

Ensaio PROGENSA PCA3

Para utilização em diagnóstico *in vitro*.

Exclusivamente para exportação dos EUA.

Informações gerais	2
Utilização pretendida	2
Resumo e explicação do teste	2
Princípios do procedimento	2
Reagentes e materiais fornecidos	4
Materiais	8
Advertências e precauções	10
Requisitos de armazenamento e manuseamento dos reagentes	13
Colheita, transporte e armazenamento de espécimes	15
Procedimento de teste	17
Notas sobre o procedimento	23
Procedimentos de controlo de qualidade	27
Interpretação dos resultados	28
Limitações	33
Características do desempenho	34
Bibliografia	40

Informações gerais

Utilização pretendida

O ensaio PROGENSA PCA3 é um teste de amplificação de ácido nucleico (NAAT) *in vitro* que detecta o ácido ribonucleico (RNA) do Gene 3 do Cancro da Próstata (PCA3) em espécimes de urina de indivíduos do sexo masculino para gerar um PCA3 Score. O PCA3 Score destina-se a ser utilizado em conjunto com algoritmos de diagnóstico standard-of-care como auxiliar de diagnóstico do cancro da próstata.

Resumo e explicação do teste

A utilização do teste do antigénio específico da próstata (PSA) no soro sanguíneo para detecção do cancro da próstata teve como resultado o diagnóstico por biopsia de tumores mais pequenos, anteriormente não detectados (1), o que criou um novo dilema no diagnóstico: apenas uma parte dos homens com níveis aumentados de PSA no soro sanguíneo possuem cancro da próstata detectável. Os homens com pelo menos uma biopsia negativa têm, frequentemente, um PSA aumentado no soro, devido principalmente a próstatas aumentadas e hiperplasia benigna da próstata (BPH). No entanto, uma proporção significativa de homens com um PSA ligeiramente aumentado no soro (2,5-4,0 µg/l) tem, ou virá a ter, um cancro da próstata significativo do ponto de vista clínico (1). Embora a biopsia continue a ser o método mais importante para detecção do cancro da próstata, são necessários testes mais precisos com uma maior especificidade para ajudar a orientar as decisões de realização de biopsia à próstata.

O PCA3 (também conhecido como “PCA3^{DD3}” ou “DD3^{PCA3}”) é um RNA específico da próstata de não codificação altamente expressado por células cancerígenas da próstata, com uma regulação superior 66 vezes (mediana) quando comparada com a do tecido benigno adjacente (2). Ao contrário, a expressão do gene do PSA é semelhante nas células cancerígenas e benignas da próstata; logo, os níveis de RNA do PSA podem ser usados para normalização relativamente à quantidade de ácido ribonucleico (RNA) específico da próstata em amostras de testes moleculares. Ficou demonstrada a viabilidade de testes quantitativos moleculares baseados no PCA3 a partir de sedimento de urina (2) e de urina total (3).

O ensaio PROGENSA PCA3 utiliza urina total recolhida após exame de toque rectal (TR) com três passagens por lobo. O TR faz libertar células da próstata através do sistema de ducto da próstata para o tracto urinário, onde podem ser recolhidas na primeira urina. A urina é processada através da adição de um meio de transporte da urina que faz a lise das células e estabiliza o RNA. O RNA do PCA3 e o RNA do PSA são quantificados, e o PCA3 Score é determinado com base na relação entre o RNA do PCA3/PSA. Para além da normalização do sinal de PCA3, a medição do RNA do PSA serve também para confirmar que o produto de RNA específico da próstata é suficiente para gerar um resultado válido. PCA3 Scores mais elevados estão relacionados com uma maior probabilidade de biopsia positiva da próstata.

Princípios do procedimento

O ensaio PROGENSA PCA3 é constituído por dois testes quantitativos de amplificação de ácido nucleico. O ensaio PROGENSA PCA3 combina as tecnologias de captura do alvo (Target Capture), amplificação mediada pela transcrição (TMA, Transcription Mediated Amplification) e ensaio de protecção de hibridação (HPA, Hybridization

Protection Assay) para, respectivamente, otimizar o processamento do espécimen de urina, amplificar o RNA alvo e detectar o amplicon.

Quando o ensaio PROGENSA PCA3 é realizado em laboratório, as moléculas do RNA alvo são isoladas dos espécimes de urina por captura do alvo. Os oligonucleótidos (“oligonucleótidos de captura”) complementares a regiões específicas da sequência dos alvos são hibridados conforme os alvos no espécimen de urina. Para cada alvo é utilizado um oligonucleótido de captura separado. O alvo hibridado é, então, capturado para micropartículas magnéticas que são separadas do espécimen de urina num campo magnético. Os passos de lavagem são utilizados para remover componentes secundários do tubo de reacção. Os passos de separação magnética e lavagem são realizados com um sistema de captura do alvo.

A amplificação de alvo ocorre através de TMA, que é um método de amplificação de ácido nucleico baseado em transcrição que utiliza duas enzimas, a transcriptase reversa do vírus da leucemia murínica de Moloney (MMLV) e a polimerase do RNA T7. Para cada alvo é utilizado um conjunto único de elementos de preparação. A transcriptase reversa é utilizada para gerar uma cópia de ácido desoxirribonucleico (DNA) (contendo uma sequência de activação para a polimerase do RNA T7) da sequência alvo. A polimerase do RNA T7 produz várias cópias do produto de amplificação do RNA a partir do modelo da cópia do DNA.

A detecção é alcançada por HPA utilizando sondas de ácido nucleico etiquetadas por quimioluminescência e de estirpe única, que são complementares ao amplicon. Para cada amplicon alvo são utilizadas sondas separadas. As sondas de ácido nucleico marcadas são hibridadas especificamente no produto de amplificação. O reagente de selecção diferencia entre sondas hibridadas e não hibridadas através da inactivação do marcador nas sondas não hibridadas. Durante o passo de detecção, o sinal de quimioluminescência produzido pela sonda hibridada é medido num luminómetro e é registado como unidade de luz relativa (RLU).

O RNA do PCA3 e o RNA do PSA são quantificados em tubos separados e o PCA3 Score é calculado. Os calibradores que contém quantidades conhecidas de transcritos de RNA do PCA3 ou RNA do PSA são incluídos em todos os processamentos de ensaio e usados para gerar uma curva padrão. Os controlos PCA3 e PSA estão também incluídos para verificar a precisão dos resultados interpolados a partir da curva padrão.

Reagentes e materiais fornecidos

A seguir estão indicados os reagentes e materiais fornecidos no kit do ensaio PROGENSA PCA3/PSA para o ensaio PROGENSA PCA3. Os Símbolos de Identificação do Reagente também estão indicados ao lado do nome do reagente.

Kit do ensaio PROGENSA PCA3, 2 x 100 Reacções, N.º Cat. 302355 (8 caixas)

Kit de 100 reacções PROGENSA PCA3

Caixa refrigerada PROGENSA PCA3 — Armazenar entre 2 °C e 8 °C após a recepção até ao prazo de validade indicado no rótulo

Símbolo	Componente	Quantidade
A	Reagente de amplificação PCA3 <i>Ácidos nucleicos não infecciosos liofilizados em solução tamponada HEPES com <10% de agente de volume.</i>	1 frasco
E	Reagente enzimático PCA3/PSA <i>Transcriptase reversa e RNA polimerase liofilizadas em solução tamponada HEPES com <10% de reagente de volume.</i>	1 frasco
P	Reagente de sonda PCA3 <i>Sondas de DNA quimioluminescente não infeccioso desidratadas em solução tamponada de succinato com <5% de agente de volume e <5% de lauril sulfato de lítio.</i>	1 frasco

Caixa à temperatura ambiente PROGENSA PCA3 — Armazenar entre 15 °C e 30 °C após a recepção até ao prazo de validade indicado no rótulo

Símbolo	Componente	Quantidade
AR	Solução de reconstituição de amplificação PCA3 <i>Solução aquosa com conservantes (<1% parabenos).</i>	1 x 9,3 ml
ER	Solução de reconstituição enzimática PCA3/PSA <i>Solução tamponada HEPES com um surfactante (10% Triton X-100) e 20% de glicerol.</i>	1 x 3,3 ml
PR	Solução de reconstituição de sonda PCA3/PSA <i>Solução tamponada de succinato com <5% de lauril sulfato de lítio.</i>	1 x 12,4 ml
S	Reagente de selecção PCA3/PSA <i>Solução tamponada de borato com surfactante (1% Triton X-100).</i>	1 x 31 ml
TCR	Reagente de captura de alvo PCA3 <i>Ácido nucleico não infeccioso em solução tamponada HEPES com fase sólida.</i>	1 x 22 ml
	Cartões de selagem	1 embalagem
	Colarinhos de Reconstituição	1 embalagem

Kits de calibradores e controlos PROGENSA PCA3 — Armazenar entre 2 °C e 8 °C após a receção até ao prazo de validade indicado no rótulo

Símbolo	Componente	Quantidade
CAL	Calibrador 1 PCA3 <i>Solução tamponada de fosfato com <5% de lauril sulfato de lítio.</i>	1 x 2,0 ml
CAL	Calibradores 2-5 PCA3 <i>Ácido nucleico PCA3 não infeccioso em solução tamponada de fosfato com <5% de lauril sulfato de lítio.</i>	4 x 1,7 ml
PC	Controlos positivos PCA3 <i>Ácido nucleico PCA3 não infeccioso em solução tamponada de fosfato com <5% de lauril sulfato de lítio.</i>	2 x 1,7 ml
	Folha informativa da concentração de PCA3	1 folha

Kit de 100 reacções PROGENSA PSA

Caixa refrigerada PROGENSA PSA — Armazenar entre 2 °C e 8 °C após a receção até ao prazo de validade indicado no rótulo

Símbolo	Componente	Quantidade
A	Reagente de amplificação PSA <i>Ácidos nucleicos não infecciosos liofilizados em solução tamponada HEPES com <10% de agente de volume.</i>	1 frasco
E	Reagente enzimático PCA3/PSA <i>Transcriptase reversa e RNA polimerase liofilizadas em solução tamponada HEPES com <10% de reagente de volume.</i>	1 frasco
P	Reagente de sonda PSA <i>Sondas de DNA quimioluminescente não infeccioso desidratadas em solução tamponada de succinato com <5% de agente de volume e <5% de lauril sulfato de lítio.</i>	1 frasco

Caixa à temperatura ambiente PROGENSA PSA — Armazenar entre 15 °C e 30 °C após a recepção até ao prazo de validade indicado no rótulo

Símbolo	Componente	Quantidade
AR	Solução de reconstituição de amplificação PSA <i>Solução aquosa com conservantes (<1% parabenos).</i>	1 x 9,3 ml
ER	Solução de reconstituição enzimática PCA3/PSA <i>Solução tamponada HEPES com um surfactante (10% Triton X-100) e 20% de glicerol.</i>	1 x 3,3 ml
PR	Solução de reconstituição de sonda PCA3/PSA <i>Solução tamponada de succinato com <5% de lauril sulfato de lítio.</i>	1 x 12,4 ml
S	Reagente de selecção PCA3/PSA <i>Solução tamponada de borato com surfactante (1% Triton X-100).</i>	1 x 31 ml
TCR	Reagente de captura de alvo PSA <i>Ácido nucleico não infeccioso em solução tamponada HEPES com fase sólida.</i>	1 x 22 ml
	Cartões de selagem	1 embalagem
	Colarinhos de Reconstituição	1 embalagem

Kits de calibradores e controlos PROGENSA PSA — Armazenar entre 2 °C e 8 °C após a recepção até ao prazo de validade indicado no rótulo

Símbolo	Componente	Quantidade
CAL	Calibrador 1 PSA <i>Solução tamponada de fosfato com <5% de lauril sulfato de lítio.</i>	1 x 2,0 ml
CAL	Calibradores 2-5 PSA <i>Ácido nucleico PSA não infeccioso em solução tamponada de fosfato com <5% de lauril sulfato de lítio.</i>	4 x 1,7 ml
PC	Controlos positivos PSA <i>Ácido nucleico PSA não infeccioso em solução tamponada de fosfato com <5% de lauril sulfato de lítio.</i>	2 x 1,7 ml
	Folha informativa da concentração de PSA	1 folha

Fluidos de ensaio APTIMA — Armazenar entre 15 °C e 30 °C (2 caixas) após a recepção até ao prazo de validade indicado no rótulo

Símbolo	Componente	Quantidade
W	Solução de lavagem <i>Solução tamponada HEPES com <2% dodecil sulfato de sódio.</i>	1 x 402 ml
DF	Tampão para o fluido de desactivação <i>Solução tamponada de bicarbonato.</i>	1 x 402 ml
O	Reagente de óleo <i>Óleo de silicone.</i>	1 x 24,6 ml

Nota: Todos os materiais incluídos no kit do ensaio PROGENSA PCA3 podem também ser adquiridos separadamente (consulte a secção Materiais para mais informações).

Materiais

Nota: Os materiais disponíveis na Gen-Probe possuem a indicação dos números de catálogo.

Materiais necessários, mas disponíveis separadamente

	<u>N.º Cat.</u>
Kit de transporte de espécimen de urina PROGENSA PCA3	302352
Luminómetro LEADER HC+	104747
Sistema de Captura de Alvo (Target Capture System, TCS) GEN-PROBE	104555
Kit APTIMA Auto Detect	301048
2 pipetadores eppendorf Repeater Plus	105725
Pontas de pipetador de repetição (2,5 ml, 5,0 ml, 25,0 ml)	—
Um dos seguintes materiais:	—
2 Misturadores vórtex multitubos	102160F
3 Banhos de água circulantes (62 °C ± 1 °C, 42 °C ± 1 °C, 62 °C ± 1 °C)	104586F
3 Espaçadores de banho de água	104627
OU	
2 SB100 Banho de calor seco/misturadores vórtex	105524F
Poderão ser necessários mais instrumentos SB100, dependendo do rendimento exigido	
Micropipetador, 1000 µl RAININ PR1000	901715
Pontas, 1000 µl P1000	105049
Pipetador, eppendorf 20 a 200 µl	105726
Pontas, Pipeta 20 a 200 µl	—
Lixívia 5% a 7% (solução de hipoclorito de sódio 0,7 M a 1,0 M)	—
Recipiente de plástico com tampa grande	—
Recipientes padrão de colheita de urina, sem conservantes	—
Unidades de Dez Tubos (TTU)	TU0022
Cassetes de Dez Pontas (TTC)	104578
Padrão de calibração SysCheck	301078

Materiais opcionais

	<u>N.º Cat.</u>
Kit de 100 reacções PROGENSA PCA3	302354
Kit de 100 reacções PROGENSA PSA	302357
Kit de calibradores e controlos PROGENSA PCA3	302353
Kit de calibradores e controlos PROGENSA PSA	302356
Painéis de proficiência PROGENSA PCA3/PSA	302350

	<u>N.º Cat.</u>
Kit de diluente de espécímenes PROGENSA PCA3	302351
Kit de Fluidos de Ensaio APTIMA	302002C
Pontas de pipeta descartáveis com filtro (1 ml)	10612513 (Tecan)
TECAN Freedom EVO 100/4	900932
Conjunto de placa de plataforma PCA3, DTS 800	902021 —
Reservatório de reagente (módulo de quarto de 40 ml)	104765
Reservatório de reagente dividido (19 ml x 2 módulos de quarto)	901172
Tubos de transporte	302521
Tampas perfuráveis de substituição	302520
Tampas não perfuráveis de substituição	103036A

Advertências e precauções

- A. Para utilização em diagnóstico *in vitro*.
- B. Exclusivamente para exportação dos EUA.

Relacionados com o laboratório

- C. Utilize apenas os artigos de laboratório descartáveis que sejam fornecidos ou especificados.
- D. Empregue todas as precauções laboratoriais de rotina. Não coma, não beba nem fume nas áreas de trabalho designadas. Use luvas sem pó descartáveis, protecção ocular e batas de laboratório quando manusear espécimes e reagentes de um kit. Lave bem as mãos depois de manusear os espécimes de urina e os reagentes do kit.
- E. **Advertência: Irritante, corrosivo.** Evite o contacto do Auto Detect 1 e 2 com a pele, olhos e membranas mucosas. Se estes fluidos entrarem em contacto com a pele ou os olhos, lave bem com água a zona afectada. Se estes fluidos derramarem, dilua o derrame com água antes de o limpar e secar.
- F. As superfícies de trabalho, os pipetadores e outro equipamento têm de ser regularmente descontaminados com solução de hipoclorito de sódio de 2,5% a 3,5% (0,35 M a 0,5 M) (ver *Notas sobre o procedimento*).
- G. Recomenda-se veementemente a existência de uma área independente para pós-amplificação para minimizar a contaminação pelo amplicon no ensaio. Esta área dedicada deve estar afastada da área de pré-amplificação, onde ocorre a preparação de reagentes, a captura de alvo e a amplificação.
- H. Para ajudar a prevenir que áreas de laboratório fiquem contaminadas com o amplicon, a área do laboratório deve estar disposta de modo a ter um fluxo de trabalho unidireccional desde a preparação dos reagentes até à pós-amplificação. Os espécimes, equipamentos e reagentes não devem ser devolvidos à área onde um passo anterior tenha sido executado. Os técnicos não devem voltar às áreas de trabalho anteriores sem as devidas medidas de protecção contra contaminação.

Relacionados com os espécimes

- I. Após ter sido adicionada urina, o nível do líquido no tubo de transporte de espécimen de urina deve estar, inicialmente, entre duas linhas pretas indicadoras na etiqueta do tubo. De outra forma, o espécimen deve ser rejeitado.
- J. Mantenha condições de armazenamento adequadas durante o envio do espécimen, para garantir a integridade do mesmo. A estabilidade do espécimen sob condições de envio diferentes das recomendadas, não foi avaliada.
- K. Os prazos de validade indicados nos kits de colheita referem-se ao local da colheita e não às instalações de testes. As amostras colhidas em qualquer momento antes da data de validade constante do kit de colheita, e transportadas e armazenadas de acordo com o folheto da embalagem, são válidas para realização do teste mesmo que a data de validade do tubo de colheita tenha expirado.

- L. Armazene todos os espécimes às temperaturas indicadas. O desempenho do ensaio pode ser afectado pela utilização de espécimes conservados de forma incorrecta. Consulte *Colheita, transporte e armazenamento de espécimes* para obter instruções específicas.
- M. Os espécimes de urina podem ser infecciosos. Empregue Precauções Universais ao executar este ensaio. Os métodos de manuseamento e eliminação adequados devem ser estabelecidos pelo director do laboratório. Este procedimento deve ser realizado apenas por pessoal adequadamente qualificado como especialista na utilização do ensaio PROGENSA PCA3 e com formação adequada no manuseamento de materiais infecciosos.
- N. Evite a contaminação cruzada durante os passos de manuseamento dos espécimes. Os espécimes de urina podem conter níveis altos de RNA alvo. Certifique-se de que os recipientes de espécimes não entram em contacto uns com os outros e deite fora os materiais usados sem passá-los por cima de recipientes abertos. Se as luvas entrarem em contacto com o espécimen, troque as luvas para evitar contaminação cruzada.

Relacionados com o ensaio

- O. Não utilize o kit após o prazo de validade.
- P. **Para o kit de ensaio PROGENSA PCA3, não permuta, misture ou combine reagentes do ensaio PCA3 com diferentes números de lote** (ou seja, para cada analito, os reagentes do ensaio na caixa “refrigerada” e na caixa “à temperatura ambiente” têm de pertencer ao mesmo lote). Os reagentes do ensaio podem ser utilizados com lotes diferentes de kits de calibradores e controlos. Os kits de fluidos do ensaio APTIMA são permutáveis. Os kits de reagentes PCA3 e PSA não necessitam de corresponder uns aos outros em termos de lote.
- Q. Armazene todos os reagentes de ensaio às temperaturas indicadas. O desempenho do ensaio pode ser afectado pela utilização de reagentes conservados de forma incorrecta. Consulte *Requisitos de armazenamento e manuseamento dos reagentes e Notas sobre o procedimento* para obter instruções específicas.
- R. Para desactivação do ensaio (consulte *Procedimento de teste*), a concentração mínima da solução de hipoclorito de sódio tem de ser 2,5% (0,35 M) **após** diluição de 1:1 com tampão de desactivação. Por conseguinte, a solução de hipoclorito de sódio inicial tem de ser de 5% a 7% (0,7 M a 1,0 M) para obter a concentração final necessária para a desactivação.
- S. Tem de utilizar pontas com encaixes hidrofóbicos. Para este ensaio é necessário utilizar no mínimo dois pipetadores de repetição: um para utilização nos passos pré-amplificação e outro para utilização nos passos pós-amplificação. Deve ser dedicado um micropipetador para utilização em transferência do espécimen, excepto se for usado um instrumento TECAN Freedom EVO 100/4. Todos os pipetadores têm de ser limpos regularmente conforme descrito nas *Notas sobre o procedimento*.
- T. Quando utilizar pipetadores de repetição para adição de reagentes, não toque no tubo de reacção com a ponta do pipetador para evitar a contaminação cruzada de um tubo para outro.

- U. É necessária uma mistura adequada para alcançar resultados de ensaio precisos. Para informações mais completas, consulte *Notas sobre o procedimento*.
- V. Devem ser dedicados banhos de água separados para os passos de pré-amplificação, amplificação e pós-amplificação do ensaio.
- W. Alguns reagentes deste kit estão etiquetados com símbolos de risco e segurança, de acordo com a Directiva Europeia 1999/45/CE e devem ser manuseados em conformidade. As Fichas de Dados de Segurança de Materiais podem ser consultadas em www.gen-probe.com e estão disponíveis a pedido.

Requisitos de armazenamento e manuseamento dos reagentes

A. Consulte Tabela 1 para obter informações sobre o armazenamento de reagentes.

Tabela 1: Armazenamento dos reagentes

Reagente/Fluido	Armazenamento não aberto	Aberto/Reconstituído Estabilidade (até à data de validade)
Reagentes de amplificação	2 °C a 8 °C até à data de validade	30 dias de 2 °C a 8 °C*
Reagentes de sonda	2 °C a 8 °C até à data de validade	30 dias de 2 °C a 8 °C*
Reagente enzimático	2 °C a 8 °C até à data de validade	30 dias de 2 °C a 8 °C*
Reagentes de captura do alvo	15 °C a 30 °C até à data de validade	30 dias de 15 °C a 30 °C
Solução de reconstituição de amplificação	2 °C a 30 °C até à data de validade	N/A (utilização única)
Solução de reconstituição de sonda	2 °C a 30 °C até à data de validade	N/A (utilização única)
Solução de reconstituição enzimática	2 °C a 30 °C até à data de validade	N/A (utilização única)
Reagente de selecção	2 °C a 30 °C até à data de validade	30 dias de 15 °C a 30 °C
Calibradores	2 °C a 8 °C até à data de validade	N/A (utilização única)
Controlos	2 °C a 8 °C até à data de validade	N/A (utilização única)
Reagente de óleo	15 °C a 30 °C até à data de validade	30 dias de 15 °C a 30 °C
Solução de lavagem	15 °C a 30 °C até à data de validade	30 dias de 15 °C a 30 °C
Tampão para o fluido de desactivação	15 °C a 30 °C até à data de validade	28 dias de 15 °C a 30 °C

*Podem ser usados novamente para outros processamentos de ensaio até 4 vezes, desde que a quantidade total de tempo à temperatura ambiente não seja superior a 24 horas.

B. **Não armazene o reagente de captura do alvo a temperaturas abaixo dos 15 °C.**

C. O Reagente de Sonda e o Reagente de Sonda Reconstituído são fotossensíveis. Proteja estes reagentes de exposição prolongada à luz durante o armazenamento e preparação para utilização.

D. **Não congele os reagentes.**

E. Não utilize reagentes ou fluidos após a data de validade.

F. Os calibradores e controlos PROGENSA PCA3 e PSA são frascos de processamento único e devem ser eliminados após utilização.

G. Alterações no aspecto físico do reagente fornecido poderá ser indicação de instabilidade ou deterioração destes materiais. Se forem observadas alterações no aspecto físico dos reagentes quando estes estiverem em ressuspensão (por exemplo, alterações óbvias na cor do reagente ou turvação indicativas de contaminação microbiana), contacte o Suporte Técnico da Gen-Probe antes de utilizar.

H. Elimine o reagente reconstituído após 30 dias ou na data de validade, a situação que ocorrer primeiro.

I. Os agentes residuais abertos ou reconstituídos podem ser usados em ensaios seguintes caso tenham sido armazenados adequadamente após a utilização inicial. O reagente residual pode ser associado a reagente preparado de fresco ou outro reagente residual do mesmo lote. **Não troque, não misture nem combine reagentes**

de kits com números de lote diferentes (consulte *Advertências e precauções*).

Nenhum dos componentes do reagente associado pode exceder os limites de armazenamento do reagente aberto ou reconstituído. Assegure-se de que o reagente associado foi minuciosamente misturado e que foi preparado o volume bastante para fornecer reagente suficiente para um processamento de ensaio completo.

Colheita, transporte e armazenamento de espécimes

O ensaio PROGENSA PCA3 foi concebido para quantificar o RNA de PCA3 e PSA na primeira urina colhida após um TR constituída por três passagens por lobo. A urina é processada utilizando o kit de transporte de espécimen de urina PROGENSA PCA3. A estabilidade do RNA de PCA3 e PSA em urina e em urina processada foi determinada por monitorização dos níveis de cópia de RNA em espécimes de urina colhida segundo as instruções abaixo.

A. Instruções de colheita e processamento de espécimen de urina:

1. Pode ser útil pedir ao paciente que beba uma quantidade grande de água (aproximadamente 500 ml) para garantir urina suficiente para colheita.
2. Realize um exame de TR, tal como descrito abaixo, imediatamente antes da colheita da urina.

Aplique uma pressão suficiente na próstata para baixar a superfície em cerca de 1 cm, desde a base ao ápex, e desde a lateral à linha média para cada lobo, tal como mostrado na Figura 1. Realize exactamente três toques em cada lobo. Não se pretende que seja uma massagem prostática.

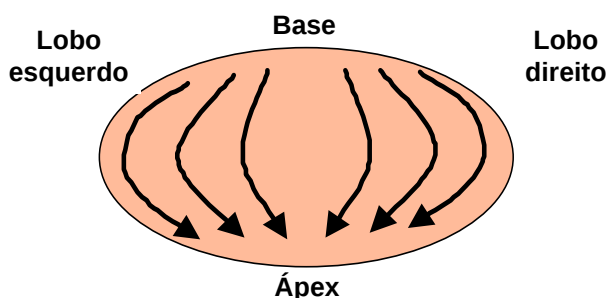


Figura 1. Instruções adequadas de pressão aplicada à próstata

3. No seguimento do TR, instrua o paciente para recolher a primeira urina (cerca de 20 ml a 30 ml do fluxo de urina inicial) num copo de colheita de urina devidamente etiquetado. Este deverá ser o primeiro espécimen de urina evacuado no seguimento do TR. Utilize um copo de colheita isento de conservantes. Se o paciente não conseguir parar o fluxo de urina e fornecer mais urina do que os primeiros 20 ml a 30 ml solicitados, conserve o volume total. Se o paciente não conseguir fornecer o volume solicitado, é necessário pelo menos 2,5 ml para efectuar o ensaio PROGENSA PCA3. De outra forma, o espécimen deve ser rejeitado.

Nota: Volumes de urina muito elevados podem baixar as concentrações dos analitos PCA3 e PSA e podem, ocasionalmente, resultar num espécimen inválido. Por conseguinte, o paciente deve tentar evitar encher o copo de colheita de urina.

4. **Os espécimes de urina não processados, se não forem processados imediatamente, têm de ser mantidos entre 2 °C e 8 °C ou conservados em gelo. Os espécimes de urina não processados e refrigerados devem ser transferidos para dentro do tubo de transporte de espécimen de urina, dentro do período de quatro horas após a colheita. Caso contrário, o espécimen tem de ser rejeitado e tem de ser colhido um novo espécimen. Não congele espécimes de urina não processados.**

5. Para processar os espécimes de urina, tape bem e inverta cinco vezes os espécimes de urina para ressuspender as células. Retire a tampa do tubo de transporte de espécimen de urina e transfira 2,5 ml da urina recolhida para dentro do tubo usando a pipeta de transferência descartável fornecida. O volume correcto de urina foi adicionado quando o nível de fluido está entre as linhas de enchimento pretas da etiqueta do tubo de transporte de espécimen de urina.
6. Volte a fechar bem o tubo de transporte de espécimen de urina e inverta o espécimen de urina cinco vezes para misturá-lo. Este é conhecido agora como espécimen de urina processado.

B. Transporte e armazenamento de espécimes antes do teste:

1. Os espécimes de urina processados têm de ser transportados para o laboratório no tubo de transporte de espécimen de urina. Podem ser enviados em condições ambientais (sem controlo de temperatura) ou congelados. Devem ser efectuados preparativos de expedição de modo a assegurar que os espécimes são recebidos no laboratório de análise nos 5 dias posteriores à colheita.

Após a recepção dos espécimes enviados, o laboratório deve verificar a data de colheita do espécimen no tubo. Se o espécimen tiver sido enviado em condições ambientais e tiver sido recebido mais do que 5 dias após a colheita, este deve ser rejeitado e deve ser feito um pedido de um novo espécimen. O laboratório pode guardar os espécimes entre 2 °C e 8 °C até 14 dias antes de ser necessária a sua eliminação. Se forem necessários períodos de tempo mais prolongados, consulte a Tabela 2 para saber quais os tempos de armazenamento permitidos a temperaturas diferentes.

Tabela 2: Durações de armazenamento do espécimen de urina processado

Temperatura de armazenamento	Tempo
Armazenamento e transporte de espécimes processados:	Até 5 dias*
Após recepção no laboratório de análises:	
2 °C a 8 °C	Até 14 dias
-35 °C a -15 °C	Até 11 meses**
A temperatura igual ou inferior a -65 °C	Até 36 meses**

*Tempo permitido para envio de espécimes em condições ambientais ou congelados.

**Tempo permitido para armazenamento em refrigeração.

2. Os espécimes de urina processados podem ser submetidos a até cinco ciclos de congelação-descongelação.

C. Conservação de espécimes após o teste:

1. Os espécimes que tenham sido analisados devem ser conservados na vertical num suporte.
2. Os tubos de transporte do espécimen de urina, se não forem tapados novamente com uma tampa intacta, devem ser cobertos por uma nova barreira limpa de plástico ou folha metalizada.
3. Se os espécimes analisados tiverem de ser congelados ou transportados, retire a tampa perfurável e coloque novas tampas não perfuráveis nos tubos de espécimes de urina. Se os espécimes tiverem de ser transportados para a realização de testes noutras instalações, as temperaturas recomendadas deverão ser mantidas. **Evite salpicos e contaminação cruzada.**

Nota: Os espécimes têm de ser transportados de acordo com os regulamentos de transporte nacionais e internacionais em vigor.

Procedimento de teste

A. Preparação da área de trabalho

1. Ajuste um banho de água para $62\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ para pré-amplificação, um segundo banho de água para $42\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ para amplificação e um terceiro banho de água para $62\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ para pós-amplificação. Assegure-se de que os banhos de água contêm água suficiente (consulte *Notas sobre o procedimento*). Se utilizar o SB100 Banho de calor seco/misturador vortéx, consulte a *Ficha de aplicações do SB100 Banho de calor seco/misturador vortéx para o ensaio PROGENSA PCA3* (ficha de aplicações SB100).
2. Antes de iniciar o ensaio, limpe as superfícies de trabalho e os pipetadores com solução de hipoclorito de sódio de 2,5% a 3,5% (0,35 M a 0,5 M). Deixe a solução de hipoclorito de sódio entrar em contacto com as superfícies e os pipetadores durante pelo menos 1 minuto e depois enxágue com água. Não deixe secar a solução de hipoclorito de sódio. Cubra a superfície da bancada em que será executado o teste com capas absorventes para bancadas de laboratórios com forro plástico.
3. Coloque um número suficiente de Cassetes de Dez Pontas no Sistema de Captura do Alvo (Target Capture System, TCS). Assegure-se de que o frasco de lavagem do TCS está cheio com solução de lavagem e que o aspirador está ligado à bomba de vácuo. (Consulte o *Manual do operador do sistema de Captura do Alvo*.)

B. Reconstituição e preparação do reagente

A reconstituição dos reagentes deve ser feita antes de se iniciar a transferência de espécimes.

1. Para reconstituir os Reagentes de Amplificação, Enzimático e de Sonda, combine os frascos do reagente liofilizado com a solução de reconstituição. Se estiverem refrigeradas, deixe que as soluções de reconstituição alcancem a temperatura ambiente antes de serem utilizadas.

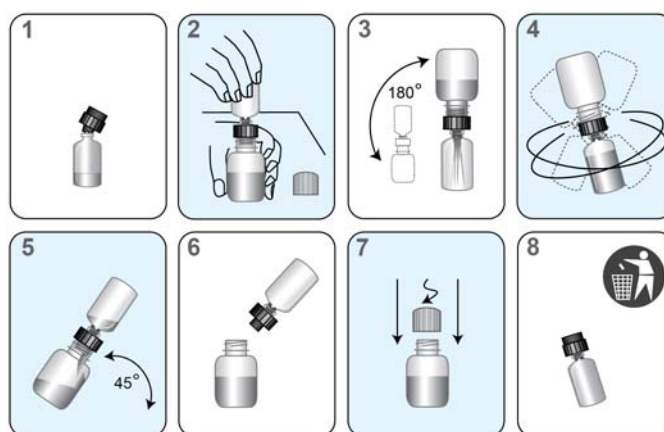


Figura 2. Processo de reconstituição

- a. Associe a solução de reconstituição adequada com o respectivo reagente desidratado. Verifique se os frascos têm cores de etiqueta correspondentes para assegurar que estão adequadamente associados.
- b. Abra o frasco do reagente liofilizado e insira bem a extremidade com entalhe do colarinho de reconstituição na abertura do frasco (Figura 2, Passo 1).

- c. Abra a solução de reconstituição correspondente e coloque a tampa sobre uma superfície de trabalho limpa e coberta. Segurando o frasco de solução na bancada, insira firmemente a outra extremidade do colarinho de reconstituição na abertura do frasco (Figura 2, Passo 2).
 - d. Inverta suavemente os frascos montados. Deixe a solução vaziar do frasco para o frasco de vidro (Figura 2, Passo 3). Aguarde que o reagente liofilizado passe para dentro da solução e, em seguida, agite suavemente a solução dentro do frasco de vidro para misturar. Evite criar espuma quando rodar o frasco (Figura 2, Passo 4).
 - e. Inverta o conjunto e incline-o num ângulo de 45° para minimizar a espuma (Figura 2, Passo 5). Deixe o líquido vaziar todo de novo para o frasco de plástico.
 - f. Retire o colarinho de reconstituição e o frasco de vidro (Figura 2, Passo 6).
 - g. Volte a tapar o frasco de plástico (Figura 2, Passo 7). Anote as iniciais do operador e a data de reconstituição em todos os frascos de reagente reconstituídos. Certifique-se de que regista o analito (PCA3 ou PSA) nos frascos de reagente de sonda.
 - h. Deite fora o colarinho de reconstituição e o frasco de vidro (Figura 2, Passo 8).
2. Os reagentes de sonda, de amplificação e enzimático previamente reconstituídos têm de alcançar a temperatura ambiente (15 °C a 30 °C) antes do início do ensaio. Consulte *Requisitos de armazenamento e manuseamento dos reagentes* se quiser juntar reagentes residuais. Se o reagente de amplificação reconstituído contiver precipitado que não retorna a solução à temperatura ambiente, aqueça a 62 °C ± 1 °C durante 1 ou 2 minutos na área de pré-amplificação. Se o reagente de sonda reconstituído contiver precipitado que não retorna a solução à temperatura ambiente, aqueça a 62 °C ± 1 °C durante 1 ou 2 minutos na área de pós-amplificação. Após estes passos de aquecimento, os reagentes reconstituídos podem ser usados mesmo que se mantenha precipitado residual. Após ressuspensão, misture os frascos invertendo suavemente.

C. Configuração do suporte

O pipetador de repetição utilizado na captura do alvo, transferência de espécimes e amplificação deve ser dedicado apenas a estes passos (consulte *Advertências e precauções*).

1. Configure um suporte para o analito PCA3 e outro para o analito PSA.
Nota: Se o número de espécimes for suficientemente baixo, ambos os analitos podem ser testados num único suporte. Se utilizar o instrumento TECAN Freedom EVO 100/4, devem ser mantidos suportes separados para cada analito. Não podem ser testados em simultâneo mais de dois suportes cheios (com 20 TTU).
2. Nos suportes de unidades de dez tubos (TTU) coloque TTUs suficientes para acomodar os calibradores, controlos e espécimes para cada analito.
3. Etiquete os TTU com a ID da amostra/especímenes. A Tabela 3 descreve a adição dos calibradores, controlos e espécimes. Inicie os calibradores de PSA numa nova TTU.

Nota: Os calibradores devem ser testados em três replicados e os controlos em dois replicados cada, devendo ser testados no mesmo suporte como espécimes. Os espécimes devem ser testados em duplicado. Não deixe tubos de reação vazios entre calibradores, controlos e espécimes. Se estiver a usar o instrumento TECAN Freedom EVO 100/4, consulte a Ficha de aplicações do TECAN Freedom EVO 100/4 para o ensaio PROGENSA PCA3 (ficha de aplicações do TECAN Freedom EVO) para obter mais instruções.

Tabela 3: Exemplo de configuração do suporte

Suporte Posição	Amostra Descrição	*Concentração do PCA3 alvo (cópias/ml)	*Concentração de PSA alvo (cópias/ml)
1 a 3	Calibrador 1	0	0
4 a 6	Calibrador 2	250	7500
7 a 9	Calibrador 3	2500	75.000
10 a 12	Calibrador 4	25.000	750.000
13 a 15	Calibrador 5	125.000	3.000.000
16 a 17	Controlo A	1250	37.500
18 a 19	Controlo B	62.500	1.500.000
20 para n	Espécimen	Desconhecido	Desconhecido

*Aos calibradores e controlos positivos para PCA3 e PSA são atribuídos valores, logo os valores reais de cópias/ml para os calibradores 2 a 5 e para os controlos A e B serão ligeiramente diferentes das concentrações alvo indicadas na tabela, variando de lote para lote. A informação sobre as concentrações é fornecida num cartão na embalagem dos frascos de calibrador e de controlo e é usada para calibragem e determinação da validade do processamento do teste.

D. Verificação da informação de concentração

Verifique junto do administrador do sistema do software para o ensaio PROGENSA PCA3 se foi introduzida a informação sobre concentração para os lotes de kits de calibradores e controlos PROGENSA PCA3 e PSA testados. Para mais informações, consulte o *Guia de referência rápida para o ensaio PROGENSA PCA3 (Guia de referência rápida)* ou o *Manual do administrador do sistema do software para o ensaio PROGENSA PCA3*.

Nota: A introdução da informação sobre concentração é necessária **antes da primeira utilização** de cada novo lote de kit de calibradores e controlos. Os testes seguintes que utilizarem calibradores e controlos do mesmo lote de kit não necessitam que seja realizada qualquer outra acção.

E. Configuração do Worklist Editor

Gere uma lista de trabalho de processamento de ensaio utilizando o GEN-PROBE Worklist Editor num computador localizado na área de pré-amplificação. Para utilizar o Worklist Editor, consulte o *Guia de referência rápida* ou o *Manual do operador do GEN-PROBE Worklist Editor*. Se utilizar o instrumento TECAN Freedom EVO 100/4, consulte também a *Ficha de aplicações do TECAN Freedom EVO* para mais instruções.

F. Preparação de Amostra

1. Deixe que os calibradores e controlos alcancem a temperatura ambiente antes do teste. Misture os frascos por meio de inversão suave.
2. Deixe que os espécimes alcancem a temperatura ambiente antes do teste. **Não agite os espécimes no misturador vórtex.** Os espécimes deverão ser misturados, por inversão suave e ocasional, durante o período de aquecimento. Consulte as *Notas sobre o procedimento* para obter informações sobre o precipitado que não voltará para a solução e sobre o manuseamento de espécimes congelados.

G. Pré-amplificação

O ambiente de pré-amplificação deve estar entre os 15 °C e os 30 °C. Teste ambos os suportes em paralelo. Se utilizar o SB100 Banho de calor seco/misturador vórtex,

consulte a *Ficha de aplicações SB100*. Se utilizar o instrumento TECAN Freedom EVO 100/4, consulte também a *Ficha de aplicações do TECAN Freedom EVO* para mais instruções.

1. Misture bem por agitação ou inversão o reagente de captura do alvo (TCR). Utilizando o pipetador de repetição, adicione 100 µl de TCR específico de analito ao tubo de reacção adequado.
2. Perfure a tampa do frasco de calibrador com o micropipetador e adicione 400 µl do calibrador ao tubo de reacção etiquetado correctamente. Utilizando a mesma ponta de pipeta, retire adições de replicado do frasco através da tampa perfurada. Utilize novas pontas de pipeta para cada frasco de calibrador. Repita para a adição de controlos e espécimes. Cubra e guarde qualquer resto de espécimen e armazene-o a uma temperatura igual ou inferior a 8 °C (consulte *Colheita, transporte e armazenamento de espécimes* para mais informações) para o caso de serem necessários novos testes.
3. Cubra as TTU com o cratão de selagem e agite ligeiramente o suporte à mão. **Não utilize o misturador vórtex.** Incube o suporte a 62 °C ± 1 °C num banho de água durante 30 ± 5 minutos.
4. Retire o suporte do banho de água e seque a parte inferior dos tubos com material absorvente.
5. Assegure-se de que os cartões de selagem estão bem colocados. Se necessário, substitua com novos cartões de selagem e sele bem as TTU.
6. Leve o suporte ao misturador vórtex durante 60 segundos no misturador vórtex multitubos (consulte *Notas sobre o procedimento*). Inicie o procedimento de mistura no misturador vórtex num período de 2 minutos após remoção do suporte do banho de água.
7. Sem remover os cartões de selagem, incube o suporte à temperatura ambiente durante 30 ± 5 minutos.
8. Coloque o suporte com a aba frontal virada para a frente na base magnética TCS durante 5 a 10 minutos. Carregue o suporte de TTC com TTCs.
9. Prepare as linhas da bomba da estação de fornecimento bombeando a solução de lavagem através do distribuidor. Bombeie líquido suficiente pelo sistema para que não existam bolhas de ar na linha e todos os dez bicos forneçam um fluxo de líquido constante.
10. Ligue a bomba de vácuo e desligue o distribuidor de aspiração no primeiro conector entre o distribuidor de aspiração e o frasco colector. Certifique-se de que o vacuómetro cumpre a especificação do teste de fuga. Pode demorar 15 segundos a alcançar esta leitura. Volte a ligar o distribuidor e assegure-se de que o manómetro de vácuo cumpre as especificações do nível de vácuo. Deixe a bomba de vácuo ligada até que todos os passos da captura do alvo estejam concluídos e o tubo do distribuidor de aspiração esteja seco.

Consulte a ficha de especificações de vácuo do sistema de captura do alvo localizada na parte posterior do *Manual do operador do sistema de captura do alvo* ou contacte o Suporte Técnico da Gen-Probe para mais informações.
11. Fixe bem o tubo de aspiração no primeiro conjunto de pontas. Faça baixar as pontas para dentro da primeira TTU até que as pontas entrem em contacto com o topo do líquido. Mantenha o contacto das pontas com o topo do líquido à medida que as pontas se movem para baixo, até que estas entrem em contacto breve com o fundo dos tubos. Bata suavemente com as pontas contra o fundo

dos tubos até que todo o líquido restante seja removido. Não deixe que as pontas mantenham um contacto prolongado com o fundo dos tubos nem bata rapidamente as pontas, pois pode criar-se espuma excessiva na apreensão de vácuo.

12. Terminada a aspiração, ejecte as pontas para a respectiva cassette de pontas original. Repita os passos da aspiração para as TTU restantes, utilizando uma ponta dedicada para cada tubo de reacção.
13. Coloque o distribuidor sobre cada TTU e, utilizando a bomba da estação de fornecimento, forneça 1,0 ml de solução de lavagem a cada tubo da TTU.
14. Cubra os tubos com um cartão de selagem e retire o suporte do TCS. Coloque uma vez no misturador vórtex de multitubos. Consulte as *Notas sobre o procedimento* para obter mais informações.
15. Coloque o suporte na base magnética do TCS durante 5 a 10 minutos.
16. Aspire todo o líquido tal como nos Passos 11 e 12.
17. Após a aspiração final, retire o suporte da base do TCS e inspeccione visualmente os tubos para assegurar que todo o líquido foi aspirado e que todos os tubos contêm grânulos de partículas magnéticas. Se for visível qualquer líquido, coloque o suporte de novo na base do TCS durante 2 minutos e repita a aspiração para essa TTU utilizando as mesmas pontas utilizadas anteriormente para cada tubo de reacção. Se for visível QUALQUER grânulo de partícula magnética após ter terminado a aspiração, o tubo pode ser aceite. Se não for visível qualquer grânulo, o espécimen deve ser testado novamente. Se o mesmo espécimen não contiver um grânulo de partícula magnética neste passo num teste posterior, isto poderá ser indicação de que existe um problema específico do espécimen. Nesta situação, recomenda-se uma nova colheita de espécimen de urina.

H. Amplificação

Nota: A adição de enzima a um suporte de reacção (Passos 6 e 7 abaixo) deve ser executada em 90 segundos ou menos.

Execute os Passos 6 e 7 num suporte antes de repetir os procedimentos no segundo suporte. Se utilizar o SB100 Banho de calor seco/misturador vórtex, consulte a *Ficha de aplicações SB100*. Se utilizar o instrumento TECAN Freedom EVO 100/4, consulte também a *Ficha de aplicações do TECAN Freedom EVO* para mais instruções.

1. Utilizando o pipetador de repetição, adicione 75 µl do reagente de amplificação específico de cada analito reconstituído a cada tubo de reacção. Todas as misturas de reacção no suporte deverão estar vermelhas.
2. Utilizando o pipetador de repetição, adicione 200 µl de Reagente de Óleo.
3. Cubra os tubos com um cartão de selagem e leve ao misturador vórtex multitubos.
4. Incube o suporte no banho de água de pré-amplificação a $62\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 ± 5 minutos.
5. Transfira o suporte para um banho de água a $42\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 ± 2 minutos.
6. Com o suporte no banho de água, remova cuidadosamente o cartão de selagem e, utilizando o pipetador de repetição, adicione 25 µl do reagente enzimático reconstituído a cada uma das misturas de reacção. Todas as reacções deverão agora ter a cor laranja.

7. Cubra imediatamente os tubos com um cartão de selagem novo, retire-os do banho de água e misture rapidamente as reacções agitando suavemente o suporte manualmente.

Nota: *Minimize o tempo que o suporte está fora do banho para evitar que os tubos arrefeçam.*

8. Incube o suporte a $42\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 60 ± 5 minutos.

I. Pós-amplificação

O pipetador de repetição usado na hibridação e selecção deverá ser aplicado apenas a estes passos (consulte *Advertências e precauções*). O ambiente de pós-amplificação, incluindo detecção, deve situar-se entre $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se utilizar o SB100 Banho seco/Misturador vórtex, consulte a *Ficha de aplicações SB100*.

1. Hibridação

- a. Retire o suporte do banho de água de pré-amplificação e transfira para a área de pós-amplificação. Adicione $100\text{ }\mu\text{l}$ do reagente de sonda específico do analito reconstituído, utilizando o pipetador de repetição. Todas as misturas de reacção deverão estar agora de cor amarela.
- b. Cubra os tubos com um cartão selante e leve ao misturador vórtex durante 10 segundos, ou até a cor estar uniforme, no misturador vórtex de multitubos.
- c. Incube o suporte num banho de água de $62\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 ± 5 minutos.
- d. Retire o suporte do banho de água e faça a incubação à temperatura ambiente durante 5 ± 1 minutos.

2. Selection

- a. Utilizando o pipetador de repetição, adicione $250\text{ }\mu\text{l}$ do reagente de selecção a cada tubo de reacção. Todas as reacções deverão agora ter a cor rosa.
- b. Cubra os tubos com um cartão de selagem, leve ao vórtex durante 10 segundos ou até a cor ficar uniforme, e faça a incubação do suporte num banho de água a $62\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 ± 1 minutos.
- c. Retire o suporte do banho de água. Faça a incubação do suporte à temperatura ambiente durante 15 ± 3 minutos.

J. Detecção

Para utilização do LEADER HC+ Luminómetro consulte o *Manual do operador LEADER HC+ Luminómetro*. Para utilização do software do ensaio PROGENSA PCA3, consulte o *Guia de referência rápida* ou o *Manual do administrador e o Manual do operador do sistema do software do ensaio PROGENSA PCA3*.

1. Prepare o Luminómetro LEADER HC+, colocando uma TTU vazia na posição 1 da cassette e executando o protocolo WASH uma vez.
2. Assegure-se de que há volume suficiente de reagentes Auto Detect 1 e 2 para completar as reacções.
3. Carregue as TTU no luminómetro utilizando o diagrama do luminómetro como orientação. Se quiser testar ambos os analitos (processamento consecutivo), carregue primeiro todas as TTU PCA3, seguidas imediatamente de todas as TTU PSA.
4. Inicie sessão no computador. Clique em **NEW RUN** (Novo processamento de ensaio) e seleccione o protocolo e as concentrações de ensaio adequados. Clique em **NEXT** (Seguinte) para iniciar o processamento.

Nota: O processamento deve ser realizado num período de 2 horas após o final da incubação do passo de selecção a 62 °C.

5. Prepare o fluido de desactivação, misturando volumes iguais de solução de hipoclorito de sódio de 5% a 7% (0,7 M a 1,0 M) e de tampão para fluido de desactivação num recipiente de plástico com tampa grande. Coloque uma etiqueta e escreva a data de validade no recipiente de plástico. O Fluido de Desactivação permanece estável durante 4 semanas à temperatura ambiente.
6. Quando o processamento terminar, o software de ensaio gerará dois relatórios de processamento, um Relatório de teste em bruto e um Relatório de rácio, se os processamentos consecutivos (consulte *Procedimentos de controlo de qualidade e Interpretação dos resultados*).
7. Quando o teste terminar, retire as TTU usadas do luminómetro e coloque as TTU no recipiente com a solução de fluido de desactivação. Deixe as TTU no recipiente durante 15 minutos, antes de as deitar fora. Os métodos de manuseamento e eliminação adequados devem ser estabelecidos pelo director do laboratório.

Notas sobre o procedimento

A. Preparação de Espécimen

1. Se os espécimes contiverem precipitados suspensos, aqueça-os a 37 °C durante até 5 minutos, seguido de inversão suave. No caso de o precipitado não voltar a transformar-se em solução, certifique-se de que o precipitado não impede a distribuição do espécimen.
2. Espécimes congelados devem ser descongelados à temperatura ambiente (15 °C a 30 °C, pode usar um banho de água) com inversão ocasional durante a descongelação para impedir a formação de um tampão insolúvel. Misture os frascos através de inversão suave assim que o gelo dentro do frasco esteja suficientemente descongelado para se soltar e poder mover-se livremente. Continue a aquecer até o espécimen estar completamente descongelado e misture novamente os frascos através de inversão suave.
 - a. Se se formar um tampão e se os espécimes forem pipetados com o instrumento TECAN Freedom EVO 100/4, congele novamente o espécimen, repita as instruções de descongelação e assegure-se de que não se formam tampões. Se for incapaz de eliminar o tampão, o espécimen deve ser pipetado manualmente.
 - b. Se se formar um tampão e os espécimes forem pipetados manualmente com um micro-pipetador, não são necessárias mais medidas, mas assegure-se de que o tampão não impede a distribuição do espécimen.

B. Pipetagem de controlos, calibradores e espécimes

1. O volume de calibrador, controlo ou espécimen adicionado à TTU deverá ser de 400 µl. Recomenda-se a inspecção visual do volume pipetado para a TTU para assegurar uma transferência adequada do volume. É necessário um volume adequado para fornecer resultados exactos.
2. Assegure-se de que a ponta da pipeta está correctamente encaixada no pipetador e verifique se a definição do volume está correcta. Recomenda-se uma verificação visual da definição do volume no final de cada TTU (de 10 em 10 tubos). Liberte lentamente o êmbolo da pipeta a uma velocidade estável quando retirar a amostra, para evitar a geração de espuma e bolhas.

C. Reagentes

1. A solução de reconstituição de sonda pode precipitar durante o armazenamento. Aqueça a solução a $62\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 a 2 minutos. Após este passo de aquecimento, a solução de reconstituição de sonda pode ser usada mesmo que se mantenha precipitado residual. Após a ressuspensão, misture o frasco invertendo-o suavemente.
2. Quando fizer a pipetagem de reagentes não enzimáticos, aponte ligeiramente para o lado da parte inferior do tubo de reacção (onde o fundo se encurva para se encontrar com os lados). Quando fizer a pipetagem do reagente enzimático, aponte directamente para o centro do tubo de reacção. Confirme visualmente que os reagentes estão a ser correctamente fornecidos (sem quantidade excessiva de reagente nos lados dos tubos e uma alteração de cor adequada).

D. Temperatura

1. Os passos de captura do alvo, de amplificação, de hibridação e de selecção dependem da temperatura. Assim, torna-se imperativo que os banhos de água sejam mantidos nos intervalos de temperatura especificados.
2. A temperatura ambiente define-se como uma temperatura entre $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

E. Tempo

As reacções de captura do alvo, da amplificação, da hibridação e da selecção dependem todas do tempo. Aplique os tempos especificados em *Procedimento de teste*.

F. Utilização do misturador vórtex

Um procedimento de mistura no misturador vórtex adequado é importante para um desempenho bem sucedido do ensaio PROGENSA PCA3. Para misturar as reacções no misturador vórtex, defina a velocidade do misturador vórtex multitubos para a posição mais baixa, fixe o suporte e ligue a corrente eléctrica. Aumente a velocidade lentamente até o líquido ir até metade do tubo. Sujeite ao misturador vórtex durante 10 segundos, durante o tempo indicado ou até a cor ficar uniforme. Rode a velocidade para a definição mais baixa antes de desligar o misturador vórtex de multitubos e remover o suporte. As misturas de reacção não devem nunca tocar nos cartões de selagem.

G. Banhos de água

1. O nível de água nos banhos de água deve ser mantido entre 3,8 e 5,0 cm (1,5 a 2,0 pol.) de profundidade, conforme medido desde o tabuleiro metálico de suporte (no fundo do banho de água) até à superfície da água. Assim ficará assegurada uma transferência de calor adequada.
2. Para evitar contaminação cruzada, os banhos de água devem ser dedicados para um passo específico do ensaio.

H. Descontaminação

1. Superfícies e pipetadores

As superfícies das bancadas de laboratório e os pipetadores têm de ser descontaminados regularmente com solução de hipoclorito de sódio de 2,5% a 3,5% (0,35 M a 0,5 M). Deixe a solução de hipoclorito de sódio entrar em contacto com as superfícies durante pelo menos 1 minuto e depois enxagúe com água. **Não deixe secar a solução de hipoclorito de sódio.** As soluções com cloro podem provocar corrosão nos equipamentos e metais. Enxagúe bem o equipamento com água para evitar a corrosão.

2. Distribuidor de Aspiração TCS

Após cada utilização:

- Remova a tubagem distribuidora do caminho.
- Coloque um TTC novo no suporte de TTC. Active a bomba de vácuo. Aplique o distribuidor de aspiração às pontas no TTC. Aspire qualquer solução de lavagem remanescente na cuba de preparação da estação de distribuição.
- Coloque pelo menos 100 ml de solução de hipoclorito de sódio a 0,5% até 0,7% (0,07 M a 0,1 M), ou, se preferir, 2,5% a 3,5% (0,35 M a 0,5 M), na cuba de preparação. Aspire toda a solução com a tubagem distribuidora de aspiração.
- Coloque pelo menos 100 ml de água desionizada na cuba de preparação. Aspire toda a água com a tubagem distribuidora de aspiração.
- Ejecte as pontas no TTC original.
- Deixe a bomba de vácuo ligada até que a tubagem distribuidora esteja seca para evitar o refluxo (aproximadamente 3 minutos).
- Descontamine as superfícies do distribuidor de aspiração, como descrito na *Unidade TCS*.

3. Recipiente de resíduos TCS

Limpe o frasco de resíduos pelo menos uma vez por semana ou quando o frasco de resíduos estiver 25% cheio, conforme o que ocorrer primeiro.

- Desligue a bomba de vácuo e permita que a pressão do vácuo seja equalizada.
- Liberte as uniões de desconexão rápida entre o frasco de resíduos e o frasco de recolha de líquido excedentário, e o frasco de resíduos e o distribuidor de aspiração.
- Remova o frasco de resíduos do compartimento de apreensão de vácuo.
- Remova a tampa e adicione cuidadosamente 400 ml de solução de hipoclorito de sódio a 5% até 7% (0,7 M a 1,0 M) ao frasco de resíduos de 4 l.

Nota: Isto pode ser feito numa campânula/estufa de isolamento de vapores para evitar a libertação de vapores no laboratório.

- Tape o frasco de resíduos e faça girar suavemente o conteúdo até que se misture completamente.
- Deixe o frasco de resíduos repousar durante pelo menos 15 minutos e depois descarte o conteúdo (resíduos).
- Enxagúe o frasco de resíduos com água para remover quaisquer resíduos remanescentes no seu interior.
- Tape o frasco de resíduos vazio e coloque-o no compartimento de apreensão de vácuo. Aplique as uniões de desconexão rápida à unidade TCS. Descarte cuidadosamente ambas as luvas.

4. Unidade TCS

Limpe as superfícies da unidade TCS, o distribuidor de aspiração e as pontas de ejeção do tampão de lavagem com toalhetes de papel humedecidos com solução de hipoclorito de sódio de 2,5% a 3,5% (0,35 M a 0,5 M). Siga o passo da solução de hipoclorito de sódio, fazendo uma limpeza com água e, em seguida, seque totalmente as superfícies com toalhetes de papel.

5. Suportes

Mergulhe os suportes em solução de hipoclorito de sódio de 2,5% a 3,5% (0,35 M a 0,5 M), garantindo que ficam cobertos pela solução. Mantenha os suportes mergulhados durante 10 minutos. Uma exposição mais prolongada danifica os suportes. Lave bem os suportes com água e seque bem com toalhetes de papel.

I. Contaminação do ensaio

1. A introdução de materiais contaminantes pode ocorrer se não for tido o cuidado suficiente durante o procedimento de ensaio.
2. As TTU têm de ser descontaminadas no fluido de desactivação, conforme descrito em *Procedimento de teste*. Não volte a utilizar as TTU.
3. Realize uma descontaminação regular do equipamento e das superfícies de trabalho, conforme descrito em *Descontaminação*.
4. Como em qualquer sistema de reagentes, o excesso de pó nalgumas luvas pode causar a contaminação de tubos abertos. Recomenda-se que os operadores utilizem luvas sem pó.

Procedimentos de controlo de qualidade

A. Validade do teste

1. Os calibradores e os controlos devem ser processados com todos os ensaios e no mesmo suporte que os espécimes de teste. Devem ser cumpridos os seguintes critérios para que um teste seja considerado válido:

RLU média do Calibrador 2 > Cutoff RLU

Em que o cutoff das RLU = RLU média do calibrador 1
+ 1,645 desvios-padrão de replicados RLU do calibrador 1
+ 1,645 desvios-padrão de replicados RLU do calibrador 2.

Recuperação média interpolada do Calibrador 5 = $100 \pm 30\%$

Recuperação média interpolada do Controlo A = $100 \pm 60\%$

Recuperação média interpolada do Controlo B = $100 \pm 35\%$

2. O software PCA3 avalia automaticamente os resultados relativamente aos critérios acima e comunicará o estado do teste como PASS (aprovado) se os critérios de validade forem cumpridos e como FAIL (não aprovado) se esses mesmos critérios não forem cumpridos.
3. Se o estado do teste for FAIL (não aprovado), todos os resultados de teste no mesmo processamento são inválidos para esse analito e não devem ser incluídos no relatório.
4. Se um processamento for inválido, deverá ser repetido para esse analito (consulte *Interpretação dos resultados*). Se o processamento for válido para o outro analito, esses resultados podem ser usados em análise de dados com o processamento válido repetido do primeiro analito.

B. Validade do espécimen

Num processamento válido, os resultados de cada espécimen podem ser considerados INVALID (inválido) e serão indicados no Relatório de teste em bruto (consulte *Interpretação dos resultados*). Embora os replicados individuais para um espécimen possam ser válidos, um espécimen será invalidado se a diferença de c/ml interpolada entre os replicados exceder 600%. Os testes do espécimen para esse analito devem ser repetidos.

Interpretação dos resultados

A. Tipos de relatórios

1. Relatório de teste em bruto

O Relatório de teste em bruto fornece informação sobre a validade do processamento (PASS (aprovado) ou FAIL (não aprovado); consulte *Procedimentos de controlo de qualidade*) e sobre os tubos de reacção individuais testados com o ensaio PROGENSA PCA3. Se um teste for inválido (FAIL (não aprovado)), todos os tubos desse teste serão etiquetados como inválidos. No entanto, os tubos individuais podem ser considerados inválidos dentro de um teste válido (PASS (aprovado)). Para testes consecutivos (ou seja, ambos os analitos PCA3 e PSA são testados do mesmo processamento), um teste de analito pode ser inválido enquanto o outro teste de analito é válido.

O resumo de excepções encontra-se no fim do Relatório de teste em bruto. Para testes consecutivos onde ambos os testes de analitos foram válidos, os espécimes listados no Resumo de excepções podem necessitar de ser novamente testados relativamente a um analito. Embora possa ser indicado no resumo de excepções um resultado de PCA3 Score, este resultado só será considerado no relatório se tiver sido efectuada correspondência manual e o resultado for indicado num Relatório de rácio. Se tiver sido testado só um analito ou se um processamento de analito foi inválido, todos os espécimes testados serão indicados no Resumo de excepções.

2. Relatório de rácio

O software de ensaio gera automaticamente um Relatório de rácio para um teste consecutivo em que ambos os processamentos de analito são válidos. O software calcula e indica o PCA3 Score dos espécimes no Relatório de rácio. Os espécimes indicados no Relatório de rácio não necessitam de qualquer outro teste ou ambos os analitos têm de ser novamente testados. Os espécimes não indicados no Relatório de rácio serão encontrados na secção de Resumo de excepções do Relatório de teste em bruto.

Pode também ser gerado um Relatório de rácio após uma correspondência manual (consulte *Correspondência manual* para obter mais informações).

3. Relatório de CQ

O relatório de CQ indica critérios de validade do processamento do ensaio, concentrações atribuídas e interpoladas e recuperações de calibradores e controlos. O relatório indica também os parâmetros que definem a curva de calibragem de resposta de dose logística de quatro parâmetros (3). Para mais informações, consulte o *Manual do operador do software do ensaio PROGENSA PCA3*.

B. Correspondência

1. Correspondência automática

Nos processamentos consecutivos em que ambos os testes de analito são válidos, o software faz a correspondência automática dos resultados individuais do analito PCA3 e PSA para os espécimes e determina o PCA3 Score (se for possível de calcular). Os resultados são indicados no relatório de rácio ou no Resumo de excepções do relatório de teste em bruto.

2. Correspondência manual

Quando os analitos de PCA3 e PSA são testados em testes diferentes, o software não consegue determinar automaticamente o PCA3 Score. A correspondência manual dos resultados do analito é necessária para determinar o PCA3 Score ou o intervalo do PCA3 Score (consulte o *Guia de referência rápida* ou o *Manual do operador do software do ensaio PROGENSA PCA3*). A correspondência manual pode ser necessária também para resultados que são indicados no resumo de exceções do relatório de teste em bruto. Após a correspondência manual, os PCA3 Scores para os espécimes de correspondência serão indicados num novo relatório de rácio.

C. Interpretação de resultados

1. PCA3 Score

Nota: São comunicados apenas os PCA3 Scores e intervalos de PCA3 Scores indicados no relatório de rácio. Os resultados que aparecem no resumo de exceções podem requerer acção adicional e não são comunicados.

O PCA3 Score é calculado como o rácio de cópias de RNA de PCA3 para cópias de RNA de PSA, multiplicado por 1000. Os PCA3 Scores só podem ser calculados utilizando resultados de processamentos e espécimes válidos. Os processamentos e espécimes inválidos devem ser testados novamente para esse analito (consulte *Realização de novo teste* para mais informações).

Se o PCA3 Score comunicado estiver abaixo do cutoff, o resultado deverá ser interpretado como NEGATIVE (Negativo). Se o PCA3 Score estiver acima ou for igual ao cutoff, o resultado deverá ser interpretado como POSITIVE (Positivo). O director do laboratório estabelecerá o cutoff (consulte *Características do desempenho* para obter mais informações).

Em algumas condições, é fornecido um intervalo de PCA3 Score ($>[\text{PCA3 Score calculado}]$ ou $<[\text{Score calculado}]$). Se o $<[\text{PCA3 Score calculado}]$ estiver abaixo do cutoff, o resultado deverá ser interpretado como NEGATIVE (Negativo). Se o $>[\text{PCA3 Score calculado}]$ estiver acima do cutoff, o resultado deverá ser interpretado como POSITIVE (Positivo). Se for necessário um valor numérico, a diluição do espécimen e um novo teste poderão gerar um PCA3 Score em vez de um intervalo de PCA3 Score (consulte *Realização de novo teste - Diluição de espécimes fora do intervalo, alto*).

2. Interpretar os códigos de estado e análise

A coluna Estado do Relatório de teste em bruto e no Relatório de rácio fornece informação no formato "s:a". Os códigos de estado específicos do teste ("s") são indicados antes (à esquerda) dos dois pontos e os códigos de análise específicos do analito ("a") são indicados após (à direita) os dois pontos. Os códigos específicos do analito são indicados em letra minúscula para os resultados PCA3 e em letra maiúscula para os resultados PSA. Cada relatório contém descrições dos códigos de estado e análise que aparecem nesse relatório. Por exemplo, os códigos poderão indicar se um resultado de espécimen ou replicado é válido ou está fora do intervalo. Consulte o *Guia de referência rápida* ou o *Manual do operador do software do ensaio PROGENSA PCA3* para uma lista completa dos códigos de estado e análise e mais informações.

Se for apresentado um PCA3 Score no relatório de rácio e não aparecer nenhum código de estado ou análise nas colunas Status (Estado) de PCA3 ou PSA, isto indica que ambos os analitos tiveram resultados válidos e dentro do intervalo. O resultado do espécimen pode ser apresentado e não são necessárias outras acções.

Se aparecer um código de estado ou análise no relatório resumido de excepções ou no relatório de rácio, poderá ser necessário um novo teste (consulte *Interpretar os resultados no resumo de excepções* e *Interpretar resultados no relatório de rácio*). Se os resultados de analito forem provenientes de testes separados e possuírem um(ns) código(s) de análise, procure a combinação para ambos os analitos na Tabela 4 ou Tabela 5 para determinar se são necessárias outras acções.

Nota: A presença de um código de estado ou análise não significa automaticamente que é necessário um novo teste.

3. Interpretar os resultados no resumo de excepções

O resumo de excepções poderá não indicar quaisquer excepções. Nestes casos, não são necessárias quaisquer outras acções.

Se o resumo de excepções indicar um espécimen ou espécimenes para processamentos consecutivos em que ambos os testes de analitos são válidos, consulte a Tabela 4 para mais instruções.

Para testes de analito individual, consulte *Interpretar os códigos de estado e análise*. Em processamentos consecutivos em que um teste de analito é inválido, volte a testar o processamento inválido (consulte *Realização de novo teste* para mais informações), e trate os resultados como se tivessem sido realizados processamentos de analito individuais. Será necessária a correspondência manual.

Um espécimen poderá ser etiquetado como inválido embora os tubos individuais (replicados) possam ser etiquetados como válidos. É o resultado combinado dos replicados que determina a validade do espécimen, e uma grande diferença entre replicados invalidará um espécimen (consulte *Procedimentos de controlo de qualidade* para mais informações).

Tabela 4: Condições do resumo de excepções do ensaio PROGENSA PCA3

Resultado PCA3 (Código de análise*)	Resultado PSA (Código de análise*)	PCA3 Score listado	Outro teste?	Acção/comentário
Dentro do intervalo (sem código)	Inválida** (A, B, E, H ou I)	--	Sim	Testar PSA de novo (consulte <i>Realização de novo teste</i>) e faça a correspondência manual de resultados.
Fora de intervalo, baixo (g)	Inválida (A, B, E, H ou I)	--	Sim	Testar PSA de novo (consulte <i>Realização de novo teste</i>) e faça a correspondência manual de resultados.
Inválida (a, b, e, h ou i)	Dentro do intervalo (sem código)	--	Sim	Testar PCA3 de novo (consulte <i>Realização de novo teste</i>) e correspondência manual de resultados.
Dentro do intervalo (sem código)	Fora de intervalo, alto (F)	<[PCA3 Score calculado]***	Opcional	1. Corresponder manualmente para obter <[PCA3 Score calculado] OU 2. Dilua o espécimen em diluente de espécimen (consulte <i>Diluição de espécimenes fora do intervalo, alto</i>), volte a testar o PSA e faça a correspondência manual dos resultados se for necessário um PCA3 Score.
Fora de intervalo, alto (f)	Dentro do intervalo (sem código)	>[PCA3 Score calculado]	Opcional	1. Corresponder manualmente para obter >[PCA3 Score calculado] OU 2. Dilua o espécimen em diluente de espécimen, volte a testar o PCA3 e faça a correspondência manual dos resultados se for necessário um PCA3 Score.

Tabela 4: Condições do resumo de exceções do ensaio PROGENSA PCA3 (continuação)

Fora de intervalo, baixo (g)	Dentro do intervalo (sem código)	<[PCA3 Score calculado]	Não	Corresponder manualmente para obter <[PCA3 Score calculado].
Fora de intervalo, baixo (g)	Fora de intervalo, alto (F)	<[PCA3 Score calculado]	Não	Corresponder manualmente para obter <[PCA3 Score calculado].

*Consulte o *Manual do Operador do software do Ensaio PROGENSA PCA3* para obter uma lista completa dos códigos de análise.

**Aplica-se apenas a espécimes inválidos num processamento válido.

***Para valores fora do intervalo, o PCA3 Score calculado é determinado utilizando o nível de cópia para o calibrador positivo mais próximo.

4. Interpretar resultados no relatório de rácio

Se um espécimen for indicado no relatório de rácio com um PCA3 Score, o resultado é um PCA3 Score comunicável, não sendo necessárias quaisquer outras acções. Se não for indicado um PCA3 Score, expresso como "--" na coluna de PCA3 Score, consulte a Tabela 5 para obter instruções.

Tabela 5: Condições de relatório de rácio do ensaio PROGENSA PCA3

Resultado PCA3 (Código de análise*)	Resultado PSA (Código de análise*)	PCA3 Score listado	Outro teste?	Acção/comentário
Dentro do intervalo (sem código)	Dentro do intervalo (sem código)	PCA3 Score	Não	Mais nenhuma acção; o resultado pode ser apresentado.
Inválida** (a, b, e, h ou i)	Inválida (A, B, E, H ou I)	--	Sim	Teste novamente ambos os analitos (consulte <i>Realização de novo teste</i>).
Inválida (a, b, e, h ou i)	Fora de intervalo, alto (F)	--	Sim	Dilua o espécimen em diluente de espécimen (consulte <i>Diluição de espécimes fora do intervalo, alto</i>), teste novamente ambos os analitos.
Fora de intervalo, alto (f)	Inválida (A, B, E, H ou I)	--	Sim	Dilua o espécimen em diluente de espécimen, teste novamente ambos os analitos.
Fora de intervalo, alto (f)	Fora de intervalo, alto (F)	--	Sim	Dilua o espécimen em diluente de espécimen, teste novamente ambos os analitos.
Inválida (a, b, e, h ou i)	Fora de intervalo, baixo (G)	--	Não	A amostra não tem RNA suficiente para uma análise precisa. Deve ser colhido um novo espécimen do paciente.
Dentro do intervalo (sem código)	Fora de intervalo, baixo (G)	--	Não	A amostra não tem RNA suficiente para uma análise precisa. Deve ser colhido um novo espécimen do paciente.
Fora de intervalo, alto (f)	Fora de intervalo, baixo (G)	--	Não	A amostra não tem RNA suficiente para uma análise precisa. Deve ser colhido um novo espécimen do paciente.
Fora de intervalo, baixo (g)	Fora de intervalo, baixo (G)	--	Não	A amostra não tem RNA suficiente para uma análise precisa. Deve ser colhido um novo espécimen do paciente.

*Consulte o *Manual do Operador do software do Ensaio PROGENSA PCA3* para obter uma lista completa dos códigos de análise.

**Aplica-se apenas a espécimes inválidos num processamento válido. Se os espécimes eram inválidos porque o processamento foi inválido, os resultados serão indicados no resumo de exceções (consulte *Interpretar os resultados no resumo de exceções* para mais informações).

D. Realização de novo teste

1. Linhas de orientação para realização de novo teste

- a. Embora não seja obrigatório que ambos os analitos sejam testados no mesmo processamento, **os resultados de ambos os analitos devem ser provenientes do mesmo frasco de amostra para um PCA3 Score comunicável.**
- b. Todos os processamentos inválidos devem ser repetidos e todos os espécimes inválidos de processamentos válidos devem ser testados novamente.
- c. Volte a testar o(s) espécime(s) utilizando um novo conjunto de calibradores e controlos.
- d. Um armazenamento adequado do espécimen residual antes do novo teste é essencial (consulte *Colheita, transporte e armazenamento de espécimes* para mais informações).
- e. Poderá ser necessária uma correspondência manual dos analitos PCA3 e PSA para determinar o PCA3 Score (consulte *Correspondência manual* para mais informações).

2. Diluição de espécimes fora do intervalo, alto

- a. Se a concentração de um espécimen ultrapassa o Calibrador 5 num processamento válido, o resultado é “fora do intervalo, alto” e o resultado será etiquetado com um código de análise “f” ou “F” nos relatórios de teste. A concentração será expressa como >[concentração do Calibrador 5].
- b. Inverta o espécimen de urina processado para misturá-lo antes da diluição do mesmo. Uma diluição recomendada, mas não obrigatória, é 1:10 utilizando o kit de diluente de espécimen PROGENSA PCA3. Adicione 1800 µl de diluente de espécimen e 200 µl de espécimen a um frasco adequado; tape o tubo e inverta cinco vezes para misturar totalmente. O factor de diluição será de “10” na lista de trabalho de processamentos. Se ambos os analitos forem testados novamente, duplique os volumes (use 3600 µl de diluente de espécimen e 400 µl de espécimen). Consulte o folheto da embalagem do kit de diluente de espécimen PROGENSA PCA3. Teste o espécimen diluído com o ensaio.
- c. Se, após novo teste, o resultado do espécimen for novamente fora do intervalo, alto, é necessária outra diluição até o resultado do espécimen ficar interpolado dentro do intervalo dos calibradores. É permitida outra diluição da diluição inicial de 1:10 desde que a diluição inicial 1:10 tenha sido armazenada adequadamente (consulte *Colheita, transporte e armazenamento de espécimes* para mais informações).

Limitações

- A. O ensaio PROGENSA PCA3 não deve ser usado em pacientes que tomam medicação que afecta os níveis de PSA no soro tal como a finasterida (Proscar, Propecia), dutasterida (Avodart) e a terapia de antiandrogénios (Lupron). O efeito destes medicamentos sobre a expressão do gene PCA3 ainda não foi avaliado.
- B. Determinados procedimentos terapêuticos e de diagnóstico tal como a prostatectomia, a radiação, a biopsia da próstata e outros podem afectar a viabilidade do tecido prostático e, subsequentemente, exercer algum impacto sobre o PCA3 Score. O efeito destes procedimentos sobre o desempenho do ensaio ainda não foi avaliado. Devem ser colhidas amostras para teste de PCA3 quando o médico achar que o tecido da próstata já está recuperado.
- C. A utilização do ensaio PROGENSA PCA3 é limitada ao pessoal que tenha recebido formação sobre o procedimento. O não cumprimento das instruções constantes deste folheto poderá originar resultados erróneos.
- D. Cada laboratório deverá validar de forma independente um processo de transferência LIS.
- E. A obtenção de resultados fiáveis depende de uma colheita adequada do espécimen de urina. Uma vez que o sistema de transporte utilizado para o ensaio PROGENSA PCA3 não permite uma avaliação microscópica da adequação do espécimen de urina, é necessária a formação dos médicos nas técnicas adequadas de colheita do espécimen de urina. Consulte *Colheita, transporte e armazenamento de espécímenes*. Para obter informações detalhadas, consulte o folheto da embalagem fornecido no kit de transporte do espécimen de urina PROGENSA PCA3.
- F. Os resultados do ensaio PROGENSA PCA3 devem ser interpretados em conjunto com outros dados laboratoriais e clínicos que o médico disponha. (Os resultados de teste podem ser afectados por uma colheita inadequada do espécimen, erro técnico ou troca de espécímenes.)

Características do desempenho

A. Resultados clínicos

1. Sensibilidade e especificidade do diagnóstico

As características de desempenho para o ensaio PROGENSA PCA3 foram determinadas utilizando espécimes de indivíduos utentes em quatro instalações clínicas geograficamente diversas da América do Norte. A população em questão era constituída por 529 homens com biopsia à próstata já programada. Os dados demográficos respectivos são indicados em seguida:

- Idade média $\pm$ DP = 64 ± 8 anos (média 63, intervalo 32 a 89)
- Nível médio de PSA do soro = $7,9 \pm 21,9$ $\mu\text{g/l}$ (5,6, 0,3 a 484)
- Volume médio da próstata (determinado por ultra-som transrectal) = 44 ± 25 cm^3 (39, 5 a 225)
- 34% (180/529) biopsia positiva para cancro da próstata

A Figura 3 mostra a correlação do PCA3 Score com a probabilidade de biopsia positiva. À medida que o PCA3 Score aumentava, a ocorrência de biopsia positiva para cancro nos indivíduos aumentava.

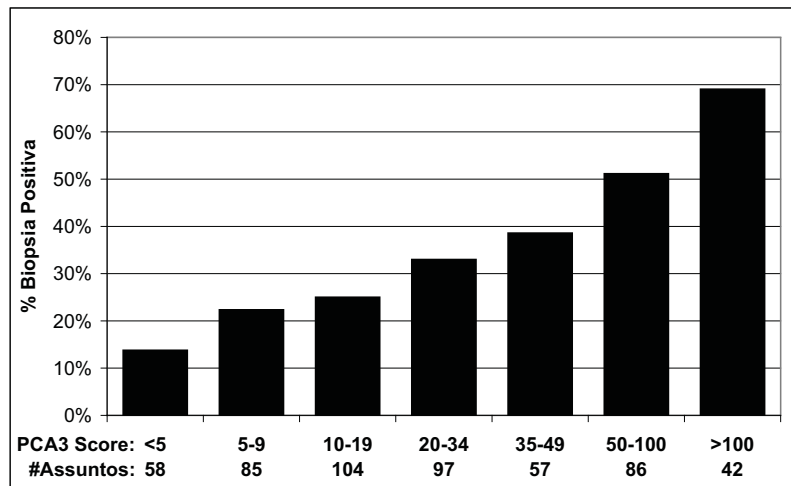


Figura 3. Correlação de PCA3 Score com probabilidade de biopsia positiva

Foi efectuada uma análise ROC (Receiver operating characteristic), utilizando a biopsia da próstata como método de referência, de acordo com o documento GP10-A do Instituto CLSI (1995) (4). Para o ensaio PROGENSA PCA3, a área sob a curva (AUC) foi de 0,685 (intervalo de confiança de 95% = 0,637 a 0,733). A Tabela 6 mostra a sensibilidade e a especificidade de diagnóstico com valores de cutoff de PCA3 Score diferentes. Cada laboratório deverá determinar o cutoff para a sensibilidade e especificidade do diagnóstico (consulte *Interpretação dos resultados*).

Tabela 6: Sensibilidade e especificidade de diagnóstico do ensaio PROGENSA PCA3 com cutoffs de PCA3 Score diferentes

Cutoff do PCA3 Score	5	10	15	25	35	50	95
Sensibilidade	96%	85%	77%	63%	53%	41%	17%
Especificidade	14%	33%	47%	61%	74%	84%	95%

2. Estudos de estabilidade do espécimen

- a. Estabilidade em urina total: Foi colhida a primeira urina de 10 indivíduos e armazenada entre 2 °C e 8 °C ou a 30 °C antes do processamento através da adição ao meio de transporte da urina (UTM). Entre 2 °C e 8 °C, foi observada uma degradação significativa de RNA de PCA3 e PSA em alguns espécimes após 4 horas. Assim, a urina total deve ser processada num período de 4 horas. A 30 °C, foi observada uma degradação significativa em menos de 1 hora. Logo, a urina total deve estar sempre refrigerada ou mantida em gelo antes do processamento.
- b. Estabilidade em urina processada: Foram incubados doze espécimes a 4 °C ou 30 °C durante um período de 38 dias. A 4 °C, o RNA de PCA3 e PSA manteve-se estável durante 21 dias; a 30 °C durante 5 dias. Os espécimes armazenados a -20 °C e -70 °C demonstraram estabilidade do RNA do PCA3 e PSA durante um período de 90 dias.
- c. Estabilidade na congelação-descongelação: Os espécimes foram submetidos 6 vezes a ciclos entre 37 °C e -70 °C. Não foi observada qualquer diminuição dos níveis de cópia do RNA do PCA3 ou PSA.

B. Resultados analíticos

1. Sensibilidade analítica

Foi utilizado um painel de sensibilidade analítica constituído por transcrito do RNA *in vitro* diluído para avaliar a sensibilidade do ensaio. Um operador testou o painel em doze processamentos de cinco replicados, utilizando um único lote de reagente. O limite de detecção e o limite de quantificação foram calculados de acordo com o documento EP17-A do Instituto CLSI (2004) (5). O limite de detecção do analito do PCA3 foi 80 c/ml, e para o analito do PSA foi de 1438 c/ml. O limite de quantificação de ambos os analitos foi o Calibrador 2.

2. Especificidade analítica

- a. Transcrito dividido: O ensaio PROGENSA PCA3 foi concebido para detectar apenas o RNA do PCA3 unido exão 3-exão 4 específico do cancro da próstata (2). O ensaio não detectou 1 milhão c/ml de RNA do PCA3 dividido significativamente acima do nível basal.
- b. Especificidade para a próstata do RNA do PCA3 na urina: Os espécimes de indivíduos submetidos a prostatectomia radical (n = 97) foram testados com o ensaio PROGENSA PCA3 e os níveis de RNA do PCA3 foram comparados com os de indivíduos pré-biopsia (n = 464). O valor mediano de c/ml de RNA do PCA3 estava abaixo do limite de detecção do ensaio para espécimes de indivíduos após prostatectomia enquanto o valor mediano de c/ml de RNA do PCA3 para espécimes de indivíduos pré-biopsia foi de 7243 c/ml; estes dados confirmam que o RNA do PCA3 na urina pertence à próstata.
- c. Especificidade do tecido: O RNA total foi extraído de tecidos de dois únicos doadores masculinos por tipo de tecido, adicionado a diluente de espécimen (10 ng por reacção) e testado com o ensaio PROGENSA PCA3. O tecido da próstata foi o único tipo detectado acima do limite de detecção do RNA do PCA3 dos tipos de tecido indicados na Tabela 7.

Tabela 7: Tipos de tecido masculino testados para RNA do PCA3

Tipo de tecido	
Bexiga (normal)	Rim
Bexiga (tumor)	Pênis
Medula óssea	Próstata
Canal deferente	Vesícula seminal
Epidídimo	Testículo

- d. Substâncias interferentes: As substâncias indicadas na Tabela 8 foram adicionadas a alíquotas de urina de homens processada em conjunto. Os espécimes foram testados com o ensaio PROGENSA PCA3 de acordo com o documento EP7-A2 do Instituto CLSI (2005) (6). Nas concentrações indicadas, não foi observada qualquer interferência no ensaio.

Tabela 8: Substâncias testadas relativamente à interferência do ensaio PROGENSA PCA3

Agentes terapêuticos		Agentes terapêuticos, continuação	
Substância	Concentração de teste	Substância	Concentração de teste
Acetaminofeno/Codaína	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	Finasterida	15 mg/l
Atenolol	37,6 µmol/l	Tamsulosina	1,2 µg/l
Sulfasalazina	754 µmol/l	Metformina	310 µmol/l
Esomeprazol	120 mg/l	Sildenafil	12,9 pmol/l
Alopurinol	294 µmol/l	Saw palmetto	1600 mg/l
Difenidramina	19,6 µmol/l	Selénio	0,275 mg/l
Acetaminofeno	1324 µmol/l		
Ácido acetilsalicílico	3,62 mmol/l		
		Constituintes da urina	
Substância	Concentração de teste	Substância	Concentração de teste
Ibuprofeno	2425 µmol/l	Ácido úrico	1,4 mmol/l
Furosemida	181 µmol/l	Hemoglobina	2 g/l
Ciprofloxacina	30,2 µmol/l	Glóbulos brancos	4,56 x 10 ⁷ células/l
Levaquin	48,6 µmol/l	Glóbulos vermelhos	3,06 x 10 ⁷ células/l
Doxiciclina	67,5 µmol/l	Albumina	50 g/l
Hidrocloreto de fluoxetina	11,2 µmol/l	Bilirrubina (não conjugada)	342 g/l
Flutamida	1500 mg/l	IgG	60 g/l
Dutasterida	1,5 mg/l		

3. Exactidão

A exactidão do ensaio PROGENSA PCA3 foi avaliada de acordo com o documento EP15-A2 do Instituto CLSI (2005) (7). Os transcritos de RNA do PCA3 e PSA foram quantificadas por espectrofotometria UV-vis, adicionadas a urina de mulheres normais processada (sem RNA de PCA3 ou PSA detectável) e as concentrações foram medidas no ensaio PROGENSA PCA3. A percentagem (%) de recuperação foi calculada como razão entre o c/ml medido e o c/ml adicionado, multiplicada por 100.

Tabela 9: Recuperação de cópia do ensaio PROGENSA PCA3

Analito	Concentração conhecida, c/ml	Concentração medida, c/ml	% Recuperação
PCA3	750	808	108%
	7500	7618	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. Linearidade e intervalo

O intervalo linear do ensaio PROGENSA PCA3 foi determinado de acordo com o documento EP6-A do Instituto CLSI (2003) (8) com base na análise de regressão linear (mínimos quadrados). Foram preparados dois conjuntos de séries de diluição a partir de espécimes contendo elevadas concentrações de RNA de PCA3 e PSA. Um conjunto foi diluído em urina feminina processada e o outro foi diluído em diluente de espécimen. As diluições abrangeram todo o intervalo de ensaio entre os mais baixos e os mais altos calibradores positivos para cada analito. Para ambos os analitos PCA3 e PSA, os resultados medidos pelo ensaio mostraram, uma relação directamente proporcional entre as diluições testadas e o c/ml do analito comunicado. Não existiu efeito significativo da matriz de diluição. Consulte Figura 4.

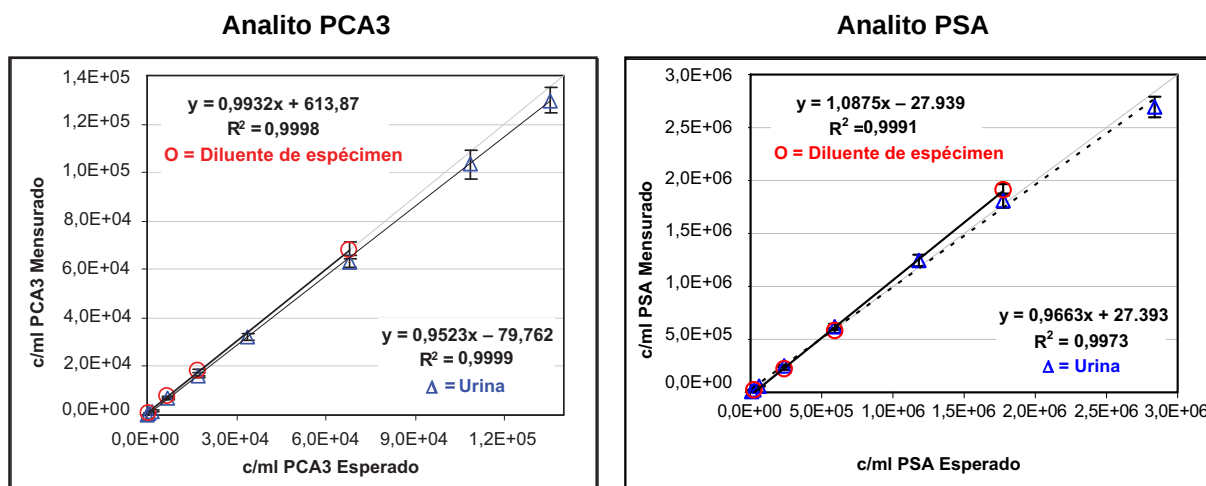


Figura 4. Linearidade do ensaio PROGENSA PCA3 para analitos PCA3 e PSA

5. Precisão

A precisão do ensaio PROGENSA PCA3 foi avaliada de acordo com o documento EP5-A2 do Instituto CLSI (2004) (9). A repetibilidade é a precisão em condições de variabilidade mínima, e a reprodutibilidade é precisão em condições de variabilidade máxima.

Para a repetibilidade, foi preparado um painel de teste de 3 membros constituído por transcrito de RNA diluído *in vitro*. Um operador num local testou o painel em

20 processamentos de 5 replicados durante 20 dias, utilizando um único lote de calibrador e controlo, um lote de reagente e um conjunto de equipamento. A Tabela 10 mostra a precisão de repetibilidade do ensaio PROGENSA PCA3 a diferentes níveis de concentração de teste.

Tabela 10: Repetibilidade do ensaio PROGENSA PCA3

Analito	Painel Membro	Média c/ml	Repetibilidade DP	Repetibilidade CV
PCA3	1	1228	145	12%
	2	12.020	809	7%
	3	61.108	2489	4%
PSA	1	48.091	3715	8%
	2	484.457	41.026	8%
	3	2.001.430	131.554	7%

Para a reprodutibilidade, foi preparado um painel de teste de 8 membros constituído por espécimes agrupados (1 a 3) e transcrito de RNA diluído *in vitro* (4 a 8). Três operadores testaram o painel em 18 processamentos durante 3 dias, utilizando um único lote de calibradores e controlo, 3 lotes de reagente e 3 conjuntos de equipamento. As Tabelas 11 e 12 resumem a precisão do processamento total, do intra-processamento e do inter-processamento, do operador, do equipamento e do lote relativamente ao ensaio PROGENSA PCA3 para c/ml de analito e para o PCA3 Score.

As variabilidades intra-processamento, inter-operador e inter-processamento foram, por ordem decrescente, os maiores contribuintes para a variação total do ensaio. O lote de reagentes e o equipamento demonstraram ter uma reduzida contribuição para a variação total do ensaio. Estes resultados demonstraram que o ensaio PROGENSA PCA3 apresenta reprodutibilidade e que a fonte principal de variação é o erro aleatório (intra-processamento).

Tabela 11: Reprodutibilidade do ensaio PROGENSA PCA3: Análise de cópia/ml

Analito	Painel Membro	n	medida c/ml	CV total	inter-processamento	CV inter-processamento	CV, Inter-operador	CV, inter-equipamento	CV, Inter-lote
PCA3	1	36	248	27%	24%	7%	15%	11%	0%
	2	36	7021	11%	6%	9%	9%	0%	0%
	3	36	31.469	8%	6%	5%	9%	0%	4%
	4	36	1469	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%

Tabela 12: Reprodutibilidade do ensaio PROGENSA PCA3: Análise do PCA3 Score

Painel Membro*	n	Score médio	CV total	CV inter-processamento	CV inter-processamento	CV, Inter-operador	CV, Inter-equipamento	CV, Inter-lote
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%

*Os membros 4 a 6 do painel continham apenas transcrito do RNA do PCA3 ou PSA e, como tal, não foram incluídos nesta análise.

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, 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. Kiemeny, J.A. Witjes, and J.A. Schalken.** 2003. DD3^{PCA3}-based Molecular Urine Analysis for the Diagnosis of Prostate Cancer. *European Urology.* **44**:8-16.
3. **Groskopf J., S.M. Aubin, I.L. Deras, A. Blase, S. Bodrug, C. Clark, S. Brentano, J. Mathis, J. Pham, T. Meyer, M. Cass, P. Hodge, M.L. Macairan, L.S. Marks, and H. Rittenhouse.** 2006. APTIMA PCA3 Molecular Urine Test: Development of a Method to Aid in the Diagnosis of Prostate Cancer. *Clin Chem.* **52**:1089-95.
4. **CLSI.** 1995. CLSI document GP10-A, Assessment of the Clinical Accuracy of Laboratory Tests Using Receiver Operating Characteristic (ROC) Plots. CLSI, Wayne, PA.
5. **CLSI.** 2004. CLSI document EP17-A, Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation. CLSI, Wayne, PA.
6. **CLSI.** 2005. CLSI document EP7-A2, Interference Testing in Clinical Chemistry. CLSI, Wayne, PA.
7. **CLSI.** 2005. CLSI document EP15-A2, User Verification of Performance for Precision and Trueness. CLSI, Wayne, PA.
8. **CLSI.** 2003. CLSI document EP6-A, Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach. CLSI, Wayne, PA.
9. **CLSI.** 2004. CLSI document EP5-A2, Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods. CLSI, Wayne, PA.

**Desenvolvido, fabricado
e distribuído por:**



Gen-Probe Incorporated
San Diego, CA 92121 EUA

Contactos nos EUA e a nível internacional:

Apoio ao Cliente: +1 858 410 8002 customerservice@gen-probe.com

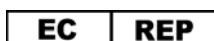
Assistência Técnica: +1 858 410 8511 technicalsupport@gen-probe.com

Número de telefone gratuito nos EUA e Canadá:

Apoio ao Cliente: +1 800 523 5001

Assistência Técnica: +1 888 484 4747

www.gen-probe.com



EMERGO EUROPE
Molenstraat 15
2513 BH, Haia
Países Baixos

GEN-PROBE, GEN-PROBE e o design, APTIMA, DTS, LEADER, PROGNSA e SB100 são marcas comerciais da Gen-Probe Incorporated.

eppendorf (estilizado) e REPEATER são marcas comerciais da Eppendorf AG.

RAININ é uma marca comercial da Rainin Instrument, LLC.

TECAN e FREEDOM EVO são marcas comerciais da Tecan Group AG.

Qualquer outra marca que apareça neste documento pertence ao respectivo proprietário.

©2006 – 2013 Gen-Probe Incorporated

501377PT Rev. D

2013-02