistenza tecnica Gen-Probe per ulteriori informazioni.
13. Collegare saldamente il collettore di aspirazione alla prima serie di puntali. Aspirare tutto il liquido abbassando i puntali nella prima TTU fino a quando non entrano brevemente a contatto con il fondo delle provette. Non tenere i puntali a contatto con il fondo delle provette.
14. Al termine dell'aspirazione, espellere i puntali nel loro vassoio originale portapuntali. Ripetere i procedimenti di aspirazione per le TTU restanti, usando per ogni tubo di reazione un puntale dedicato.

15. Disporre il collettore di dispensazione sopra ciascuna TTU e, usando la pompa della stazione di dispensazione, erogare 1,0 ml di soluzione di lavaggio in ciascuna provetta della TTU.
16. Coprire le provette con la carta adesiva protettiva a rimuovere la rastrelliera dal TCS. Agitare una volta sul miscelatore vortex per unità multiprovetta. Per ulteriori informazioni, consultare *Note procedurali*.
17. Disporre la rastrelliera sulla base magnetica del TCS per 5-10 minuti.
18. Aspirare tutto il liquido come descritto nei Procedimenti 13 e Procedimento 14.
19. Dopo l'aspirazione finale, togliere la rastrelliera dalla base del TCS e ispezionare visivamente le provette per assicurare che tutto il liquido sia stato aspirato e che tutte le provette contengano grani di particelle magnetiche. Se si vede del liquido, disporre di nuovo la rastrelliera sulla base del TCS per 2 minuti e ripetere l'aspirazione per quella TTU usando gli stessi puntali usati in precedenza per ciascun tubo di reazione. Se una volta completata l'aspirazione è visibile QUALSIASI grano di particella magnetica, il tubo può essere accettato. Se non è visibile alcun grano, il campione va risottoposto ad analisi. Se lo stesso campione non contiene un grano di particella magnetica a questo stadio di una seduta successiva, questo potrebbe indicare un problema specifico del campione. In questo caso si consiglia di fare una seconda raccolta del campione di urina.

G. Amplificazione

Nota – L'aggiunta di enzima ad una rastrelliera di reazione (Procedimenti 6 e 7 sotto) va eseguita entro 90 secondi al massimo.

Completare i Procedimenti 6 e 7 su una rastrelliera prima di ripeterli sulla seconda. Se si usa l'SB100 Dry Heat Bath/Vortexer, consultare la *Scheda applicativa dell'SB100*. Se si usa lo strumento TECAN Freedom EVO 100/4, consultare la *Scheda applicativa del TECAN Freedom EVO* per ulteriori istruzioni.

1. Usando il pipettatore a ripetizione, aggiungere a ciascun tubo di reazione 75 µl del reagente di amplificazione specifico per l'analita ricostituito. Tutte le miscele di reazione nella rastrelliera dovrebbero ora essere di colore rosso.
2. Usando il pipettatore a ripetizione, aggiungere 200 µl di reagente oleoso.
3. Coprire le provette con una carta adesiva protettiva e agitarle su un miscelatore vortex per unità multiprovetta.
4. Incubare la rastrelliera nel bagno di acqua di pre-amplificazione a 62 °C ± 1 °C per 10 ± 5 minuti.
5. Trasferire di nuovo la rastrelliera in un bagno di acqua a 42 °C ± 1 °C per 5 ± 2 minuti.
6. Con la rastrelliera nel bagno di acqua, togliere delicatamente la carta adesiva protettiva e poi, usando il pipettatore a ripetizione, aggiungere 25 µl del reagente enzimatico ricostituito a ciascuna delle miscele di reazione. Tutte le reazioni dovrebbero ora essere di colore arancio.
7. Coprire immediatamente le provette con nuova carta adesiva protettiva, rimuoverle dal bagno di acqua e miscelare rapidamente le reazioni agitando delicatamente la rastrelliera con la mano.
Nota – Ridurre al minimo il periodo di tempo in cui la rastrelliera si trova fuori dal bagno di acqua, onde evitare il raffreddamento delle provette.
8. Incubare la rastrelliera a 42 °C ± 1 °C per 60 ± 5 minuti.

H. Post-amplificazione

Il pipettatore a ripetizione usato nell'ibridizzazione e nella selezione va dedicato esclusivamente a questi procedimenti (vedere *Avvertenze e precauzioni*). L'ambiente di post-amplificazione, incluso il rilevamento, deve essere a 15 °C - 30 °C. Se si usa

l'SB100 Dry Heat Bath/Vortexer, consultare la *Scheda applicativa dell'SB100*.

1. Ibridizzazione

- a. Togliere la rastrelliera dal bagno di acqua di pre-amplificazione e trasferirla nella zona di post-amplificazione. Aggiungere 100 µl del reagente sonda specifico dell'analita ricostituito, usando il pipettatore a ripetizione. Tutte le miscele di reazione dovrebbero ora essere di colore giallo.
- b. Coprire le provette con carta adesiva protettiva e agitarle per 10 secondi o fino ad ottenere un colore uniforme, sul miscelatore vortex per unità multiprovetta.
- c. Incubare la rastrelliera in un bagno di acqua a 62 °C ± 1 °C per 20 ± 5 minuti.
- d. Togliere la rastrelliera dal bagno di acqua e incubarla a temperatura ambiente per 5 ± 1 minuti.

2. Selezione

- a. Usando il pipettatore a ripetizione, aggiungere 250 µl di Reagente Selection ad ogni provetta. Tutte le reazioni dovrebbero ora essere di colore rosa.
- b. Coprire le provette con carta adesiva protettiva, agitare su vortex per 10 secondi o fino ad ottenere un colore uniforme, e incubare la rastrelliera in un bagno di acqua a 62 °C ± 1 °C per 10 ± 1 minuti.
- c. Togliere la rastrelliera dal bagno di acqua. Incubarla a temperatura ambiente per 15 ± 3 minuti.

I. Rilevamento

Per l'uso del LEADER HC+ Luminometer, consultare il *Manuale d'uso del LEADER HC+ Luminometer*. Per l'uso del PROGENSA PCA3 Assay Software, consultare la *Guida di riferimento rapido* o il *Manuale d'uso e il Manuale dell'amministratore di sistema del PROGENSA PCA3 Assay Software*.

1. Preparare il LEADER HC+ Luminometer mettendo una TTU vuota nella posizione di vassoio numero 1 ed eseguire il protocollo WASH (lavaggio) una volta.
2. Assicurarsi di disporre di volumi sufficienti di Auto Detect 1 e 2 per completare le reazioni.
3. Caricare le TTU nel luminometro usando come guida il diagramma nel luminometro. Se si analizzano entrambi gli analiti (seduta consecutiva), caricare prima tutte le TTU PCA3, seguite immediatamente da tutte le TTU PSA.
4. Eseguire l'accesso al computer. Fare clic su **NEW RUN** (NUOVA SEDUTA) e selezionare il protocollo e le concentrazioni appropriati per il dosaggio. Fare clic su **NEXT** (AVANTI) per iniziare la seduta.
Nota – La seduta va completata entro 2 ore dal termine dell'incubazione a 62 °C del procedimento di selezione.
5. Preparare una soluzione di disattivazione di candeggina tamponata miscelando uguali volumi di ipoclorito di sodio al 5,25% (0,7 M) e tampone per liquido di disattivazione in un contenitore di plastica con coperchio grande. Etichettare e scrivere la data di scadenza sul contenitore di plastica. Questa soluzione di disattivazione di candeggina tamponata resta stabile per 4 settimane a temperatura ambiente.
6. Al termine della seduta, il software del dosaggio genera due referti sulla seduta, un Referto dei dati grezzi sulla seduta ed un Referto dei rapporti, se le sedute sono consecutive (vedere *Procedure di controllo della qualità e Interpretazione dei risultati*).
7. Al termine della seduta, togliere le TTU usate dal luminometro e disporle nel contenitore con la soluzione di candeggina tamponata. Lasciare le TTU nel contenitore per almeno 15 minuti prima dello smaltimento. Metodi adeguati di manipolazione e smaltimento vanno stabiliti dal direttore del laboratorio.

Note procedurali

A. Pipettazione di controlli, calibratori e campioni

1. Il volume del calibratore, del controllo o del campione aggiunti alla TTU dovrebbe essere di 400 µl. Si raccomanda l'ispezione visiva del volume pipettato nella TTU per assicurare il giusto trasferimento di volume. Per ottenere risultati accurati occorre un volume appropriato.
2. Assicurarsi che il puntale della pipetta sia alloggiato correttamente sul pipettatore e che l'impostazione del volume sia corretta. Si raccomanda di controllare visivamente l'impostazione del volume al termine di ciascuna TTU (ogni 10 provette). Rilasciare lentamente e a velocità costante lo stantuffo della pipetta quando si aspira il campione, per evitare che si formino schiuma e bolle.

B. Reagenti

1. Durante la conservazione, la soluzione di ricostituzione del reagente sonda potrebbe creare precipitato. Riscaldare la soluzione a $62\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ per 1-2 minuti. Dopo il procedimento di riscaldamento, la soluzione di ricostituzione del reagente sonda può essere usata anche se resta del precipitato residuo. Dopo la risospensione, miscelare il flacone capovolgendolo delicatamente.
2. Quando si pipettano reagenti diversi dall'enzima, mirare leggermente verso il lato del fondo del tubo di reazione (dove il fondo si curva verso l'alto per incontrare i lati). Quando si pipetta il reagente enzimatico, mirare direttamente verso il centro del tubo di reazione. Confermare visivamente che i reagenti vengano distribuiti correttamente (senza una quantità eccessiva di reagente sui lati delle provette e con un adeguato viraggio del colore).

C. Temperatura

1. I procedimenti di target capture, amplificazione, ibridizzazione e selezione dipendono dalla temperatura. Di conseguenza, è essenziale che i bagni di acqua vengano mantenuti entro gli intervalli di temperature specificati per essi.
2. Per temperatura ambiente si intende un intervallo di temperatura fra 15 °C e 30 °C .

D. Tempi

Le reazioni di target capture, amplificazione, ibridizzazione e selezione dipendono dai tempi. Attenersi ai tempi specifici indicati nella *Procedura di analisi*.

E. Agitazione su vortex

Un'adeguata agitazione su vortex è importante per ottenere buone prestazioni con il PROGNSA PCA3 Assay. Per agitare le reazioni, impostare la velocità del miscelatore vortex per unità multiprovetta sul valore minimo, fissare la rastrelliera e accendere l'alimentazione. Aumentare lentamente la velocità fino a quando il liquido non arriva a metà della provetta. Agitare per 10 secondi, la quantità di tempo indicata, o fino a quando il colore non risulti uniforme. Prima di spegnere il miscelatore vortex per unità multiprovetta e rimuovere la rastrelliera, impostare la velocità sul valore minimo. Le miscele di reazione non devono mai entrare a contatto con le carte adesive protettive.

F. Bagni di acqua

1. Il livello dell'acqua nei bagni di acqua va mantenuto ad una profondità di 3,8 - 5 cm (1,5 - 2 poll), che va misurata dal vassoio di supporto in metallo (sul fondo del bagno di acqua) fino alla superficie dell'acqua. Questo assicura un adeguato trasferimento del calore.
2. Per evitare la contaminazione incrociata, i bagni di acqua vanno dedicati ad un procedimento specifico nell'ambito del dosaggio.

G. Decontaminazione

1. Superfici e pipettatori

Superfici del banco del laboratorio e pipettatori devono essere decontaminati regolarmente con ipoclorito di sodio al 2,5%-3,5% (0,35 M-0,5 M) (soluzione di candeggina). Lasciare la soluzione di candeggina a contatto con le superfici per almeno 1 minuto, quindi risciacquare con acqua. **Non permettere alla soluzione di candeggina di asciugarsi.** Le soluzioni a base di cloro possono provocare la vaiolatura di apparecchiature e metallo. Risciacquare accuratamente le apparecchiature pulite con candeggina, onde evitare la vaiolatura.

2. Collettore del TCS

Scollegare il collettore di aspirazione rimuovendo il tubo dal suo raccordo. Immergere il collettore in ipoclorito di sodio al 2,5%-3,5% (0,35 M-0,5 M) (soluzione di candeggina), assicurandosi che le impugnature ed i beccucci dei puntali di pipetta siano coperti di soluzione di candeggina. Tenere il collettore immerso per 10 minuti. Un'esposizione più prolungata lo danneggia. Risciacquare accuratamente il collettore con acqua e asciugarlo con salviette di carta. Ricollegare il collettore e operare la pompa di aspirazione per almeno 3 minuti per portare a termine il processo di asciugatura. Assicurarsi che l'area sotto la piastra di espulsione sia asciutta.

3. Contenitore degli scarti del TCS

Scollegare la bottiglia degli scarti dall'apparecchio e versare gli scarti in un lavandino. Risciacquare con acqua la bottiglia degli scarti e aggiungervi 400 ml di ipoclorito di sodio al 5,25% (0,7 M). Ricollegare la bottiglia all'apparecchio. Ricollegare il collettore e operare la pompa di aspirazione per almeno 3 minuti per portare a termine il processo di asciugatura. Svuotare la bottiglia degli scarti ogni settimana o quando risulta per il 25% piena.

4. Unità TCS

Pulire le superfici del dispositivo TCS e la superficie dei puntali di espulsione del tampone di lavaggio con salviette di carta inumidite di soluzione di ipoclorito di sodio in concentrazioni dal 2,5% al 3,5% (0,35 M - 0,5 M), ovvero una soluzione di candeggina. Dopo il procedimento con soluzione di candeggina, risciacquare con acqua e poi asciugare completamente le superfici con salviette di carta.

5. Rastrelliere

Immergere le rastrelliere in ipoclorito di sodio al 2,5%-3,5% (0,35 M-0,5 M) (soluzione di candeggina), assicurandosi che restino coperte dalla soluzione di candeggina. Tenere le rastrelliere immerse per 10 minuti. Un'esposizione più prolungata le danneggia. Risciacquare accuratamente le rastrelliere con acqua e asciugarle completamente con salviette di carta.

H. Contaminazione del dosaggio

1. Se non si presta abbastanza attenzione durante la procedura del dosaggio, potrebbe verificarsi l'introduzione di materiali contaminanti.
2. Le TTU vanno decontaminate con candeggina tamponata, come descritto alla *Procedura di analisi*. Non riutilizzare le TTU.
3. Eseguire una regolare decontaminazione delle apparecchiature e delle superfici di lavoro, come descritto sopra nella sezione *Decontaminazione*.
4. Come in qualsiasi sistema di reazione, il talco eccessivo in alcuni guanti potrebbe causare la contaminazione di provette aperte. Si raccomanda agli operatori di indossare guanti privi di talco.

Procedure di controllo della qualità

A. Validità della seduta

1. Calibratori e controlli vanno analizzati con tutti i dosaggi e sulla stessa rastrelliera contenente i campioni. Perché una seduta possa essere considerata valida, vanno soddisfatti i seguenti criteri.

Valore RLU medio del calibratore 2 > valore soglia RLU

Dove il valore soglia RLU = valore RLU medio del calibratore 1
 + 1,645 deviazioni standard dei replicati RLU del calibratore 1
 + 1,645 deviazioni standard dei replicati RLU del calibratore 2

Recupero medio interpolato del calibratore 5 = $100 \pm 30\%$

Recupero medio interpolato del controllo A = $100 \pm 60\%$

Recupero medio interpolato del controllo B = $100 \pm 35\%$

2. Il software PCA3 valuta automaticamente i risultati rispetto ai criteri indicati sopra e referta lo Stato seduta come PASS (superata) se i criteri di validità sono soddisfatti, e come FAIL (fallita) se i criteri di validità non vengono soddisfatti.
3. Se lo Stato seduta è FAIL (fallita), tutti i risultati dell'analisi nella stessa seduta sono non validi per quell'analita e non vanno refertati.
4. Se una seduta è non valida, essa deve essere ripetuta per quell'analita (vedere *Interpretazione dei risultati*). Se la seduta è valida per l'altro analita, quei risultati possono essere usati nell'analisi dei dati con la seduta valida ripetuta del primo analita.

B. Validità dei campioni

Nell'ambito di una seduta valida, risultati individuali relativi ai campioni possono essere considerati INVALID (non validi) e saranno indicati nel Referto dei dati grezzi sulla seduta (vedere *Interpretazione dei risultati*). Sebbene replicati individuali per un campione possano essere validi, un campione sarà invalidato se la differenza interpolata c/ml fra i replicati supera il 600%. Deve essere ripetuta l'analisi del campione per quell'analita.

Interpretazione dei risultati

A. Tipi di referti

1. Referto dei dati grezzi sulla seduta

Il Referto dei dati grezzi sulla seduta offre informazioni sulla validità della seduta (PASS/superata o FAIL/fallita; vedere *Procedure di controllo della qualità*) e sui singoli tubi di reazione analizzati con il PROGENSA PCA3 Assay. Se una seduta è non valida (FAIL), tutte le provette di quella seduta saranno etichettate come tali. Tuttavia, provette singole possono essere considerate non valide all'interno di una seduta valida (PASS). Per sedute consecutive (nelle quali vengono analizzati nella stessa seduta entrambi gli analiti PCA3 e PSA), la seduta di un analita può essere non valida mentre quella dell'altro analita è valida.

In fondo al Referto dei dati grezzi sulla seduta si trova il Sommario delle eccezioni. Per le sedute consecutive in cui le sedute per entrambi gli analiti sono valide, i campioni elencati nel Sommario delle eccezioni potrebbero richiedere la ripetizione dell'analisi di un analita. Sebbene nel Sommario delle eccezioni sia indicato un risultato di PCA3 Score, questo risultato non è considerato refertabile fino a quando non è stato eseguito l'abbinamento manuale ed il risultato non è indicato nel Referto dei rapporti. Se è stato analizzato solo un analita, o se la seduta per un analita non è valida, tutti i campioni analizzati verranno elencati nel Sommario delle eccezioni.

2. Referto dei rapporti

Il software del dosaggio genera automaticamente un Referto dei rapporti per una seduta consecutiva nella quale le sedute

di entrambi gli analiti sono valide. Il software calcola e riporta il PCA3 Score dei campioni nel Referto dei rapporti. I campioni indicati nel Referto dei rapporti o non richiedono ulteriore analisi, oppure entrambi gli analiti devono essere risottoposti ad analisi. I campioni non indicati nel Referto dei rapporti saranno reperibili nella sezione Sommario delle eccezioni del Referto dei dati grezzi sulla seduta.

Un Referto dei rapporti può essere generato anche dopo l'abbinamento manuale (vedere *Abbinamento manuale* per ulteriori informazioni).

3. Referto di QC

Il Referto di QC indica i criteri di validità, le concentrazioni assegnate e interpolate ed i recuperi di calibratori e controlli relativi alla seduta del dosaggio. Il referto indica anche i parametri che definiscono la curva di calibrazione di risposta al dosaggio logistica a quattro parametri (3). Per ulteriori informazioni, consultare il *Manuale d'uso del PROGENSA PCA3 Assay Software*.

B. Abbinamento

1. Abbinamento automatico

Nelle sedute consecutive in cui sono valide le sedute di entrambi gli analiti, il software abbinava automaticamente i risultati individuali relativi agli analiti PCA3 e PSA per i campioni e determina il PCA3 Score (se calcolabile). I risultati sono indicati nel Referto dei rapporti o nel Sommario delle eccezioni del Referto dei dati grezzi sulla seduta.

2. Abbinamento manuale

Quando gli analiti PCA3 e PSA vengono analizzati in diverse sedute, il software non è in grado di determinare automaticamente il PCA3 Score. L'abbinamento manuale dei risultati relativi agli analiti è necessario per determinare il PCA3 Score o l'intervallo del PCA3 Score (consultare la *Guida di riferimento rapido* o il *Manuale d'uso del PROGENSA PCA3 Assay Software*). Si può anche richiedere l'abbinamento manuale per risultati che sono indicati nel Sommario delle eccezioni del Referto dei dati grezzi sulla seduta. Dopo l'abbinamento manuale, i PCA3 Score per i campioni abbinati saranno indicati in un nuovo Referto dei rapporti.

C. Interpretazione dei referti

1. PCA3 Score

Nota – Sono refertabili solo i PCA3 Score e gli intervalli dei PCA3 Score indicati nel Referto dei rapporti. I risultati che appaiono nel Sommario delle eccezioni potrebbero richiedere ulteriore azione e non sono refertabili.

Il PCA3 Score viene calcolato come il rapporto fra le copie di mRNA PCA3 e le copie di mRNA PSA, moltiplicato per 1000. I punteggi possono essere calcolati solo usando risultati derivanti da sedute e campioni validi. Le sedute ed i campioni non validi devono essere rianalizzati per quell'analita (vedere *Ripetizione dell'analisi* per ulteriori informazioni).

Se il PCA3 Score riportato si trova al di sotto del valore soglia, il risultato va interpretato come NEGATIVO. Se il PCA3 Score è al di sopra del valore soglia o equivale ad esso, il risultato va interpretato come POSITIVO. Sarà il direttore del laboratorio a stabilire il valore soglia (vedere *Caratteristiche delle prestazioni* per ulteriori informazioni).

In certe condizioni, viene fornito un intervallo di PCA3 Score ($>[\text{Punteggio calcolato}]$ o $<[\text{Punteggio calcolato}]$). Se il $<[\text{Punteggio calcolato}]$ è al di sotto del valore soglia, il risultato va interpretato come NEGATIVO. Se il $>[\text{Punteggio calcolato}]$ è al di sopra del valore soglia, il risultato va interpretato come POSITIVO. Se si richiede un valore numerico, la diluizione del

campione e la ripetizione dell'analisi possono generare un PCA3 Score invece di un intervallo di PCA3 Score (vedere *Ripetizione dell'analisi - Diluizione di campioni alti fuori intervallo*).

2. Interpretazione dei codici di stato e di analisi

La colonna dello stato nel Referto dei dati grezzi sulla seduta e nel Referto dei rapporti mostra le informazioni in formato "s:a". I codici di stato specifici della seduta ("s") vengono indicati prima (alla sinistra) dei due punti mentre i codici di analisi specifici dell'analita ("a") vengono indicati dopo i (alla destra dei) due punti. I codici specifici dell'analita sono indicati in lettere minuscole per i risultati PCA3 e in lettere maiuscole per i risultati PSA. Ciascun referto contiene descrizioni dei codici di stato e analisi che appaiono in quel referto. Per esempio, i codici potrebbero indicare se un risultato relativo a un campione o un replicato è valido o è fuori intervallo. Consultare la *Guida di riferimento rapido* o il *Manuale d'uso del PROGENSA PCA3 Assay Software* per un elenco completo dei codici di stato e di analisi, e per ulteriori dettagli.

Se un PCA3 Score è refertato nel Referto dei rapporti e nelle colonne di stato PCA3 o PSA non appaiono codici di stato o di analisi, questo indica che entrambi gli analiti analizzati sono validi e "all'interno dell'intervallo". Il risultato relativo al campione è refertabile e non sono necessarie ulteriori azioni.

Se un codice di stato o di analisi appare nel Sommario delle eccezioni o nel Referto dei rapporti, potrebbe essere necessario ripetere l'analisi (vedere *Interpretazione dei risultati nel Sommario delle eccezioni* e *Interpretazione dei risultati nel Referto dei rapporti*). Se i risultati relativi all'analita provengono da sedute separate e presentano uno o più codici di analisi, trovare la combinazione per entrambi gli analiti nella Tabella 4a o Tabella 4b per determinare se è necessaria un'azione ulteriore.

Nota – La presenza di un codice di stato o di analisi non significa automaticamente che occorre ripetere l'analisi.

3. Interpretazione dei risultati nel Sommario delle eccezioni

Il Sommario delle eccezioni potrebbe non elencare alcun campione. In questi casi, non occorrono ulteriori azioni.

Se il Sommario delle eccezioni elenca uno o più campioni per le sedute consecutive nelle quali sono valide le sedute per entrambi gli analiti, consultare la Tabella 4a per istruzioni in merito.

Per sedute di singoli analiti, consultare *Interpretazione dei codici di stato e di analisi*. In sedute consecutive nelle quali risulta non valida la seduta di un analita, ripetere la seduta non valida (vedere *Ripetizione dell'analisi* per ulteriori informazioni), e trattare i risultati come se fossero state eseguite singole sedute degli analiti. Occorrerà eseguire l'abbinamento manuale.

Un campione può essere etichettato come non valido sebbene le provette individuali (replicati) possono essere etichettate come valide. È il risultato combinato dei replicati che determina la validità del campione, e una grande differenza fra replicati rende non valido un campione (vedere *Procedure di controllo della qualità* per ulteriori informazioni).

Tabella 4a – Condizioni del Sommario delle eccezioni del PROGENSA PCA3 Assay

Risultato PCA3 (Codice analisi)	Risultato PSA (Codice analisi)	Codice PCA3 indicato	Ulteriori analisi?	Azione/Commento
Entro l'intervallo (nessun codice)	Non valido* (A, B, E, H o I)	--	Sì	Rianalizzare il PSA (vedere <i>Ripetizione dell'analisi</i>) e abbinare manualmente i risultati.
Basso fuori intervallo (g)	Non valido (A, B, E, H o I)	--	Sì	Rianalizzare il PSA e abbinare manualmente i risultati.
Non valido (a, b, e, h o i)	Entro l'intervallo (nessun codice)	--	Sì	Rianalizzare il PCA3 e abbinare manualmente i risultati.
Entro l'intervallo (nessun codice)	Alto fuori intervallo (F)	<[Punteggio calcolato]**	Opzionale	1. Abbinare manualmente per ottenere il <[Punteggio calcolato] OPPURE 2. Diluire il campione nel diluente apposito (vedere <i>Diluizione di campioni alti fuori intervallo</i>), rianalizzare il PSA e abbinare manualmente i risultati se si richiede un PCA3 Score.
Alto fuori intervallo (f)	Entro l'intervallo (nessun codice)	>[Punteggio calcolato]	Opzionale	1. Abbinare manualmente per ottenere il >[Punteggio calcolato] OPPURE 2. Diluire il campione nel diluente apposito, rianalizzare il PCA3 e abbinare manualmente i risultati se si richiede un PCA3 Score.
Basso fuori intervallo (g)	Entro l'intervallo (nessun codice)	<[Punteggio calcolato]	No	Abbinare manualmente per ottenere il <[Punteggio calcolato].
Basso fuori intervallo (g)	Alto fuori intervallo (F)	<[Punteggio calcolato]	No	Abbinare manualmente per ottenere il <[Punteggio calcolato].

* Pertiene solo a campioni non validi all'interno di una seduta valida.

** Per valori fuori intervallo, il Punteggio calcolato viene calcolato usando il livello copia per il più vicino calibratore positivo.

4. Interpretazione dei risultati nel Referto dei rapporti

Se un campione viene indicato nel Referto dei campioni con un PCA3 Score, il risultato è un PCA3 Score refertabile e non sono necessarie ulteriori azioni. Se non viene indicato un PCA3 Score, ovvero nella colonna del PCA3 Score è presente la dicitura "--", consultare la Tabella 4b per istruzioni.

Tabella 4b – Condizioni del Referto dei rapporti del PROGENSA PCA3 Assay

Risultato PCA3 (Codice analisi)	Risultato PSA (Codice analisi)	PCA3 Score indicato	Ulteriori analisi?	Azione/Commento
Entro l'intervallo (nessun codice)	Entro l'intervallo (nessun codice)	PCA3 Score	No	Nessuna azione ulteriore; il risultato è refertabile.
Non valido* (a, b, e, h o i)	Non valido (A, B, E, H o I)	--	Sì	Rianalizzare entrambi gli analiti (vedere <i>Ripetizione dell'analisi</i>).
Non valido (a, b, e, h o i)	Alto fuori intervallo (F)	--	Sì	Diluire il campione nel diluente apposito (vedere <i>Diluizione dei campioni alti fuori intervallo</i>), rianalizzare entrambi gli analiti.
Alto fuori intervallo (f)	Non valido (A, B, E, H o I)	--	Sì	Diluire il campione nel diluente apposito, rianalizzare entrambi gli analiti.
Alto fuori intervallo (f)	Alto fuori intervallo (F)	--	Sì	Diluire il campione nel diluente apposito, rianalizzare entrambi gli analiti.
Non valido (a, b, e, h o i)	Basso fuori intervallo (G)	--	No	Il campione non ha RNA sufficiente per l'analisi accurata. Occorre raccogliere un nuovo campione dal paziente.
Entro l'intervallo (nessun codice)	Basso fuori intervallo (G)	--	No	Il campione non ha RNA sufficiente per l'analisi accurata. Occorre raccogliere un nuovo campione dal paziente.
Alto fuori intervallo (f)	Basso fuori intervallo (G)	--	No	Il campione non ha RNA sufficiente per l'analisi accurata. Occorre raccogliere un nuovo campione dal paziente.
Basso fuori intervallo (g)	Basso fuori intervallo (G)	--	No	Il campione non ha RNA sufficiente per l'analisi accurata. Occorre raccogliere un nuovo campione dal paziente.

* Pertiene solo a campioni non validi all'interno di una seduta valida. Se i campioni erano non validi perché la seduta era non valida, i risultati verranno indicati nel Sommario delle eccezioni (vedere *Interpretazione dei risultati nel Sommario delle eccezioni* per ulteriori informazioni).

D. Ripetizione dell'analisi

1. Linee guida per la ripetizione dell'analisi

- Sebbene non sia obbligatorio che entrambi gli analiti vengano analizzati nella stessa seduta, **i risultati relativi a entrambi gli analiti devono provenire dallo stesso flacone di campione per ottenere un PCA3 Score refertabile.**
- Tutte le sedute non valide vanno ripetute, e tutti i campioni non validi derivanti da sedute valide vanno rianalizzati.
- Rianalizzare i campioni usando una nuova serie di calibratori e controlli.
- Un'adeguata conservazione dei campioni avanzati prima della ripetizione dell'analisi è essenziale (vedere *Raccolta, trasporto e magazzinaggio dei campioni* per ulteriori informazioni).
- Un abbinamento manuale degli analiti PCA3 e PSA potrebbe essere necessario per determinare il PCA3 Score (vedere *Abbinamento manuale* per ulteriori informazioni).

2. Diluizione di campioni alti fuori intervallo

- Se la concentrazione di un campione estrapola sopra il Calibratore 5 all'interno di una seduta valida, il risultato è "alto fuori intervallo" e viene etichettato con un codice di analisi "f" o "F" nei referti della seduta. La concentrazione sarà espressa come >[Concentrazione Calibratore 5].
- Capovolgere il campione di urina trattato per miscelarlo prima della diluizione del campione stesso. La diluizione raccomandata, ma non obbligatoria, è di 1:10 usando il PROGENSA PCA3 Specimen Diluent Kit. In un flacone di dimensioni appropriate, aggiungere 1800 µl di diluente del campione e 200 µl di campione; tappare la provetta e capovolgerla cinque volte per miscelarla completamente. Il fattore di diluizione sarà "10" nella lista di lavoro della seduta. Se devono essere rianalizzati entrambi gli analiti, raddoppiare i volumi (usare 3600 µl di diluente del campione e 400 µl di campione). Consultare l'insero informativo del PROGENSA PCA3 Specimen Diluent Kit. Analizzare il campione diluito con il dosaggio.
- Se, dopo la ripetizione dell'analisi, il risultato del campione è di nuovo alto fuori intervallo, si richiede un'ulteriore diluizione, fino a quando il risultato del campione non interpola all'interno dell'intervallo dei calibratori. È permessa un'ulteriore diluizione della diluizione iniziale 1:10, purché la diluizione iniziale sia stata conservata correttamente (vedere *Raccolta, trasporto e magazzinaggio dei campioni* per ulteriori informazioni).

Limiti

- A. Il PROGENSE PCA3 Assay non va usato per pazienti che stanno assumendo farmaci che sono noti influire sui livelli di PSA sierico, come il finasteride (Proscar, Propecia), il dutasteride (Avodart) e la terapia antiandrogena (Lupron). L'effetto di questi farmaci sull'espressione del gene PCA3 non è ancora stato valutato.
- B. Certe procedure terapeutiche e diagnostiche come la prostatectomia, le radiazioni, la biopsia della prostata ed altre, potrebbero influire sulla vitalità del tessuto prostatico e di conseguenza influire sul PCA3 Score. L'effetto di queste procedure sulle prestazioni del dosaggio non è ancora stato valutato. I campioni per l'analisi PCA3 vanno raccolti quando il clinico ritiene che il tessuto prostatico si sia ripreso da tali procedure.
- C. L'uso di questo dosaggio va limitato al personale che è stato addestrato nella relativa procedura. La mancata aderenza alle istruzioni delineate in questo inserto può determinare risultati erranei.
- D. Ciascun laboratorio deve convalidare in modo indipendente un processo di trasferimento al LIS (Laboratory Information System/Sistema di informazioni del laboratorio).
- E. Risultati affidabili dipendono da un'appropriata raccolta dei campioni di urina. Poiché il sistema di trasporto impiegato per questo dosaggio non permette la valutazione al microscopio dell'adeguatezza dei campioni di urina, è necessario addestrare i clinici nelle appropriate tecniche di raccolta di tali campioni. Vedere *Raccolta, trasporto e magazzinaggio dei campioni* per istruzioni. Per istruzioni dettagliate, consultare l'inserto informativo contenuto nel PROGENSE PCA3 Urine Specimen Transport Kit.
- F. I risultati del PROGENSE PCA3 Assay vanno interpretati insieme agli altri dati clinici e di laboratorio a disposizione del clinico. (I risultati dell'analisi possono essere influenzati da un'erronea raccolta dei campioni, da errori tecnici o da scambi di campioni.)

Caratteristiche delle prestazioni

A. Risultati clinici

1. Sensibilità e specificità diagnostiche

Le caratteristiche di prestazione per il PROGENSE PCA3 Assay sono state stabilite utilizzando campioni provenienti da soggetti iscritti presso quattro centri clinici nord-americani geograficamente diversificati. La popolazione dei soggetti consisteva in 529 uomini per i quali era programmata la biopsia della prostata. I dati demografici dei soggetti sono indicati sotto.

- Età media \pm DS = 64 ± 8 anni (valore mediano 63, intervallo dai 32 agli 89)
- Livello medio di PSA sierico = $7,9 \pm 21,9$ $\mu\text{g/l}$ (5,6, da 0,3 a 484)
- Volume medio della prostata (determinato mediante ultrasuono trans-rettale) = 44 ± 25 cc (39, da 5 a 225)
- 34% (180/529) positivi alla biopsia per il cancro alla prostata

La Figura 3 mostra la correlazione del PCA3 Score con la probabilità di una biopsia positiva. Con l'aumentare del PCA3 Score, è aumentata nei soggetti l'occorrenza di una biopsia positiva per il cancro.

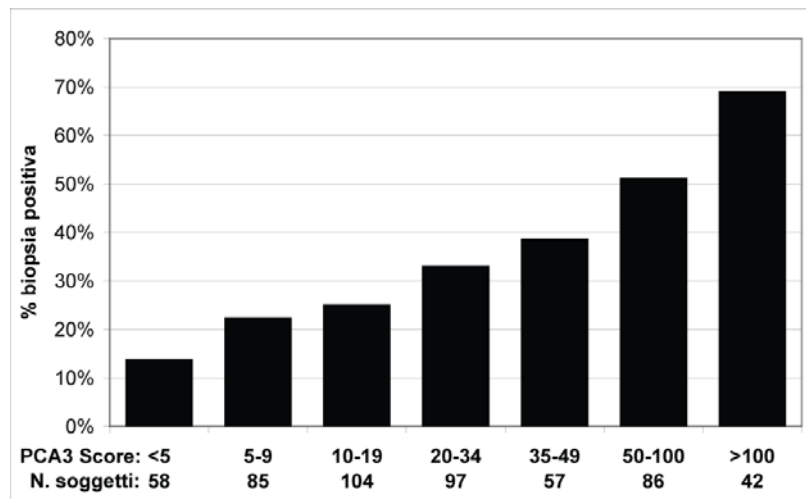


Figura 3. Correlazione di PCA3 Score con la probabilità di biopsia positiva

È stata eseguita l'analisi delle Caratteristiche Operative del Ricevente (ROC), usando la biopsia della prostata come metodo di riferimento, secondo CLSI GP10-A (1995) (4). Per il PROGENSA PCA3 Assay, l'area sotto la curva (AUC) è stata 0,685 (intervallo di confidenza del 95% = da 0,637 a 0,733). La Tabella 5 mostra la sensibilità e la specificità diagnostiche a diversi valori soglia di PCA3 Score. Ciascun laboratorio dovrebbe stabilire il proprio valore soglia per la sensibilità o la specificità diagnostiche (vedere *Interpretazione dei risultati*).

Tabella 5 – Sensibilità e specificità diagnostiche del PROGENSA PCA3 Assay a diversi valori soglia del PCA3 Score

Valore soglia del PCA Score	5	10	15	25	35	50	95
Sensibilità	96%	85%	77%	63%	53%	41%	17%
Specificità	14%	33%	47%	61%	74%	84%	95%

2. Studi sulla stabilità dei campioni

- a. Stabilità nell'urina intera: urina di primo getto è stata raccolta da 10 soggetti e conservata a temperature comprese fra 2 e 8 °C o a 30 °C prima del trattamento mediante aggiunta di mezzo di trasporto dell'urina (UTM). A temperature comprese fra 2 e 8 °C, dopo 4 ore si è osservata in alcuni campioni una significativa degradazione dell'mRNA di PCA3 e PSA. Di conseguenza, l'urina intera deve essere analizzata entro 4 ore. A 30 °C, si è osservata una significativa degradazione in meno di 1 ora. Di conseguenza, l'urina intera deve essere sempre refrigerata o tenuta in ghiaccio prima dell'analisi.
- b. Stabilità nell'urina trattata: dodici campioni sono stati incubati a 4 °C o a 30 °C per un massimo di 38 giorni. A 4 °C, l'mRNA di PCA3 e PSA è rimasto stabile per 21 giorni; a 30 °C, lo è rimasto per 5 giorni. I campioni conservati a -20 °C e a -70 °C hanno dimostrato la stabilità dell'mRNA di PCA3 e PSA per un massimo di 90 giorni.
- c. Stabilità a seguito di congelamento e scongelamento: dei campioni sono stati fatti passare per 6 volte da 37 °C e -70 °C e viceversa. Non si è osservata una diminuzione dei livelli delle copie di mRNA di PCA3 o PSA.

B. Risultati analitici

1. Sensibilità analitica

Un pannello di sensibilità analitica composto da trascrizione di mRNA diluita *in vitro* è stato usato per valutare la sensibilità del dosaggio. Un operatore ha analizzato il pannello in dodici sedute di cinque replicati, usando un unico lotto di reagenti. Il limite del rilevamento e il limite della valutazione quantitativa sono stati calcolati secondo CLSI EP17-A (2004) (5). Il limite del rilevamento dell'analita PCA3 è stato di 80 c/ml, e dell'analita PSA è stato di 1.438 c/ml. Il limite della valutazione quantitativa di entrambi gli analiti è stato il Calibratore 2.

2. Specificità analitica

- a. Trascrizione non accoppiata: il dosaggio è stato concepito per rilevare solo l'mRNA di PCA3 accoppiato esone 3-esone 4 specifico del cancro alla prostata (2). Il dosaggio non ha rilevato 1 milione di c/ml di mRNA di PCA3 non accoppiato significativamente al di sopra del background.
- b. Specificità della prostata dell'mRNA di PCA3 nell'urina: campioni derivanti da soggetti che avevano subito una prostatectomia radicale (n = 97) sono stati analizzati con il PROGENSA PCA3 Assay, ed i livelli di mRNA di PCA3 sono stati confrontati con quelli di soggetti pre-biopsia (n = 464). Il livello mediano di c/ml di mRNA di PCA3 era al di sotto del limite di rilevamento del dosaggio per i campioni derivanti da soggetti post-prostatectomia, mentre il livello mediano di c/ml di mRNA di PCA3 per i campioni derivanti da soggetti pre-biopsia era di 7.243 c/ml; questi dati confermano che l'mRNA di PCA3 nell'urina proviene dalla prostata.
- c. Specificità tissutale: l'RNA totale è stato estratto dai tessuti di due donatori distinti di sesso maschile in base al tipo di tessuto, è stato aggiunto diluente ai campioni (10 ng per reazione) ed è stata eseguita l'analisi con il PROGENSA PCA3 Assay. Il tessuto della prostata è stato l'unico tipo di tessuto rilevato sopra il limite di rilevamento dell'mRNA di PCA3 fra i tipi di tessuto indicati nella Tabella 6.

Tabella 6 – Tipi di tessuto maschili analizzati per il rilevamento dell'mRNA di PCA3

Tipo di tessuto	
Vescica (normale)	Rene
Vescica (tumorale)	Pene
Midollo osseo	Prostata
Dotto deferente	Vescicola seminale
Epididimo	Testicolo

- d. Sostanze interferenti: le sostanze indicate nella Tabella 7 sono state aggiunte ad aliquote di urina maschile trattata raggruppata. I campioni sono stati analizzati con il PROGNSA PCA3 Assay secondo CLSI EP7-A2 (2005) (6). Alle concentrazioni indicate, non è stata osservata nessuna interferenza con il dosaggio.

Tabella 7 – Sostanze analizzate per l'interferenza con il PROGNSA PCA3

Agenti terapeutici		Agenti terapeutici (continua)	
Sostanza	Concentrazione nell'analisi	Sostanza	Concentrazione nell'analisi
Acetaminofene/Codeina	5,34 µmol/l	Uroxatral	30 mg/l
Atorvastatina	25 mg/l	Doxazosina	1,33 µmol/l
Lisinopril	0,74 µmol/l	Terazosina	7,8 µmol/l
Amlodipina	245 µmol/l	Finasteride	15 mg/l
Atenololo	37,6 µmol/l	Tamsulosina	1,2 µg/l
Sulfasalazina	754 µmol/l	Metformina	310 µmol/l
Esomeprazolo	120 mg/l	Sildenafil	12,9 pmol/l
Allopurinolo	294 µmol/l	Serenoa repens	1600 mg/l
Difenidramina	19,6 µmol/l	Selenio	0,275 mg/l
Acetaminofene	1324 µmol/l		
Acido acetilsalicilico	3,62 mmol/l	Costituenti dell'urina	
		Sostanza	Concentrazione nell'analisi
Ibuprofene	2425 µmol/l	Acido urico	1,4 mmol/l
Furosemide	181 µmol/l	Emoglobina	2 g/l
Ciproflossacina	30,2 µmol/l	Leucociti	4,56 x 10 ⁷ cellule/l
Levaquin	48,6 µmol/l	Eritrociti	3,06 x 10 ⁷ cellule/l
Dossiciclina	67,5 µmol/l	Albumina	50 g/l
Fluoxetina idroclorito	11,2 µmol/l	Bilirubina (non coniugata)	342 g/l
Flutamide	1500 mg/l	IgG	60 g/l
Dutasteride	1,5 mg/l		

3. Accuratezza

L'accuratezza del PROGNSA PCA3 Assay è stata valutata secondo CLSI EP15-A2 (2005) (7). Trascrizioni dell'mRNA di PCA3 e PSA sono state quantificate mediante spettrofotometria UV-Vis e aggiunte a normale urina femminile trattata (con nessun mRNA di PCA3 o PSA rilevabile); quindi le concentrazioni sono state misurate nel PROGNSA PCA3 Assay. Il recupero percentuale (%) è stato calcolato come un rapporto fra c/ml misurati e c/ml aggiunti, moltiplicato per 100.

Tabella 8 – Recupero delle copie del PROGNSA PCA3 Assay

Analita	Concentrazione nota, c/ml	Concentrazione misurata, c/ml	Recupero %
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. Linearità e intervallo

L'intervallo lineare del PROGENSA PCA3 Assay è stato determinato secondo CLSI EP6-A (2003) (8) in base all'analisi di regressione lineare (minimi quadrati). Due gruppi di serie di diluizioni sono stati preparati partendo da campioni contenenti alte concentrazioni di mRNA di PCA3 e PSA. Un gruppo è stato diluito in urina femminile trattata ed un gruppo in diluente del campione. Le diluizioni coprivano l'intero intervallo del dosaggio compreso fra i calibratori positivi più bassi e più alti per ciascun analita. Per entrambi gli analiti PCA3 e PSA, i risultati misurati dal dosaggio hanno mostrato una relazione proporzionale diretta fra le diluizioni analizzate ed i valori di c/ml di analita referatati. Non si è riscontrato un significativo effetto matrice del diluente. Vedere Figura 4.

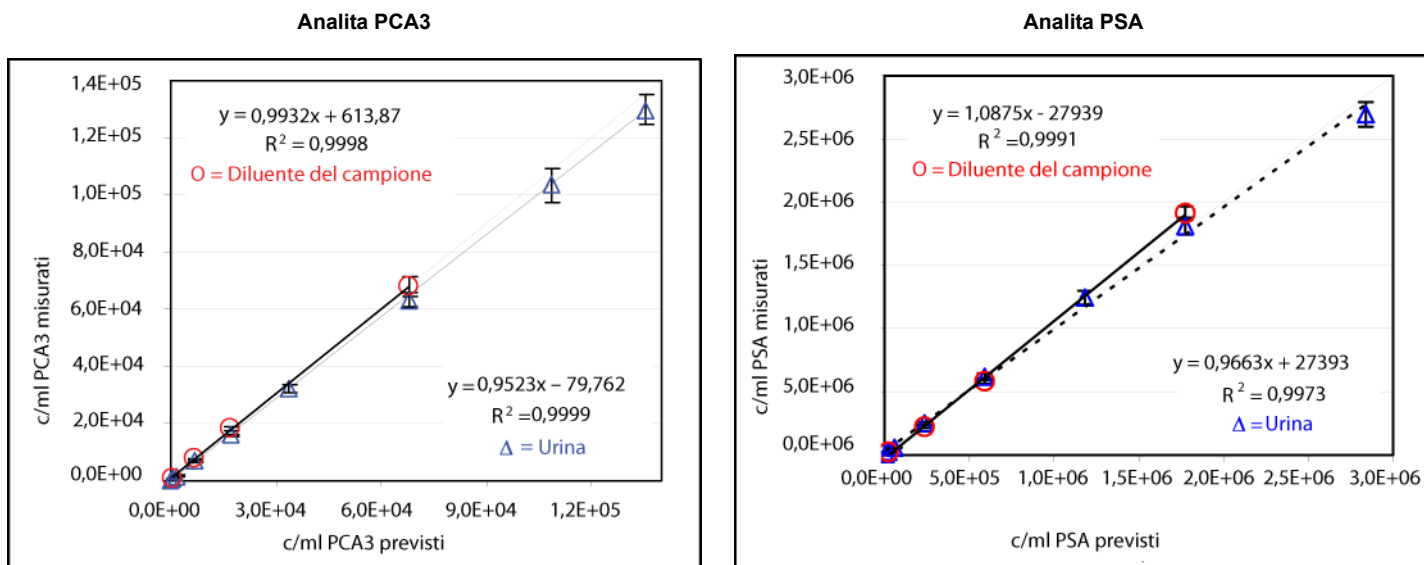


Figura 4. Linearità del PROGENSA PCA3 Assay per gli analiti PCA3 e PSA

5. Precisione

La precisione del dosaggio è stata valutata secondo CLSI EP5-A2 (2004) (9). La ripetibilità è la precisione in condizioni di variabilità minima, e la riproducibilità è la precisione in condizioni di variabilità massima.

Per la ripetibilità, è stato preparato un pannello di analisi a 3 componenti composto da trascrizione di mRNA diluita *in vitro*. Un operatore presso un laboratorio ha analizzato il pannello in 20 sedute di 5 replicati nell'arco di 20 giorni, usando un singolo lotto di calibratori e controlli, un singolo lotto di reagenti e una singola apparecchiatura. La Tabella 9 mostra la precisione della ripetibilità del PROGENSA PCA3 Assay a diversi livelli di concentrazione di analisi.

Tabella 9 – Ripetibilità del PROGENSA PCA3 Assay

Analita	Componente pannello	Media c/ml	Ripetibilità DS	Ripetibilità 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%

Per la riproducibilità, è stato preparato un pannello di analisi ad 8 componenti composto da campioni raggruppati (da 1 a 3) e trascrizione di mRNA diluita (da 4 a 8) *in vitro*. Tre operatori hanno analizzato il pannello in 18 sedute nell'arco di 3 giorni, usando un unico lotto di calibratori e controlli, 3 lotti di reagenti e 3 serie di apparecchiature. Le Tabelle 10 e 11 riepilogano la precisione totale, nella stessa seduta, e la precisione fra sedute, operatori, apparecchiature e lotti diversi del PROGENSA PCA3 Assay per c/ml di analita e per PCA3 Score.

La variabilità nell'ambito di una seduta e quella fra operatori diversi e sedute diverse sono state, in ordine discendente, i fattori che hanno contribuito in maniera maggiore alla varianza complessiva del dosaggio. Il lotto di reagenti e l'apparecchiatura hanno dimostrato di

contribuire poco alla varianza complessiva del dosaggio. Questi risultati dimostrano che il dosaggio ha prestazioni riproducibili, e che la fonte primaria della variazione è l'errore casuale (nell'ambito di una seduta).

Tabella 10 – Riproducibilità del PROGENSA PCA3 Assay: analisi di copia/ml

Analita	Componente pannello	n	c/ml misurati	CV totale	CV nell'ambito di una seduta	CV fra diverse sedute	CV, fra diversi operatori	CV, fra diverse apparecchiature	CV, fra diversi lotti
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%

Tabella 11 – Riproducibilità del PROGENSA PCA3 Assay: analisi del PCA3 Score

Componente pannello*	n	Punteggio medio	CV totale	CV nell'ambito di una seduta	CV fra diverse sedute	CV, fra diversi operatori	CV, fra diverse apparecchiature	CV, fra diversi lotti
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%

*I componenti del pannello da 4 a 6 contenevano solo trascrizione di mRNA di PCA3 o PSA e pertanto non sono stati inclusi in questa analisi.

Bibliografia

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 e W.B. Isaacs.** 1999. DD3: A New Prostate-Specific Gene, Highly Overexpressed in Prostate Cancer (Un nuovo gene specifico della prostata, altamente iperespresso nel cancro alla prostata). *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 e J.A. Schalken.** 2003. DD3^{PCA3}-based Molecular Urine Analysis for the Diagnosis of Prostate Cancer (Analisi molecolare dell'urina basata su PCA3 DD3 per la diagnosi del cancro alla prostata). *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 e H. Rittenhouse.** 2006. APTIMA PCA3 Molecular Urine Test: Development of a Method to Aid in the Diagnosis of Prostate Cancer (APTIMA PCA3 Molecular Urine Test: sviluppo di un metodo di ausilio nella diagnosi del cancro alla prostata). *Clin Chem.* **52**:1089-95.
4. **CLSI.** 1995. Documento CLSI GP10-A, Assessment of the Clinical Accuracy of Laboratory Tests Using Receiver Operating Characteristic (ROC) Plots [Valutazione dell'accuratezza clinica delle analisi di laboratorio che usano diagrammi delle Caratteristiche Operative del Ricevente (ROC)]. CLSI, Wayne, PA.
5. **CLSI.** 2004. Documento CLSI EP17-A, Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation (Protocolli per la determinazione dei limiti di rilevamento e dei limiti di valutazione quantitativa). CLSI, Wayne, PA.
6. **CLSI.** 2005. Documento CLSI EP7-A2, Interference Testing in Clinical Chemistry (Analisi delle interferenze nella chimica clinica). CLSI, Wayne, PA.
7. **CLSI.** 2005. Documento CLSI EP15-A2, User Verification of Performance for Precision and Trueness (Verifica dell'utente delle prestazioni relative a precisione e veridicità). CLSI, Wayne, PA.
8. **CLSI.** 2003. Documento CLSI EP6-A, Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach (Valutazione della linearità delle procedure di misurazione quantitativa: un approccio statistico). CLSI, Wayne, PA.
9. **CLSI.** 2004. Documento CLSI EP5-A2, Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Valutazione delle prestazioni di precisione dei metodi di misurazione quantitativa). CLSI, Wayne, PA.

**Sviluppato, fabbricato
e distribuito da:**



Gen-Probe Incorporated
San Diego, CA 92121 USA

Informazioni per contattarci negli U.S.A. e nel resto del mondo

Servizio di assistenza alla clientela: +1 858 410 8002 customerservice@gen-probe.com
Assistenza tecnica: +1 858 410 8511 technicalsupport@gen-probe.com

Numero verde per chi chiama da U.S.A e Canada

Servizio di assistenza alla clientela: +1 800 523 5001
Assistenza tecnica: +1 888 484 4747

www.gen-probe.com



MLT Research Ltd
Attn. Dr Andrew Rutter
5 Chiltern Close
Cardiff
CF14 5DL
United Kingdom

GEN-PROBE, GEN-PROBE e il suo design, APTIMA, LEADER, PROGNSA e SB100 sono marchi commerciali della Gen-Probe Incorporated; eppendorf (stilizzato) è un marchio commerciale della Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH;
RAININ è un marchio commerciale della Rainin Instrument, LLC;
TECAN e FREEDOM EVO sono marchi commerciali della Tecan Group AG.
Qualsiasi altro nome di marchio che potrebbe apparire in questo inserto informativo appartiene al suo rispettivo titolare.

Questo prodotto ed il suo uso sono coperti da uno o più dei seguenti brevetti: Brevetto U.S.A. N. 5,185,439, 5,283,174, 5,399,491, 5,437,990, 5,480,784, 5,556,771, 5,585,481, 5,612,200, 5,614,387, 5,639,604, 5,656,744, 5,696,251, 5,834,254, 5,888,779, 5,932,416, 5,948,899, 6,004,745, 6,090,591, 6,110,678, 6,280,952, 6,294,338, 6,410,276, 6,414,152, RE37,891, 6,811,985, 6,908,735, 7,008,765 e 7,070,925; e le loro controparti estere.

© 2006-2008 Gen-Probe Incorporated

501377IT Rev. A

2008-03