

Test PROGENSA™ PCA3

Pour diagnostic *in vitro*.

Réservé à l'exportation américaine.

Usage prévu	1
Résumé et explication du test	1
Principes de la procédure	1
Réactifs	1
Matériel	3
Avertissements et précautions	3
Conditions de conservation et de manipulation	4
Collecte, transport et conservation des échantillons	5
Procédure de test	6
Remarques concernant la procédure	9
Procédures de contrôle de qualité	10
Interprétation des résultats	10
Limites	13
Caractéristiques de la performance	14
Bibliographie	18

Usage prévu

Le test PROGENSA™ PCA3 est un test d'amplification de l'acide nucléique (NAAT) *in vitro* qui détecte l'acide ribonucléique messager (mRNA) du gène 3 (PCA3) du cancer de la prostate dans les échantillons d'urine masculins afin de générer un PCA3 Score. Le PCA3 Score est conçu pour être utilisé en conjonction avec les algorithmes de diagnostic conformes aux normes de soin pour faciliter le diagnostic du cancer de la prostate.

Résumé et explication du test

L'utilisation de l'antigène prostatique spécifique (PSA) sérique pour le dépistage du cancer de la prostate a permis la biopsie de tumeurs plus petites auparavant indétectables (1), créant ainsi un nouveau dilemme en matière de diagnostic : seule une fraction des hommes dont les taux de PSA sérique sont élevés ont un cancer de la prostate détectable. Les hommes ayant au moins une biopsie négative ont souvent un PSA sérique constamment élevé, dû généralement à une hypertrophie de la prostate ainsi qu'à des hyperplasies prostatiques bénignes (HPB). Néanmoins, une proportion significative d'homme ayant un PSA sérique légèrement élevé (2,5-4 µg/L) ont ou développeront un cancer de la prostate significatif sur le plan clinique (1). Bien que la biopsie demeure la norme de référence pour la détection du cancer de la prostate, des tests plus précis et d'une meilleure spécificité sont nécessaires avant de décider d'effectuer une biopsie de la prostate.

Le PCA3 (également nommé « PCA3^{DD3} » ou « DD3^{PCA3} ») est un mRNA spécifique à la prostate, non codant, qui est légèrement surexprimé dans les cellules prostatiques cancéreuses, avec un niveau médian 66 fois plus élevé que dans les tissus bénins adjacents (2). En revanche, l'expression du gène PSA est similaire dans les cellules malignes et les cellules bénignes ; les taux de mRNA du PSA peuvent ainsi être utilisés pour normaliser la quantité d'acide ribonucléique (RNA) spécifique à la prostate dans les échantillons de test moléculaires. La faisabilité des tests moléculaires quantitatifs basés sur le PCA3 des sédiments urinaires (2) et de l'urine non centrifugée (3) a été démontrée.

Le test PROGENSA PCA3 utilise l'urine non centrifugée collectée après un toucher rectal (TR) consistant en trois effleurages par lobe. Le TR libère les cellules prostatiques via le système du canal prostatique dans

les voies urinaires où elles peuvent être recueillies dans la première urine du matin. L'urine est traitée par l'ajout de Moyen de transport d'urine (UTM), qui lyse les cellules et stabilise le RNA. Les mRNA des PCA3 et PSA sont quantifiés, et le PCA3 Score est déterminé en se basant sur le ratio des mRNA de l'expression PCA3/PSA. Outre qu'il normalise le signal PCA3, le dosage du mRNA du PSA sert également à confirmer que la libération du RNA spécifique à la prostate est suffisant pour générer un résultat valide. Des PCA3 Scores plus élevés présentent une corrélation avec une probabilité de biopsie positive de la prostate plus importante.

Principes de la procédure

Le test PROGENSA PCA3 se compose de deux tests quantitatifs d'amplification de l'acide nucléique. Ce test associe les technologies de capture de cible, de TMA (Transcription Mediated Amplification) et du test de protection contre l'hybridation (HPA) pour, respectivement, simplifier le traitement des échantillons d'urine, amplifier le mRNA cible et détecter l'amplicon.

Lorsque le test PROGENSA PCA3 est réalisé en laboratoire, les molécules du mRNA cible sont isolées des échantillons d'urine par capture de cible. Les oligonucléotides (« oligonucléotides de capture ») qui sont complémentaires aux régions spécifiques de la séquence des cibles sont hybridés aux cibles dans l'échantillon d'urine. Un oligonucléotide de capture distinct est utilisé pour chaque cible. La cible hybridée est ensuite capturée sur des microparticules magnétiques qui sont séparées de l'échantillon d'urine dans un champ magnétique. Des étapes de lavage sont effectuées pour éliminer les composants exogènes du tube réactionnel. La séparation magnétique et les étapes de lavage ont lieu avec un système de capture de cible.

L'amplification de cible se produit via la TMA, une méthode d'amplification de l'acide nucléique basée sur la transcription qui utilise deux enzymes : la transcriptase inverse du virus de la leucémie murine de Moloney (MMLV) et la polymérase RNA T7. On utilise un seul jeu d'amorces pour chaque cible. La transcriptase inverse sert à générer une copie d'acide désoxyribonucléique (DNA) (contenant un site promoteur de la polymérase RNA T7) de la séquence de la cible. La polymérase RNA T7 produit de multiples copies de l'amplicon RNA à partir du modèle de copie de DNA.

La détection s'effectue au moyen du test HPA avec des sondes monocaténaire et chimiluminescentes d'acide nucléique marqué et qui sont complémentaires à l'amplicon. Des sondes distinctes sont utilisées pour chaque amplicon cible. Les sondes d'acide nucléique marqué s'hybrident spécifiquement à l'amplicon. Le réactif de sélection différencie les sondes hybridées de celles qui ne le sont pas en désactivant le marqueur sur les sondes non hybridées. Lors de l'étape de détection, un signal chimiluminescent produit par la sonde hybridée est mesuré dans un luminomètre et transcrit en Unités relatives de lumière (RLU).

Les mRNA du PCA3 et du PSA sont quantifiés dans des tubes distincts et le PCA3 Score est établi. Des calibrateurs contenant des quantités connues de transcrit RNA de PCA3 ou PSA sont inclus dans chaque série de test et utilisés pour générer une courbe standard. Des contrôles PCA3 et PSA sont également inclus pour vérifier la précision des résultats interpolés à partir de la courbe standard.

Réactifs

Les réactifs et le matériel fournis dans le PROGENSA PCA3/PSA Assay Kit pour le test PROGENSA PCA3 sont indiqués ci-dessous. Les symboles d'identification des réactifs figurent également à côté du nom du réactif.

PROGENSA™ PCA3/PSA Assay Kit, 2 x 100 réactions, référence 302355 (8 boîtes)
Kit PROGENSA PCA3 100 réactions

Boîte réfrigérée PROGENSA PCA3 - Conserver entre 2 °C et 8 °C			
Symbole	Composant	Quantité	Description
A	Réactif d'amplification PCA3	1 x 100 réactions	Acides nucléiques non infectieux déshydratés dans une solution tamponnée HEPES contenant <10 % de réactif diluant.
E	Réactif enzymatique PCA3/PSA	1 x 100 réactions	Transcriptase inverse et polymérase RNA déshydratées dans une solution tamponnée HEPES contenant <10 % de réactif diluant.
P	Réactif de sonde PCA3	1 x 100 réactions	Sondes DNA chimiluminescentes non infectieuses déshydratées dans une solution tamponnée de succinate contenant <5 % de réactif diluant et <5 % de sulfate de lauryle et de lithium.

Boîte à température ambiante PROGENSA PCA3 - Conserver entre 15 °C et 30 °C

Symbole	Composant	Quantité	Description
AR	Solution de reconstitution pour amplification PCA3	1 X 9,3 mL	Solution aqueuse contenant des conservateurs (<1 % de parabènes).
ER	Solution de reconstitution enzymatique PCA3/PSA	1 X 3,3 mL	Solution tamponnée HEPES contenant un surfactant (10 % Triton X-100) et 20 % de glycérol.
PR	Solution de reconstitution pour sonde PCA3/PSA	1 X 12,4 mL	Solution tamponnée de succinate contenant <5 % de sulfate de lauryle et de lithium.
S	Réactif de sélection PCA3/PSA	1 X 31 mL	Solution tamponnée de borate contenant un surfactant (1 % Triton X-100).
TCR	Réactif Target Capture PCA3	1 X 22 mL	Acide nucléique non infectieux dans une solution tamponnée HEPES contenant une phase solide (<0,5 mg/mL).
	Cartes de protection	1 paquet	
	Collets de reconstitution	1 paquet	

Kit de calibration et de contrôles PROGENSA PCA3 - Conserver entre 2 °C et 8 °C

Symbole	Composant	Quantité	Description
CAL	Calibrateur 1 PCA3	1 X 2,0 mL	Solution tamponnée de phosphate contenant <5 % de sulfate de lauryle et de lithium.
CAL	Calibrateurs 2-5 PCA3	4 X 1,7 mL	Acide nucléique PCA3 non infectieux dans une solution tamponnée de phosphate contenant <5 % sulfate de lauryle et de lithium.
PC	Contrôles positifs PCA3	2 X 1,7 mL	Acide nucléique PCA3 non infectieux dans une solution tamponnée de phosphate contenant <5 % sulfate de lauryle et de lithium.

Kit PROGENSA PCA3 100 réactions

Boîte réfrigérée PROGENSA PSA - Conserver entre 2 °C et 8 °C			
Symbole	Composant	Quantité	Description
A	Réactif d'amplification PSA	1 x 100 réactions	Acides nucléiques non infectieux déshydratés dans une solution tamponnée HEPES contenant <10 % de réactif diluant.
E	Réactif enzymatique PCA3/PSA	1 x 100 réactions	Transcriptase inverse et polymérase RNA déshydratées dans une solution tamponnée HEPES contenant <10 % de réactif diluant.
P	Réactif de sonde PSA	1 x 100 réactions	Sondes DNA chimiluminescentes non infectieuses déshydratées dans une solution tamponnée de succinate contenant <5 % de réactif diluant et <5 % de sulfate de lauryle et de lithium.

Boîte à température ambiante PROGENSA PSA - Conserver entre 15 °C et 30 °C

Symbole	Composant	Quantité	Description
AR	Solution de reconstitution pour amplification PSA	1 X 9,3 mL	Solution aqueuse contenant des conservateurs (<1 % de parabènes)
ER	Solution de reconstitution enzymatique PCA3/PSA	1 X 3,3 mL	Solution tamponnée HEPES contenant un surfactant (10 % Triton X-100) et 20 % de glycérol.
PR	Solution de reconstitution pour sonde PCA3/PSA	1 X 12,4 mL	Solution tamponnée de succinate contenant <5 % de sulfate de lauryle et de lithium.

Boîte à température ambiante PROGENSA PSA - Conserver entre 15 °C et 30 °C

Symbole	Composant	Quantité	Description
S	Réactif de sélection PCA3/ PSA	1 X 31 mL	<i>Solution tamponnée de borate contenant un surfactant (1 % Triton X-100).</i>
TCR	Réactif Target Capture PSA	1 X 22 mL	<i>Acide nucléique non infectieux dans une solution tamponnée HEPES contenant une phase solide (<0,5 mg/mL).</i>
	Cartes de protection	1 paquet	
	Collets de reconstitution	1 paquet	

Kit de calibration et de contrôles PROGENSA PSA - Conserver entre 2 °C et 8 °C

Symbole	Composant	Quantité	Description
CAL	Calibrateur 1 PSA	1 X 2,0 mL	<i>Solution tamponnée de phosphate contenant <5 % de sulfate de lauryle et de lithium.</i>
CAL	Calibrateurs 2-5 PSA	4 X 1,7 mL	<i>Acide nucléique PSA non infectieux dans une solution tamponnée de phosphate contenant <5 % sulfate de lauryle et de lithium.</i>
PC	Contrôles positifs PSA	2 X 1,7 mL	<i>Acide nucléique PSA non infectieux dans une solution tamponnée de phosphate contenant <5 % sulfate de lauryle et de lithium.</i>

Liquides pour tests APTIMA® - Conserver entre 15 °C et 30 °C (2 boîtes)

Symbole	Composant	Quantité	Description
W	Solution de lavage	1 X 402 mL	<i>Solution tamponnée HEPES contenant <2 % de dodécyl sulfate de sodium.</i>
DF	Tampon pour liquide de désactivation	1 X 402 mL	<i>Solution tamponnée de bicarbonate.</i>
O	Réactif huileux	1 X 24,6 mL	<i>Huile de silicone.</i>

Remarque : Tout le matériel inclus dans le PROGENSA PCA3/PSA Assay Kit peut aussi être acheté séparément (voir le chapitre *Matériel* pour de plus amples détails).

Matériel

Remarque : Les références du matériel disponible chez Gen-Probe sont indiquées.

Matériel requis mais non fourni

PROGENSA™ PCA3 Urine Specimen Transport Kit (référence 302352)

LEADER® HC+ Luminometer GEN-PROBE® (référence 104747F)
Système Target Capture (TCS) GEN-PROBE® (référence 104555F)
APTIMA® Auto Detect Kit (référence 301048)

2 eppendorf Repeater Plus Pipettors (référence 305725)

Embouts de pipeteur à répétition (2,5 mL, 5 mL, 25 mL)

Soit :

2 vortexeurs (mélangeur à tourbillon multi-tubes) (référence 102160F)

3 bains-marie circulateurs (62 °C ± 1 °C, 42 °C ± 1 °C, 62 °C ± 1 °C) (référence 104586F)

3 blocs-chauffant pour bain-marie (référence 104627)

Ou :

2 SB100® Dry Heat Bath/vortexeurs (référence 105524F) (des instruments SB100 supplémentaires peuvent être nécessaires selon le débit requis)

Micro-pipeteur, 1000 µL RAININ PR1000 (référence 104216)

Embouts, 1000 µL P1000 (référence 105049)

Pipeteur, eppendorf 20 à 200 µL (référence 105726)

Embouts, pipette 20 à 200 µL

Javel (solution d'hypochlorite de sodium à 5,25 % ou 0,7 M minimum)

Récipient plastique à large couvercle

Récipients standard pour la collecte d'urine, sans conservateurs

Matériel disponible chez Gen-Probe

PROGENSA™ PCA3 100-kit de réaction (référence 302354)

PROGENSA™ PSA 100-kit de réaction (référence 302357)

Kit de calibrateurs et contrôles PROGENSA™ PCA3 (référence 302353)

Kit de calibrateurs et de contrôles PROGENSA™ PSA (référence 302356)

PROGENSA™ PCA3/PSA Proficiency Panels (référence 302350)

PROGENSA™ PCA3 Specimen Diluent Kit (référence 302351)

Kit de liquides pour tests APTIMA® (référence 302002C)

Unités de dix tubes (TTU) (référence TU0022)

Cassette de dix embouts (TTC) (référence 304578)

SysCheck (référence 301078)

Matériel optionnel

TECAN Freedom EVO 100/4 (référence 900932)

Plaque de support pour PCA3, DTS® 800 (référence 902021)

Réservoir à réaction (quart de module de 40 mL) (référence 104765)

Réservoir à réactif partagé en deux (quart de module de 19 mL x 2) (référence 901172)

Tubes de transport (référence 302521)

Embouts de pipette jetables avec filtre (1 mL) (Tecan référence 10612513)

Bouchons pénétrables de rechange (référence 302520)

Bouchons non pénétrables de rechange (référence 103036A)

Avertissements et précautions

A. Pour diagnostic *in vitro*.

B. Réserve à l'exportation américaine.

Recommandations concernant les laboratoires

C. N'utilisez que le matériel de laboratoire jetable fourni ou recommandé.

D. Prenez les précautions de laboratoire habituelles. Évitez impérativement de manger, boire ou fumer dans les zones de travail désignées. Portez des gants jetables sans poudre, des

lunettes de protection et des blouses de laboratoire pour manipuler les échantillons d'urine et les réactifs des kits. Lavez-vous soigneusement les mains après avoir manipulé les échantillons d'urine et les réactifs des kits.

- E. **Avertissement : irritants, corrosifs.** Evitez tout contact d'Auto Detect 1 et Auto Detect 2 avec la peau, les yeux et les muqueuses. En cas de contact de ces liquides avec la peau ou les yeux, lavez la zone affectée à l'eau. En cas de déversement de ces liquides, diluez le produit répandu à l'eau avant de l'essuyer.
- F. Les plans de travail, pipettes et autre matériel doivent être régulièrement décontaminés avec une solution d'hypochlorite de sodium (solution de javel diluée) entre 2,5 % à 3,5 % (0,35 M à 0,5 M) (voir *Remarques concernant la procédure*).
- G. Il est fortement recommandé de réserver un espace de travail spécifique pour la post-amplification afin de minimiser la contamination par l'amplicon lors du test. Cette zone de travail devrait être éloignée de la zone de préamplification, là où ont lieu la préparation des réactifs, la capture de cible et l'amplification.
- H. Pour éviter la contamination des différentes zones du laboratoire par l'amplicon, le sens de travail du laboratoire devrait être unidirectionnel : depuis la préparation des réactifs jusqu'à la post-amplification. Les échantillons, le matériel et les réactifs ne doivent pas être ramenés là où une étape précédente a été effectuée. Le personnel ne doit pas retourner dans les zones de travail des étapes précédentes sans s'entourer de précautions adéquates pour éviter toute contamination.

Recommandations concernant les échantillons

- I. Une fois l'urine versée dans le tube de transport d'échantillons d'urine, le niveau de liquide de ce tube doit se situer entre les deux lignes indicatrices noires de l'étiquette du tube. Dans le cas contraire, l'échantillon doit être rejeté.
- J. Observez des conditions de conservation adéquates pendant le transport des échantillons pour préserver leur intégrité. La stabilité des échantillons dans des conditions de transport autres que celles recommandées n'a pas été évaluée.
- K. Les dates de péremption figurant sur les kits de collecte sont destinées au site de collecte, et non à l'établissement effectuant les tests. Les échantillons collectés avant la date de péremption du kit de collecte, puis transportés et conservés conformément à la notice du test, sont valides pour être testés même si la date de péremption du tube de collecte est dépassée.
- L. Conservez tous les échantillons aux températures indiquées. La performance du test peut être affectée par l'utilisation d'échantillons mal conservés. Voir *Collecte, transport et conservation des échantillons* pour des instructions précises.
- M. Les échantillons d'urine peuvent être infectieux. Utilisez les Précautions universelles en effectuant ce test. Le responsable du laboratoire devra avoir établi des méthodes de manipulation et de mise au rebut adéquates. Seul le personnel ayant reçu une formation adéquate pour utiliser le test PROGNSA PCA3 et manipuler correctement des substances infectieuses doit être autorisé à effectuer cette procédure.
- N. Evitez toute contamination croisée lors des étapes de manipulation des échantillons. Les échantillons d'urine peuvent contenir des taux élevés de mRNA cible. Veillez à éviter tout contact entre les différents récipients d'échantillons et à ne pas passer au-dessus d'un récipient ouvert en jetant des éléments usagés. Changez de gants en cas de contact avec un échantillon pour éviter toute contamination croisée.

Recommandations concernant les tests

- O. Ne pas utiliser ce kit après la date de péremption. **Ne pas échanger, mélanger ou combiner les réactifs des kits portant différents numéros de lots.**

- P. Conservez tous les réactifs du test aux températures indiquées. Les résultats du test peuvent être affectés par l'utilisation de réactifs de test mal conservés. Voir *Conditions de conservation et de manipulation* et *Remarques concernant la procédure* pour des instructions précises.
- Q. Pour la désactivation du test (voir *Procédure de test*), la concentration minimum de javel doit être de 2,6 % (0,35 M) d'hypochlorite de sodium **après** une dilution de 1/1 avec un tampon de désactivation. Pour cette raison, l'eau de javel de départ doit être dosée à 5,25 % (0,7 M) minimum d'hypochlorite de sodium pour parvenir à la concentration finale requise pour la désactivation.
- R. Des pointes de pipette munies de filtres hydrophobes doivent être utilisées. Réservez au minimum deux pipeteurs à répétition pour ce test : un premier qui sera utilisé lors des étapes de préamplification et l'autre pour celles de post-amplification. Réservez un micro-pipeteur au transfert des échantillons, sauf si vous utilisez l'appareil TECAN Freedom EVO 100/4. Tous les pipeteurs doivent être régulièrement nettoyés conformément aux instructions indiquées sous *Remarques concernant la procédure*.
- S. Si vous utilisez des pipeteurs à répétition pour ajouter des réactifs, ne touchez pas le tube réactionnel avec l'embout de la pipette afin d'éviter toute contamination d'un tube à l'autre.
- T. Un mélange adéquat est nécessaire pour obtenir des résultats de test précis. Pour de plus amples détails, consultez la *Remarques concernant la procédure*.
- U. Réservez des bains-marie distincts aux étapes de préamplification, d'amplification et de post-amplification lors du test.
- V. Certains réactifs de ce kit sont accompagnés de symboles de risque et de sécurité conformément à la directive européenne 1999/45/EC et doivent être manipulés en conséquence. Les fiches techniques de sécurité peuvent être consultées sur le site www.gen-probe.com et sont disponibles sur demande.

Conditions de conservation et de manipulation

- A. Consultez le Tableau 1 pour toute information sur la conservation des réactifs.

Tableau 1 : Conservation des réactifs

Réactif/liquide	Conservation avant ouverture	Ouvert/reconstitué Stabilité (jusqu'à la date de péremption)
Réactifs d'amplification	2 °C à 8 °C jusqu'à la date de péremption	30 jours entre 2 °C et 8 °C*
Réactifs de sonde	2 °C à 8 °C jusqu'à la date de péremption	30 jours entre 2 °C et 8 °C*
Réactif enzymatique	2 °C à 8 °C jusqu'à la date de péremption	30 jours entre 2 °C et 8 °C*
Réactifs Target Capture	15 °C à 30 °C jusqu'à la date de péremption	30 jours entre 15 °C et 30 °C
Solution de reconstitution de l'amplification	2 °C à 30 °C jusqu'à la date de péremption	S.O. (usage unique)
Solution de reconstitution de sonde	2 °C à 30 °C jusqu'à la date de péremption	S.O. (usage unique)
Solution de reconstitution enzymatique	2 °C à 30 °C jusqu'à la date de péremption	S.O. (usage unique)

Tableau 1 : Conservation des réactifs (suite)

Réactif/liquide	Conservation avant ouverture	Ouvert/reconstitué Stabilité (jusqu'à la date de péremption)
Réactif de sélection	2 °C à 30 °C jusqu'à la date de péremption	30 jours entre 15 °C et 30 °C
Calibrateurs	2 °C à 8 °C jusqu'à la date de péremption	S.O. (une seule série)
Contrôles	2 °C à 8 °C jusqu'à la date de péremption	S.O. (une seule série)
Réactif huileux	15 °C à 30 °C jusqu'à la date de péremption	30 jours entre 15 °C et 30 °C
Solution de lavage	15 °C à 30 °C jusqu'à la date de péremption	30 jours entre 15 °C et 30 °C
Tampon pour liquide de désactivation	15 °C à 30 °C jusqu'à la date de péremption	28 jours entre 15 °C et 30 °C

* Peut être réutilisé jusqu'à quatre fois pour d'autres séries de test dans la mesure où le temps total à température ambiante ne dépasse pas 4 heures.

B. Ne pas conserver le réactif Target Capture à des températures inférieures à 15 °C.

C. Le réactif de sonde et le réactif de sonde reconstitué sont photosensibles. Évitez toute exposition prolongée de ces réactifs à la lumière pendant leur conservation et leur préparation.

D. Ne pas congeler les réactifs.

E. Ne pas utiliser les réactifs ou liquides après la date de péremption.

F. Les calibrateurs et contrôles PROGENSA PCA3 et PSA sont des flacons prévus pour une seule série et doivent être jetés après utilisation.

G. Des modifications dans l'aspect physique du réactif fourni peuvent être un signe d'instabilité ou de détérioration. Si l'aspect physique des réactifs remis en suspension présente toujours des altérations (par ex., changements évidents dans la couleur du réactif ou turbidité indicative d'une contamination microbienne), contactez le Service technique de Gen-Probe avant toute utilisation.

H. Le surplus des réactifs ouverts ou reconstitués peut être utilisé lors de tests ultérieurs s'ils sont conservés de manière appropriée après leur utilisation initiale. Le surplus de réactif peut être ajouté à un réactif fraîchement préparé ou au surplus d'un réactif du même lot. **Ne pas échanger, mélanger ou combiner les réactifs des kits portant différents numéros de lots.** Aucun des composants du réactif groupé ne peut dépasser les limites de conservation du réactif ouvert ou reconstitué. Vérifiez que le réactif groupé a été soigneusement mélangé et qu'il a été préparé en quantité suffisante pour toute la série de tests.

Collecte, transport et conservation des échantillons

Le test PROGENSA PCA3 est conçu pour quantifier le mRNA du PCA3 et PSA dans l'urine de premier jet recueillie après un toucher rectal consistant en trois effleurages par lobe. L'urine est traitée à l'aide du PROGENSA PCA3 Urine Specimen Transport Kit. La stabilité du mRNA de PCA3 et PSA dans l'urine ainsi que l'urine traitée a été établie en surveillant les taux de copie de mRNA dans les échantillons d'urine collectés conformément aux instructions ci-dessous.

A. Instructions concernant la collecte et le traitement des échantillons d'urine :

- Il peut être utile de demander au patient de consommer une quantité d'eau importante (environ 500 mL) pour obtenir un volume d'urine suffisant à collecter.
- Effectuez le toucher rectal comme indiqué ci-dessous immédiatement avant la collecte d'urine :

Exercez une pression suffisante sur la prostate pour enfoncer sa surface sur environ 1 cm, de la base à l'apex prostatique et de la ligne latérale à la ligne médiane pour chaque lobe comme illustré en Figure 1. **Effectuez exactement trois effleurages par lobe. Cette technique n'est pas destinée à être un massage prostatique.**

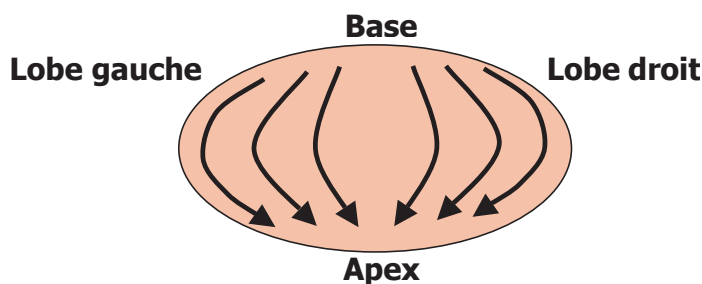


Figure 1. Direction correcte de la pression exercée sur la prostate

- Après le toucher rectal, demandez au patient de collecter l'urine de premier jet (environ 20 à 30 mL du jet d'urine initial) dans un récipient de collecte d'urine correctement étiqueté. Il doit s'agir du premier échantillon d'urine éliminée après le toucher rectal. Utilisez un récipient de collecte ne contenant aucun conservateur. Si le patient ne parvient pas à arrêter son flux d'urine et qu'il fournit plus que les 20 à 30 mL requis, conservez la totalité de ce volume. Si le patient est dans l'incapacité de fournir le volume d'urine requis, 2,5 mL au moins seront nécessaires pour effectuer le test PROGENSA PCA3.
- Les échantillons d'urine non traités doivent, s'ils ne sont pas traités sur-le-champ, être conservés entre 2 °C et 8 °C ou sur de la glace. L'échantillon d'urine refroidi et non traité doit être transféré dans le tube de transport d'échantillons d'urine dans les 4 heures qui suivent sa collecte. Ne pas congeler les échantillons d'urine non traités.**
- Pour traiter les échantillons d'urine, rebouchez fermement l'échantillon et retournez-le 5 fois pour remettre les cellules en suspension. Retirez le bouchon du tube de transport d'échantillons d'urine et transférez 2,5 mL de l'urine collectée dans le tube au moyen de la pipette de transfert jetable fournie à cet effet. Le volume d'urine ajouté est adéquat lorsque le niveau de liquide se situe entre les lignes indicatrices noires situées sur l'étiquette du tube de transport d'échantillons d'urine.
- Rebouchez le tube de transport de l'échantillon d'urine fermement et retournez l'échantillon d'urine 5 fois pour le mélanger. Il y sera fait maintenant référence sous le nom d'échantillon d'urine traité.

B. Transport et conservation des échantillons avant le test :

- Les échantillons d'urine traités doivent être transportés au laboratoire dans le tube de transport d'échantillons d'urine à une température de 30 °C ou inférieure (ils peuvent être congelés). Prenez les dispositions nécessaires concernant l'expédition des échantillons pour s'assurer qu'ils sont réceptionnés par le site de test dans les 5 jours suivant leur collecte. Une fois l'échantillon reçu, le laboratoire peut le conserver entre 2 °C et 8 °C pendant 14 jours maximum avant qu'il ne faille le jeter. Si des périodes plus longues sont nécessaires, il est possible de conserver les échantillons à -20 °C ou moins pendant 90 jours maximum. Se référer au

Tableau 2 pour les durées de conservation autorisées à différentes températures.

Tableau 2 : Durée de conservation des échantillons d'urine traités

Température de conservation	Durée
Conservation et expédition des échantillons traités :	
A 30 °C ou en dessous	jusqu'à 5 jours*
Après réception par le site conduisant les tests :	
2 °C à 8 °C	jusqu'à 14 jours
-20 °C ou en dessous	jusqu'à 90 jours

*Durée autorisée pour un envoi à 30 °C ou moins.

2. Les échantillons d'urine traités peuvent subir un total de 5 cycles de congélation-décongélation.

C. Conservation des échantillons après les tests :

1. Les échantillons qui ont été testés doivent être rangés dans un portoir en position verticale.
2. Les tubes de transport d'échantillons d'urine doivent, s'ils ne sont pas rebouchés avec un bouchon intact, être recouverts d'une nouvelle barrière de plastique ou d'aluminium propre.
3. Si certains des échantillons testés doivent être congelés ou envoyés, retirez les bouchons pénétrables et placez de nouveaux bouchons non pénétrables sur les tubes de transport d'échantillon d'urine. Si les échantillons doivent être envoyés dans un autre établissement pour y être testés, les températures recommandées doivent être maintenues. **Évitez les projections et les contaminations croisées.**

Remarque : Suivez les recommandations PI650 de l'Association du transport aérien international (IATA) relatifs au conditionnement si les échantillons d'urine doivent être acheminés par des transporteurs routiers ou par avion.

Procédure de test

A. Préparation de la zone de travail

1. Préparez un premier bain-marie à 62 °C ± 1 °C pour la préamplification, un second bain-marie à 42 °C ± 1 °C pour l'amplification et un troisième bain-marie à 62 °C ± 1 °C pour la post-amplification. Assurez-vous que ces bains-marie contiennent une quantité d'eau suffisante (voir *Remarques concernant la procédure*). Si l'on utilise le SB100 Dry Heat Bath/vortexeur, se référer à la fiche d'application du *SB100 Dry Heat Bath/vortexeur pour le test PROGENSA PCA3 (Fiche d'application du SB100)*.
2. Avant d'entreprendre le test, essuyez les plans de travail et les pipeteurs avec une solution d'hypochlorite de sodium (solution de javel) dosée de 2,5 % à 3,5 % (0,35 M à 0,5 M). Laissez la solution de javel au contact des surfaces et des pipeteurs pendant au moins 1 minute avant de rincer à l'eau. Ne pas laisser la solution de javel sécher. Couvrez la surface de la paillasse sur laquelle le test sera effectué avec des protections de laboratoire absorbantes propres avec envers plastifié.
3. Placez un nombre suffisant de cassettes de dix embouts dans le système Target Capture (TCS). Vérifiez que la bouteille de solution de lavage TCS est remplie avec la solution de lavage et que l'aspirateur est branché sur la pompe à vide. (Se référer au *Manuel de l'opérateur du Système Target Capture*).

B. Reconstitution et préparation des réactifs

La reconstitution des réactifs doit être effectuée avant d'entreprendre le transfert des échantillons.

1. Afin de reconstituer les réactifs d'amplification, enzymatiques et de sonde, combinez les bouteilles de réactif lyophilisé à la solution de reconstitution. Si elles ont été réfrigérées, laissez les solutions de reconstitution parvenir à température ambiante avant l'emploi.

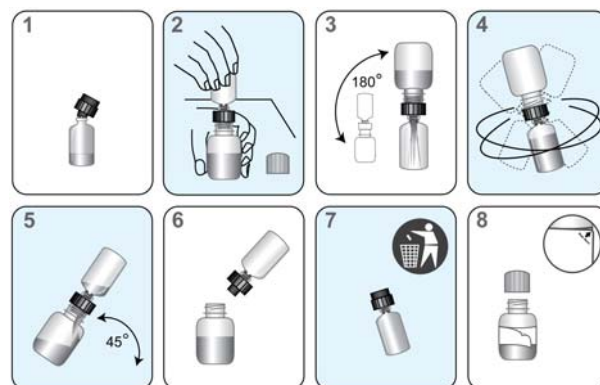


Figure 2. Processus de reconstitution

- a. Appariez la solution de reconstitution appropriée avec le réactif déshydraté. Vérifiez que les flacons ont les mêmes couleurs d'étiquette pour s'assurer qu'ils sont correctement appariés.
 - b. Ouvrez le flacon de réactif déshydraté et insérez fermement l'extrémité portant une encoche du collet de reconstitution dans l'ouverture du flacon (Figure 2, Etape 1).
 - c. Ouvrez la solution de reconstitution correspondante et posez le bouchon sur une surface de travail propre et couverte. Tout en tenant la bouteille de solution au-dessus de la paillasse, insérez fermement l'autre extrémité du collet de reconstitution dans la bouteille (Figure 2, Etape 2).
 - d. Retournez délicatement l'assemblage de bouteilles. Laissez la solution s'écouler depuis la bouteille dans le flacon en verre (Figure 2, Etape 3). Attendez que le réactif lyophilisé se mêle à la solution, puis faites tourner délicatement la solution dans le flacon en verre en lui imprimant un mouvement circulaire pour la mélanger. Évitez de faire de la mousse pendant cette manipulation (Figure 2, Etape 4).
 - e. Inversez l'assemblage puis inclinez-le à un angle de 45° pour minimiser la formation de mousse (Figure 2, Etape 5). Laissez la totalité du liquide retourner dans la bouteille en plastique.
 - f. Retirez le collet de reconstitution et le flacon en verre (Figure 2, Etape 6) et jetez-les (Figure 2, Etape 7).
 - g. Rebouchez la bouteille en plastique et retirez la partie supérieure de l'étiquette (Figure 2, Etape 8). Sur l'étiquette de la bouteille restante, inscrivez les initiales de l'opérateur, la date de reconstitution, ainsi que le numéro de lot du réactif lyophilisé sur tous les flacons de réactif reconstitué. N'oubliez pas d'indiquer l'analyte (PCA3 ou PSA) sur les flacons de réactif de sonde.
 - h. Jetez le réactif reconstitué après 30 jours ou à la date de péremption indiquée si celle-ci survient avant.
2. Les réactifs de sonde, d'amplification et enzymatiques précédemment reconstitués doivent parvenir à température ambiante (15 °C à 30 °C) avant d'entreprendre le test. Consultez *Conditions de conservation et de manipulation* pour grouper des surplus de réactifs. Si le réactif d'amplification reconstitué contient un précipité qui empêche la solution de revenir à température ambiante, chauffez-le à 62 °C ± 1 °C pendant 1 à 2 minutes dans la zone de préamplification. Si le réactif de sonde reconstitué contient un précipité qui empêche

la solution de revenir à température ambiante, chauffez-le à $62\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pendant 1 à 2 minutes dans la zone de post-amplification. Après ces étapes, les réactifs de sonde reconstitués peuvent être utilisés, même s'il reste des précipités résiduels. Après la remise en suspension, mélangez les flacons délicatement par retournement.

C. Installation des portoirs

Le pipeteur à répétition utilisé pour la capture de cible, le transfert d'échantillons et l'amplification doit être réservé à ces étapes uniquement (Voir *Avertissements et précautions*).

1. Installez un portoir pour l'analyte PCA3 et un autre pour l'analyte PSA.

Remarque : Si le nombre d'échantillons est relativement peu important, il est possible de tester les deux analytes sur un seul portoir. Si vous utilisez l'appareil TECAN Freedom EVO 100/4, il est nécessaire d'avoir des portoirs distincts pour chaque analyte. Il n'est pas possible de tester plus de deux portoirs complets (20 TTU) à la fois.

2. Dans le ou les portoirs pour unités de dix tubes (TTU), placez un nombre suffisant d'unités TTU pour les calibrateurs, les contrôles et échantillons de chaque analyte.
3. Inscrivez les ID d'échantillon sur les unités TTU. Le Tableau 3 décrit l'ajout de calibrateurs, contrôles et échantillons. Chargez les calibrateurs PSA sur une nouvelle unité TTU.

Remarque : Les calibrateurs doivent être analysés en trois réplicats et les contrôles en deux réplicats chacun, et ce sur le même portoir que les échantillons. Les échantillons doivent être analysés en double. Ne pas laisser de tubes vides entre les calibrateurs, les contrôles et les échantillons. Si l'on utilise l'appareil TECAN Freedom EVO 100/4, se référer à la *Fiche d'application du TECAN Freedom EVO 100/4 pour le test PROGENSA PCA3 (Fiche d'application du TECAN Freedom EVO)* pour de plus amples instructions.

Tableau 3 : Préparation du portoir - exemple

Position du portoir	Description de l'échantillon	*Concentration cible du PCA3 (c/mL)	*Concentration cible du PSA (c/mL)
1 à 3	Calibrateur 1	0	0
4 à 6	Calibrateur 2	250	7 500
7 à 9	Calibrateur 3	2 500	75 000
10 à 12	Calibrateur 4	25 000	750 000
13 à 15	Calibrateur 5	125 000	3 000 000
16 à 17	Contrôle A	1 250	37 500
18 à 19	Contrôle B	62 500	1 500 000
20 à n	Echantillon	inconnu	inconnu

*Les calibrateurs et contrôles positifs PCA3 et PSA ont des valeurs assignées, et les valeurs c/mL effectives des calibrateurs 2 à 5 et des contrôles A et B seront légèrement différentes des concentrations cible figurant dans le tableau et varieront d'un lot à l'autre. Les valeurs assignées seront indiquées sur une fiche incluse dans le conditionnement des flacons de calibrateurs et de contrôles et serviront à la calibration et la détermination de la validité de la série.

D. Vérification des informations relatives à la concentration

Vérifiez avec l'administrateur système du logiciel de test PROGENSA PCA3 que les informations de concentration des lots des kits de calibrateurs et de contrôle PROGENSA PCA3 et PSA testés ont été saisies. Pour de plus amples informations, consultez

le *Manuel de référence rapide pour le test PROGENSA PCA3 (Manuel de référence rapide)* ou le *Manuel de l'administrateur système du logiciel de test PROGENSA PCA3*.

Remarque : La saisie des données de concentration est indispensable **avant la première utilisation** de chaque nouveau lot de kit de calibrateurs et de contrôles. Les séries ultérieures utilisant les calibrateurs et contrôles du même lot de kit ne nécessitent aucune vérification supplémentaire.

E. Configuration du Worklist Editor

Générez une liste de travail pour la série de tests au moyen du Worklist Editor GEN-PROBE sur un ordinateur situé dans la zone de préamplification. Concernant l'utilisation du Worklist Editor, consultez le *Guide de référence rapide* ou le *Manuel de l'opérateur du Worklist Editor GEN-PROBE*. Si l'on utilise l'appareil TECAN Freedom EVO 100/4, se référer également à la *Fiche d'application du TECAN Freedom EVO* pour un complément d'information.

F. Préamplification

La préamplification doit s'effectuer dans un environnement dont la température est située entre 15 °C et 30 °C et sur deux portoirs en parallèle. Si vous utilisez le SB100 Dry Heat Bath/vortexeur, référez-vous à la *Fiche d'application du SB100*. Si vous utilisez l'appareil TECAN Freedom EVO 100/4, référez-vous à la *Fiche d'application du TECAN Freedom EVO* pour un complément d'information.

1. Laissez les calibrateurs et les contrôles parvenir à température ambiante avant le test.
2. Laissez les échantillons parvenir à température ambiante avant le test. **Ne pas vortexer les échantillons.** Les échantillons doivent être mélangés par retournement. Si les échantillons contiennent des précipités, chauffez-les à 37 °C pendant 5 minutes. Si le précipité ne se remet pas en solution, vérifiez que ce précipité n'interfère pas avec l'obtention de l'échantillon.
3. Mélangez soigneusement en tournant ou en inversant le réactif Target Capture (TCR). A l'aide d'un pipeteur à répétition, ajoutez $100\text{ }\mu\text{L}$ du TCR spécifique à l'analyte dans le tube réactionnel correspondant.
4. Percez le bouchon du flacon du calibrateur à l'aide du micro-pipeteur et ajoutez $400\text{ }\mu\text{L}$ du calibrateur dans le tube réactionnel correctement étiqueté. Utilisez le même embout de pipette pour retirer les ajouts de réplicats du flacon à travers le bouchon percé. Utilisez de nouveaux embouts de pipette avec chaque flacon de calibrateur. Recommencez pour l'ajout des contrôles et échantillons. Couvrez et conservez le surplus d'échantillon à une température de 8 °C ou inférieure (voir *Collecte, transport et conservation des échantillons* pour de plus amples informations) au cas où il serait nécessaire de reprendre le test.
5. Couvrez les unités TTU avec des cartes de protection et agitez délicatement le portoir manuellement. **Ne pas vortexer.** Incubez le portoir dans un bain-marie à $62\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pendant 30 ± 5 minutes.
6. Retirez le portoir du bain-marie et séchez le fond des tubes sur un matériau absorbant.
7. Vérifiez que les cartes de protection sont fermement positionnées. Au besoin, remplacez-les par de nouvelles cartes de protection et fermez hermétiquement les unités TTU.
8. Vortexez le portoir pendant 60 secondes sur le vortexeur (mélangeur à tourbillon multi-tubes) (voir *Remarques concernant la procédure*). Le portoir doit être vortexé dans les 2 minutes qui suivent son retrait du bain-marie.
9. Sans retirer les cartes de protection, incubez le portoir à température ambiante pendant 30 ± 5 minutes.
10. Placez le portoir, avec l'onglet Front devant, sur la base magnétique TCS pendant 5 à 10 minutes. Chargez le portoir pour unités TTC avec les unités TTC.

11. Amorcez les conduites de la pompe du poste de distribution en pompant la solution de lavage dans la rampe de distribution. Pompez une quantité suffisante de liquide dans le système afin d'éviter toute formation de bulle d'air dans les tubulures et de dispenser un flux régulier de liquide par les dix têtes.

12. Mettez la pompe à vide en marche et débranchez la rampe d'aspiration du premier connecteur situé entre la rampe d'aspiration et le flacon piège. Vérifiez que la jauge de dépression soit conforme à la spécification du test pour les fuites. L'obtention de ce chiffre peut prendre une quinzaine de secondes. Rebranchez la rampe et vérifiez que la jauge de dépression soit conforme à la spécification du niveau de dépression. Laissez la pompe à vide en marche jusqu'à ce que toutes les étapes de la capture de cible soient terminées.

Consultez la Fiche des spécifications de dépression du Système Target Capture située au verso du *Manuel de l'opérateur du Système Target Capture* ou contactez le Service technique de Gen-Probe pour de plus amples renseignements.

13. Fixez fermement la rampe d'aspiration au premier jeu d'embouts. Aspirez la totalité du liquide en abaissant les embouts dans la première unité TTU jusqu'à ce qu'ils touchent brièvement le fond des tubes. Ne pas maintenir les embouts en contact avec le fond des tubes.

14. Une fois l'aspiration terminée, éjectez les embouts dans leur cassette d'origine. Recommencez les étapes d'aspiration pour les unités TTU restantes en réservant un embout pour chaque tube réactionnel.

15. Placez la rampe de distribution sur chaque unité TTU et, à l'aide de la pompe du poste de distribution, versez 1.0 mL de solution de lavage dans chacun des tubes de l'unité TTU.

16. Couvrez les tubes avec une carte de protection et retirez le portoir du TCS. Vortexez le portoir une fois sur le vortexeur (mélangeur à tourbillon multi-tubes). Consultez *Remarques concernant la procédure* pour de plus amples informations.

17. Placez le portoir sur la base magnétique du TCS pendant 5 à 10 minutes.

18. Aspirez la totalité du liquide comme dans les Etapes 13 et Etape 14.

19. Après l'aspiration finale, retirez le portoir du socle TCS et inspectez visuellement les tubes pour vérifier que le liquide a été totalement aspiré et que tous les tubes contiennent des billes de particules magnétiques. S'il reste visiblement du liquide, remettez le portoir sur la base TCS pendant 2 minutes et refaites l'aspiration pour cette unité TTU en prenant les mêmes embouts que ceux utilisés précédemment pour chaque tube réactionnel. Si la MOINDRE bille de particule magnétique est visible une fois l'aspiration terminée, le tube peut être accepté. Si aucune bille n'est visible, l'échantillon doit être testé à nouveau. Si le même échantillon ne contient pas de bille de particule magnétique dans cette étape et lors d'une série ultérieure, ceci peut indiquer un problème lié à l'échantillon. Il est alors recommandé d'effectuer une nouvelle collecte de l'échantillon d'urine.

G. Amplification

Remarque : L'ajout d'un enzyme dans un portoir à réaction (Etapes 6 et 7 ci-dessous) doit être effectué en moins de 90 secondes.

Effectuez les Etapes 6 et 7 sur le premier portoir, puis recommencez sur le second portoir. Si vous utilisez le SB100 Dry Heat Bath/vortexeur, référez-vous à la *Fiche d'application du SB100*. Si vous utilisez l'appareil TECAN Freedom EVO 100/4, référez-vous à la *Fiche d'application du TECAN Freedom EVO* pour un complément d'information.

1. A l'aide d'un pipeteur à répétition, ajoutez 75 µL du réactif d'amplification reconstitué spécifique à l'analyte dans chaque

tube réactionnel. Tous les mélanges réactionnels du portoir doivent maintenant être rouges.

2. A l'aide du pipeteur à répétition, ajoutez 200 µL de réactif huileux.

3. Couvrez les tubes avec une carte de protection et vortexez-les sur le vortexeur (mélangeur à tourbillon multi-tubes).

4. Incubez le portoir dans un bain-marie de préamplification à 62 °C ± 1 °C pendant 10 ± 5 minutes.

5. Transférez le portoir dans un bain-marie à 42 °C ± 1 °C pendant 5 ± 2 minutes.

6. Une fois le portoir dans le bain-marie, retirez soigneusement la carte de protection et, à l'aide du pipeteur à répétition, ajoutez 25 µL du réactif enzymatique reconstitué à chacun des mélanges réactionnels. Toutes les réactions doivent maintenant avoir une teinte orangée.

7. Couvrez immédiatement les tubes avec une nouvelle carte de protection, retirez le portoir du bain-marie et mélangez rapidement les réactions en agitant délicatement le portoir manuellement.

Remarque : Minimisez le temps pendant lequel le portoir est hors du bain-marie pour éviter le refroidissement des tubes.

8. Incubez le portoir à 42 °C ± 1 °C pendant 60 ± 5 minutes.

H. Post-amplification

Le pipeteur à répétition utilisé pour l'hybridation et la sélection doit être réservé uniquement à ces étapes (Voir *Avertissements et précautions*). L'environnement de la post-amplification, y compris la détection, doit être à une température de 15 °C à 30 °C. Si vous utilisez le SB100 Dry Heat Bath/vortexeur, référez-vous à la *Fiche d'application du SB100*.

1. Hybridation

a. Retirez le portoir du bain-marie de préamplification et transférez-le dans la zone de post-amplification. A l'aide du pipeteur à répétition, ajoutez 100 µL de réactif de sonde reconstitué spécifique à l'analyte. Tous les mélanges réactionnels doivent maintenant avoir une teinte jaune.

b. Couvrez les tubes avec une carte de protection et vortexez-les pendant 10 secondes, ou jusqu'à l'obtention d'une teinte uniforme, sur le vortexeur (mélangeur à tourbillon multi-tubes).

c. Incubez le portoir dans un bain-marie à 62 °C ± 1 °C pendant 20 ± 5 minutes.

d. Retirez le portoir du bain-marie et laissez incuber à température ambiante pendant 5 ± 1 minutes.

2. Sélection

a. A l'aide du pipeteur à répétition, ajoutez 250 µL de réactif de sélection dans chaque tube. Toutes les réactions doivent maintenant avoir une teinte rose.

b. Couvrez les tubes avec une carte de protection, vortexez pendant 10 secondes ou jusqu'à l'obtention d'une teinte uniforme, et incubez le portoir dans un bain-marie à 62 °C ± 1 °C pendant 10 ± 1 minutes.

c. Retirez le portoir du bain-marie. Incubez le portoir à température ambiante pendant 15 ± 3 minutes.

I. Détection

Concernant l'utilisation du LEADER HC+ Luminometer, consultez le *Manuel de l'utilisateur du LEADER HC+ Luminometer*. Pour utiliser le logiciel de test du PROGNSA PCA3, consultez le *Guide de référence rapide* ou le *Manuel de l'administrateur système du logiciel de test du PROGNSA PCA3 ainsi que le Manuel de l'opérateur*.

1. Préparez le LEADER HC+ Luminometer en plaçant une unité TTU vide dans la position de cassette numéro 1 et effectuez le protocole de LAVAGE une fois.
2. Vérifiez que les volumes d'Auto Detect 1 et 2 sont suffisants pour effectuer les réactions.
3. Chargez les unités TTU dans le luminomètre en vous guidant pour cela sur le diagramme du luminomètre. Si les deux analytes sont testés (séries consécutives), chargez tout d'abord les unités TTU de PCA3 suivies immédiatement des unités TTU de PSA.
4. Connectez-vous à l'ordinateur. Cliquez sur **NOUVELLE SERIE** et sélectionnez le protocole de test et les concentrations adéquates. Cliquez sur **SUIVANT** pour commencer la série.

Remarque : La série doit être complétée dans les 2 heures qui suivent la fin de l'incubation à 62 °C de l'étape de sélection.

5. Préparez une solution de désactivation tamponnée à base de javel en mélangeant un volume équivalent d'hypochlorite de sodium à 5,25 % (0,7 M) et de tampon pour liquide de désactivation dans un récipient en plastique muni d'un grand couvercle. Mettez une étiquette et inscrivez la date de péremption sur le récipient en plastique. Cette solution de désactivation de javel tamponnée reste stable pendant 4 semaines à température ambiante.
6. Une fois la série terminée, le logiciel de test génère deux rapports sur la série, un Rapport sur la série brute et un Rapport sur les ratios dans le cas de séries consécutives (voir *Procédures de contrôle de qualité* et *Interprétation des résultats*).
7. Une fois la série terminée, retirez les unités TTU utilisées du luminomètre et placez-les dans le récipient contenant la solution tamponnée de javel. Laissez les unités TTU dans le récipient pendant au moins 15 minutes avant de les jeter. Le responsable du laboratoire devra avoir établi des méthodes de manipulation et de mise au rebut adéquates.

Remarques concernant la procédure

A. Pipetage du contrôle, du calibrateur et de l'échantillon

1. Le volume de calibrateur, contrôle ou échantillon ajouté à l'unité TTU doit être de 400 µL. L'inspection visuelle du volume pipeté dans l'unité TTU est recommandée pour vérifier que le transfert de volume est adéquat. Un volume adéquat est nécessaire pour obtenir des résultats précis.
2. Vérifiez que l'embout de la pipette est bien en place sur le pipeteur et que le réglage du volume est correct. Il est recommandé de vérifier visuellement le réglage du volume à la fin de chaque unité TTU (tous les 10 tubes). Relâchez lentement le piston de la pipette à un rythme constant pour le prélèvement de l'échantillon afin d'éviter toute production de mousse ou de bulles.

B. Réactifs

1. La solution de reconstitution de sonde peut se précipiter pendant la conservation. Chauffez la solution à 62 °C ± 1 °C pendant 1 ± 2 minutes. Après cette étape, la solution de reconstitution de sonde peut être utilisée, même s'il reste des précipités de résidus. Après la remise en suspension, mélangez le flacon délicatement par retournement.
2. Pour pipeter des réactifs autre que le réactif enzymatique, visez légèrement le fond de la paroi du tube réactionnel (à l'endroit où le fond se courbe pour rejoindre les parois). Pour pipeter un réactif enzymatique, visez directement le centre du tube réactionnel. Confirmez visuellement que les réactifs sont correctement versés (sans quantité excessive de réactif sur les parois des tubes et avec le changement de couleur adéquat).

C. Température

1. Les étapes de capture de cible, d'amplification, d'hybridation et de sélection dépendent de la température. Il est donc impératif que les bains-marie soient maintenus dans leurs plages de température précises.
2. La température ambiante est définie comme se situant entre 15 °C et 30 °C.

D. Durée

Les réactions de capture de cible, d'amplification, d'hybridation et de sélection dépendent toutes de la durée. Respectez les durées indiquées dans la *Procédure de test*.

E. Agitation au vortex

La qualité de l'agitation au vortex est essentielle pour assurer la bonne performance du test PROGENSA PCA3. Pour vortexer des réactions, réglez la vitesse du vortexeur (mélangeur à tourbillon multi-tubes) sur le réglage le plus bas, fixez solidement le portoir en place et mettez en marche. Augmentez lentement la vitesse jusqu'à ce que le liquide atteigne la moitié supérieure du tube. Vortexez pendant 10 secondes, la durée recommandée, ou jusqu'à l'obtention d'une teinte uniforme. Ensuite, tournez la vitesse sur le réglage le plus bas avant d'éteindre le vortexeur (mélangeur à tourbillon multi-tubes) et de retirer le portoir. Les mélanges réactionnels ne doivent jamais toucher les cartes de protection.

F. Bains-marie

1. Le niveau d'eau des bains-marie doit avoir une profondeur de 3,8 cm à 5,0 cm (1,5 à 2,0 pouces) depuis le plateau de support métallique (fond du bain-marie) à la surface de l'eau. Cette précaution permettra d'assurer un transfert de chaleur adéquat.
2. Pour éviter toute contamination croisée, les bains-marie doivent être réservés à une étape précise du test.

G. Décontamination

1. Surfaces et pipeteurs

Les plans de travail, pipettes et autre matériel doivent être régulièrement décontaminés avec une solution d'hypochlorite de sodium (solution de javel diluée) dosée de 2,5 % à 3,5 % (0,35 M à 0,5 M). Laissez la solution de javel diluée au contact des surfaces pendant au moins 1 minute, puis rincez à l'eau. **Ne pas laisser la solution de javel sécher.** Les solutions à base de chlore peuvent piquer le métal et le matériel. Rincez soigneusement le matériel passé à l'eau de javel pour éviter toute piqûre de corrosion.

2. Rampe TCS

Débranchez la rampe d'aspiration en retirant la tubulure de la fixation pour tubulure. Plongez la rampe dans une solution d'hypochlorite de sodium (solution de javel) dosée de 2,5 % à 3,5 % (0,35 M à 0,5 M) en veillant à ce que les poignées et les têtes d'embouts de pipette soient recouvertes par la solution chlorée. Laissez la rampe immergée pendant 10 minutes. Toute exposition plus longue endommagerait la rampe. Rincez soigneusement la rampe avec de l'eau, puis séchez-la avec des serviettes en papier. Rebranchez la rampe et faites fonctionner la pompe pendant au moins 3 minutes pour finir le processus de séchage. Vérifiez que la surface située sous la plaque d'éjection est sèche.

3. Récipient à déchets TCS

Débranchez le flacon à déchets de l'unité et versez le contenu dans un évier. Rincez le flacon à déchets à l'eau et ajoutez 400 mL d'hypochlorite de sodium à 5,25 % (0,7 M). Rebranchez le flacon sur l'unité. Rebranchez la rampe et faites fonctionner la pompe pendant au moins 3 minutes pour finir le processus de séchage. Videz le flacon à déchets toutes les semaines ou dès qu'il a atteint 25% de sa capacité.

4. Unité TCS

Essuyez les surfaces de l'unité TCS et les embouts d'éjection du tampon de lavage avec des serviettes en papier humidifiées et une solution d'hypochlorite de sodium (solution de javel) dosée de 2,5 % à 3,5 % (0,35 M à 0,5 M). Faites suivre cette étape par un rinçage à l'eau, puis séchez complètement les surfaces avec des serviettes en papier.

5. Portoirs

Plongez la rampe dans une solution d'hypochlorite de sodium (solution de javel) dosée de 2,5 % à 3,5 % (0,35 M à 0,5 M) en veillant à ce que les poignées et les têtes d'embouts de pipette soient recouvertes par la solution chlorée. Maintenez les portoirs immergés pendant 10 minutes. Toute exposition plus longue endommagerait les portoirs. Rincez soigneusement les portoirs avec de l'eau, puis séchez-les entièrement avec des serviettes en papier.

H. Contamination des tests

1. L'introduction de substances contaminantes peut survenir si le protocole de test n'est pas rigoureusement respecté.
2. Les unités TTU doivent être décontaminées avec une solution tamponnée de javel conformément à la description de la *Procédure de test*. Ne pas réutiliser les TTU.
3. Effectuez une décontamination régulière du matériel et des plan de travail comme indiqué ci-dessus sous *Décontamination*.
4. Comme avec tout système de réactif, l'excès de poudre sur certains gants peut entraîner la contamination des tubes ouverts. Il est recommandé que les opérateurs utilisent des gants sans poudre.

Procédures de contrôle de qualité

A. Validité de la série

1. Les calibrateurs et les contrôles doivent être soumis à tous les tests et sur le même portoir que les échantillons testés. Les critères suivants doivent être réunis pour qu'une série soit considérée valide :

Moyenne de RLU du Calibrateur 2 > Seuil RLU

Où le Seuil RLU = Moyenne de RLU du Calibrateur 1
Ecart-types de + 1,645 pour les répliqués de RLU du Calibrateur 1
Ecart-types de + 1,645 pour les répliqués de RLU du Calibrateur 2.

Récupération de la moyenne interpolée du Calibrateur 5 = $100 \pm 30 \%$

Récupération de la moyenne interpolée du Contrôle A = $100 \pm 60 \%$

Récupération de la moyenne interpolée du Contrôle B = $100 \pm 35 \%$

2. Le logiciel PCA3 évalue automatiquement les résultats en fonction des critères ci-dessus et indique que la série a réussi (REUSSITE) ou a échoué (ECHEC) si les critères de validité ne sont pas réunis.
3. Si l'Etat de la série indique ECHEC, tous les résultats des tests d'une même série sont non valides pour cet analyte et ne doivent pas être validés.
4. Si une série n'est pas valide, elle doit être répétée pour l'analyte en question (voir *Interprétation des résultats*). Si la série est valide pour l'autre analyte, ces résultats peuvent être utilisés dans l'analyse de données avec la série valide répétée du premier analyte.

B. Validité de l'échantillon

Dans une série valide, des résultats d'échantillons individuels peuvent être jugés NON VALIDES et seront alors indiqués dans le Rapport sur la série brute (voir *Interprétation des résultats*). Bien que les répliqués individuels d'un échantillon puissent être valides, un échantillon sera non validé si la différence interpolée en c/mL entre les répliqués dépasse 600 %. Le test de l'échantillon doit être répété pour cet analyte.

Interprétation des résultats

A. Types de rapports

1. Rapport sur la série brute

Le Rapport sur la série brute fournit des informations sur la validité de la série (REUSSITE ou ECHEC ; voir *Procédures de contrôle de qualité*) et sur les tubes réactionnels individuels testés avec le test PROGENSA PCA3. Si la série n'est pas valide (ECHEC), tous les tubes de cette série seront marqués comme non valides. Toutefois, des tubes individuels peuvent être jugés non valides dans une série valide (REUSSITE). Pour les séries consécutives (autrement dit, lorsque les analytes PCA3 et PSA sont testés dans une même série), une série d'analyte peut être non valide alors que l'autre série est valide.

Le Résumé des exceptions se trouve à la fin du Rapport sur la série brute. Dans le cas de séries consécutives dans lesquelles les deux séries d'analytes sont valides, les prélèvements figurant dans le Résumé des exceptions peuvent nécessiter une reprise du test pour l'un des analytes. Bien qu'un résultat de PCA3 Score puisse figurer dans le Résumé des exceptions, ce résultat n'est pas considéré utilisable dans un rapport tant que la correspondance manuelle n'a pas été effectuée et que le résultat ne figure pas dans le Rapport sur les ratios. Si un seul analyte a été testé ou si une série d'analyte n'est pas valide, tous les échantillons testés figureront dans le Résumé des exceptions.

2. Rapport sur les ratios

Le logiciel de test génère automatiquement un Rapport sur les ratios lors des séries consécutives où les deux séries d'analyte sont valides. Le logiciel calcule et donne le PCA3 Score des prélèvements dans le Rapport sur les ratios. Les prélèvements figurant dans le Rapport sur les ratios ne nécessitent pas de test supplémentaire, ou alors ce sont les deux analytes qui doivent être testés à nouveau. Les prélèvements ne figurant pas dans le Rapport sur les ratios sont indiqués dans la partie Résumé des exceptions du Rapport sur la série brute.

Il est possible de générer un Rapport sur les ratios après une correspondance manuelle (voir *Mise en correspondance manuelle* pour de plus amples informations).

3. Rapport QC

Le Rapport QC donne les critères de validité de la série du test, les concentrations assignées et interpolées, ainsi que les récupérations des calibrateurs et contrôles. Ce rapport indique également les paramètres qui définissent la courbe de calibration de la réponse à la dose logistique (3) à quatre paramètres. Pour de plus amples renseignements, consultez le *Manuel de l'opérateur du logiciel de test PROGENSA PCA3*.

B. Mise en correspondance

1. Mise en correspondance automatique

Dans les séries consécutives où les deux séries d'analyte sont valides, le logiciel établit automatiquement la correspondance des résultats des analytes PCA3 et PSA des échantillons testés et détermine le PCA3 Score (s'il est calculable). Les résultats figurent dans le Rapport sur les ratios ou dans le Résumé des exceptions du Rapport sur la série brute.

2. Mise en correspondance manuelle

Si les analytes PCA3 et PSA sont testés dans des séries différentes, le logiciel n'est pas en mesure de déterminer automatiquement le PCA3 Score. La mise en correspondance manuelle des résultats des analytes est donc nécessaire pour déterminer le PCA3 Score ou la fourchette du PCA3 Score (consultez le *Guide de référence rapide* ou le *Manuel de l'opérateur du logiciel de test PROGENSA PCA3*). La mise en correspondance manuelle peut aussi être nécessaire pour les résultats figurant dans le Résumé des exceptions du Rapport sur la série brute. Après la mise en correspondance manuelle, le ou les PCA3 Score(s) pour le ou les prélèvements mis en correspondance figureront dans un nouveau Rapport sur les ratios.

C. Interprétation des rapports

1. PCA3 Score

Remarque : Seuls les PCA3 Scores et les fourchettes des PCA3 Score figurant dans le Rapport sur les ratios sont validés. Les résultats apparaissant dans le résumé des exceptions peuvent nécessiter une action supplémentaire et ne peuvent pas figurer sur un rapport.

Le PCA3 Score est calculé comme ratio des copies mRNA du PCA3 divisé par les copies mRNA du PSA et multiplié par 1000. Les scores ne peuvent être calculés qu'en utilisant les résultats des séries et échantillons valides. Les séries et échantillons non valides doivent être testés à nouveau pour l'analyte concerné (voir *Nouveau test* pour de plus amples informations).

Si le PCA3 Score validé est inférieur à la limite, le résultat doit être interprété comme étant NEGATIF. Si le PCA3 Score est supérieur ou égal à la limite, le résultat doit être interprété comme étant POSITIF. Le directeur du laboratoire établira le seuil (voir *Caractéristiques de la performance* pour de plus amples informations).

Dans certaines conditions, une fourchette du PCA3 Score ($>[\text{Score calculé}]$ ou $<[\text{Score calculé}]$) est fournie. Si le $<[\text{Score calculé}]$ est inférieur au seuil, le résultat doit être interprété comme étant NEGATIF. Si le $>[\text{Score calculé}]$ est supérieur au seuil, le résultat doit être interprété comme étant POSITIF. S'il faut une valeur numérique, la dilution et la reprise de test de l'échantillon peuvent produire un PCA3 Score au lieu d'une fourchette de PCA3 Score (voir *Nouveau test - Dilution des échantillons fortement hors normes*).

2. Interprétation des codes d'état et d'analyse

La colonne Etat du Rapport sur la série brute et du Rapport sur les ratios donne des informations en format « s:a ». Les codes d'état spécifiques à la série (« s ») sont indiqués avant les deux points (à gauche) et les codes d'analyte spécifiques à la série (« a ») figurent après les deux points (à droite). Les codes spécifiques aux analytes sont donnés en minuscules pour les résultats du PCA3 et en majuscules pour ceux du PSA. Chaque rapport contient les descriptions des codes d'état et d'analyse figurant dans celui-ci. Par exemple, les codes peuvent indiquer si un résultat d'échantillon ou de réplicat est valide ou hors normes. Consultez le *Guide de référence rapide* ou le *Manuel de l'opérateur du logiciel de test PROGENSA PCA3* pour une liste complète des codes d'état et d'analyse et pour de plus amples détails.

Si un PCA3 Score est indiqué dans le Rapport sur les ratios et qu'aucun code d'état ou d'analyse ne figure dans les colonnes Etat PCA3 ou PSA, ceci indique que les deux analytes testés sont valides et « dans les normes ». Le résultat du prélèvement est validé et aucune action supplémentaire n'est nécessaire.

Si un code d'état ou d'analyse figure dans le Résumé des exceptions ou le Rapport sur les ratios, il peut être nécessaire d'effectuer un deuxième test (voir *Interprétation des résultats du Résumé des exceptions* et *Interprétation des résultats du Rapport sur les ratios*). Si des résultats d'analyte viennent de série distinctes et qu'ils sont accompagnés d'un ou plusieurs codes d'analyse, recherchez la combinaison des deux analytes dans le Tableau 4 a ou le Tableau 4 b pour déterminer si une action supplémentaire est nécessaire.

Remarque : La présence d'un code d'état ou d'analyse ne signifie pas automatiquement qu'il faille effectuer un deuxième test.

3. Interprétation des résultats du Résumé des exceptions

Le Résumé des exceptions peut n'indiquer aucun échantillon. Si tel est le cas, aucune autre action n'est nécessaire.

Si le Résumé des exceptions indique un ou plusieurs échantillons pour des séries consécutives dans lesquelles les deux séries d'analyte sont valides, référez-vous aux instructions du Tableau 4 a.

Pour les séries d'analyte individuelles, référez-vous à *Interprétation des codes d'état et d'analyse*. Dans les séries consécutives où une série d'analyte n'est pas valide, testez une seconde fois la série invalide (voir *Nouveau test* pour de plus amples informations) et traitez les résultats comme s'il s'agissait de séries d'analyte individuelles. Une mise en correspondance manuelle sera alors nécessaire.

Un échantillon peut être désigné comme non valide alors que les tubes individuels (réplicats) seront désignés comme valides. C'est le résultat combiné des réplicats qui détermine la validité des échantillons, et toute différence importante entre réplicats a pour effet d'invalider un échantillon (voir *Procédures de contrôle de qualité* pour de plus amples informations).

Tableau 4 a: Conditions du Résumé des exceptions du test PROGENSA PCA3

Résultat PCA3 (Code d'analyse)	Résultat PSA (Code d'analyse)	PCA3 Score listé	Test supplémentaire ?	Action/commentaire
Dans la fourchette (pas de code)	Non valide* (A, B, E, H, ou I)	--	Oui	Reprenez le test de PSA (voir <i>Nouveau test</i>) et établissez manuellement la correspondance des résultats.
Faiblement hors normes (g)	Non valide (A, B, E, H, ou I)	--	Oui	Testez à nouveau le PSA et établissez manuellement la correspondance des résultats.
Non valide (a, b, e, h, ou i)	Dans la fourchette (pas de code)	--	Oui	Testez à nouveau le PCA3 et établissez manuellement la correspondance des résultats.
Dans la fourchette (pas de code)	Fortement hors normes (F)	<[Score calculé]**	Optionnel	1. Faites une correspondance manuelle pour obtenir le <[Score calculé] OU 2. Diluez l'échantillon dans un diluant d'échantillon (voir <i>Dilution des échantillons fortement hors normes</i>), retestez le PSA et mettez manuellement les résultats en correspondance si un PCA3 Score est requis.
Fortement hors normes (f)	Dans la fourchette (pas de code)	>[Score calculé]	Optionnel	1. Faites une correspondance manuelle pour obtenir le >[Score calculé] OU 2. Diluez l'échantillon dans un diluant d'échantillon, retestez le PCA3 et mettez manuellement les résultats en correspondance si un PCA3 Score est requis.
Faiblement hors normes (g)	Dans la fourchette (pas de code)	<[Score calculé]	Non	Faites une correspondance manuelle pour obtenir le <[Score calculé].
Faiblement hors normes (g)	Fortement hors normes (F)	<[Score calculé]	Non	Faites une correspondance manuelle pour obtenir le <[Score calculé].

*S'applique uniquement aux échantillons non valides d'une série valide.

**Pour les valeurs hors normes, le Score calculé est obtenu en utilisant le taux de copie du calibrateur positif le plus proche.

4. Interprétation des résultats du Rapport sur les ratios

Si un prélèvement figure dans le Rapport sur les ratios accompagné d'un PCA3 Score, le résultat est un PCA3 Score validé et aucune action supplémentaire n'est nécessaire. Si aucun PCA3 Score n'est listé, exprimé sous la forme « -- » dans la colonne PCA3 Score, se référer aux instructions du Tableau 4 b.

Tableau 4 b: Conditions du Rapport sur les ratios du test PROGENSA PCA3

Résultat PCA3 (Code d'analyse)	Résultat PSA (Code d'analyse)	PCA3 Score listé	Test supplémentaire ?	Action/commentaire
Dans la fourchette (pas de code)	Dans la fourchette (pas de code)	PCA3 Score	Non	Aucune action supplémentaire ; le résultat peut figurer sur le rapport.
Non valide* (a, b, e, h, ou i)	Non valide (A, B, E, H, ou I)	--	Oui	Testez à nouveau les deux analytes (voir <i>Nouveau test</i>).
Non valide (a, b, e, h, ou i)	Fortement hors normes (F)	--	Oui	Diluez l'échantillon dans le diluant d'échantillon (voir <i>Dilution des échantillons fortement hors normes</i>) et testez à nouveau les deux analytes.
Fortement hors normes (f)	Non valide (A, B, E, H, ou I)	--	Oui	Diluez l'échantillon dans le diluant d'échantillon et testez à nouveau les deux analytes.
Fortement hors normes (f)	Fortement hors normes (F)	--	Oui	Diluez l'échantillon dans le diluant d'échantillon et testez à nouveau les deux analytes.
Non valide (a, b, e, h, ou i)	Faiblement hors normes (G)	--	Non	L'échantillon ne contient pas suffisamment de RNA pour des analyses précises. Un nouvel échantillon doit être collecté auprès du patient.
Dans la fourchette (pas de code)	Faiblement hors normes (G)	--	Non	L'échantillon ne contient pas suffisamment de RNA pour des analyses précises. Un nouvel échantillon doit être collecté auprès du patient.

Tableau 4 b: Conditions du Rapport sur les ratios du test PROGENSA PCA3

Résultat PCA3 (Code d'analyse)	Résultat PSA (Code d'analyse)	PCA3 Score listé	Test supplémentaire ?	Action/commentaire
Fortement hors normes (f)	Faiblement hors normes (G)	--	Non	L'échantillon ne contient pas suffisamment de RNA pour des analyses précises. Un nouvel échantillon doit être collecté auprès du patient.
Faiblement hors normes (g)	Faiblement hors normes (G)	--	Non	L'échantillon ne contient pas suffisamment de RNA pour des analyses précises. Un nouvel échantillon doit être collecté auprès du patient.

*S'applique uniquement aux échantillons non valides d'une série valide. Si des échantillons ne sont pas valides parce qu'une série n'était pas valide, les résultats figureront dans le Résumé des exceptions (voir *Interprétation des résultats du Résumé des exceptions* pour de plus amples informations).

D. Nouveau test

1. Directives pour effectuer un deuxième test

- Bien qu'il ne soit pas impératif que les deux analytes soient testés dans la même série, **les résultats des deux analytes doivent venir du même flacon d'échantillon pour obtenir un PCA3 Score pouvant figurer dans un rapport.**
- Toutes les séries non valides doivent être reprises, ainsi que tous les échantillons non valides des séries valides.
- Testez à nouveau le ou les échantillons en utilisant un nouveau jeu de calibrateurs et de contrôles.
- La conservation adéquate du surplus de l'échantillon avant tout nouveau test est essentielle (voir *Collecte, transport et conservation des échantillons* pour de plus amples informations).
- Une correspondance manuelle des analytes PCA3 et PSA peut être nécessaire pour déterminer le PCA3 Score (voir *Mise en correspondance manuelle* pour de plus amples informations).

2. Dilution des échantillons fortement hors normes

- Si la concentration extrapolée d'un échantillon est supérieure à la valeur du Calibrateur 5 dans une série valide, le résultat est « fortement hors normes » et sera accompagné d'un code d'analyse « f » ou « F » (échec) dans le ou les rapports sur la série. La concentration sera exprimée sous la forme >[Concentration Calibrateur 5].
- Inversez l'échantillon d'urine traité pour le mélanger avant la dilution de l'échantillon. La dilution recommandée, mais non requise, est de 1/10 en utilisant le test PROGENSA PCA3 Specimen Diluent Kit. Dans un flacon approprié, ajoutez 1800 µL de diluant d'échantillon et 200 µL d'échantillon ; rebouchez le tube et retournez-le cinq fois pour obtenir un mélange homogène. Le facteur de dilution sera de « 10 » dans la liste de travail de la série. Si les deux analytes doivent être testés à nouveau, doublez les volumes (utilisez 3600 µL de diluant d'échantillon et 400 µL d'échantillon). Consultez la notice du PROGENSA PCA3 Specimen Diluent Kit. Testez l'échantillon dilué avec le test.
- Si, après ce nouveau test, les résultats de l'échantillon sont toujours fortement hors normes, continuez à diluer l'échantillon jusqu'à ce que les résultats soient interpolés dans la fourchette du calibrateur si nécessaire. Une dilution supplémentaire de la dilution initiale au 1/10 est permise sous réserve que la solution initiale au 1/10 ait été correctement conservée (voir *Collecte, transport et conservation des échantillons* pour de plus amples informations).

Limites

- Le test PROGENSA PCA3 ne devrait pas être utilisé chez les patients prenant des médicaments connus pour affecter les taux de PSA sérique tels que le finastéride (Proscar, Propecia), le dutastéride (Avodart), et suivant une thérapie anti-androgène (Lupron). L'effet de ces médicaments sur l'expression du gène PCA3 n'a pas été encore évalué.
- Certaines procédures thérapeutiques et de diagnostic telles qu'une prostatectomie, des rayons, une biopsie de la prostate et autres peuvent affecter la viabilité des tissus prostatiques et altérer ainsi le PCA3 Score. L'effet de ces procédures sur la performance du test n'a pas été encore évalué. Les échantillons destinés au test PCA3 doivent être collectés lorsque le clinicien estime que les tissus prostatiques ont récupéré.
- L'utilisation de ce test est limitée au personnel ayant été formé à la procédure. Le non-respect des instructions figurant dans cette notice peut donner lieu à des résultats erronés.
- Chaque laboratoire devra valider indépendamment un processus de transfert LIS.
- La fiabilité des résultats dépend de la qualité de la collecte des échantillons d'urine. Etant donné que le système de transport utilisé pour ce test ne permet pas l'évaluation microscopique de la qualité des échantillons d'urine, il est nécessaire que les cliniciens soient formés aux techniques de collecte d'échantillons d'urine appropriées. Voir *Collecte, transport et conservation des échantillons* pour de plus amples détails. Pour des informations plus détaillées, référez-vous à la notice de test fournie avec le PROGENSA PCA3 Urine Specimen Transport Kit.
- Les résultats du test PROGENSA PCA3 doivent être interprétés en conjonction avec les autres données de laboratoire et cliniques dont dispose le clinicien. (Les résultats des tests peuvent être affectés par une collecte impropre des échantillons, une erreur technique ou une confusion entre échantillons).

Caractéristiques de la performance

A. Résultats cliniques

1. Sensibilité et spécificité diagnostiques

Les caractéristiques de performance du test PROGENSA PCA3 ont été établies en utilisant les échantillons de sujets de quatre sites cliniques géographiquement diversifiés en Amérique du Nord. La population de sujets consistait en 529 hommes prévus pour une biopsie de la prostate. Les données démographiques des sujets sont indiquées ci-dessous :

- Moyenne d'âge \pm ET = 64 \pm 8 ans (médiane 63, fourchette de 32 à 89)
- Taux moyen de PSA sérique = 7,9 \pm 21,9 μ g/L (5,6 ; 0,3 à 484)
- Volume prostatique moyen (déterminé par une ultrasonographie transrectale) = 44 \pm 25 cc (39, 5 à 225)
- 34 % (180/529) de biopsies positives pour le cancer de la prostate

Le Figure 3 indique la corrélation du PCA3 Score avec la probabilité de biopsies positives. Plus le PCA3 Score augmente, plus le nombre de biopsies cancéreuses positives chez les sujets augmente.

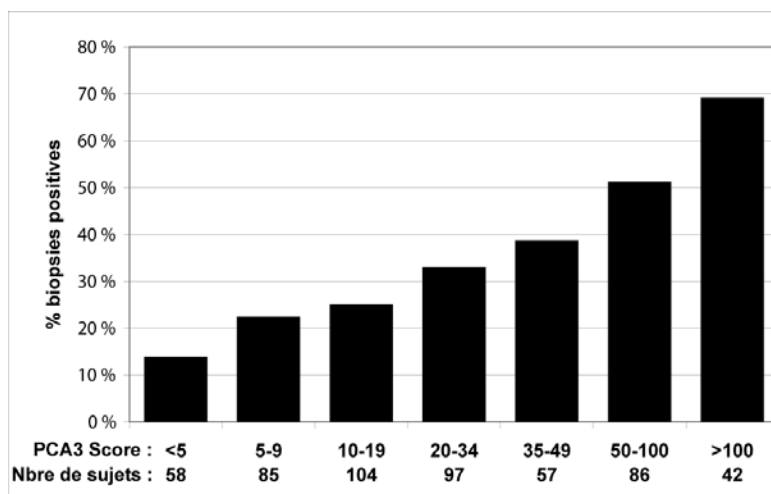


Figure 3. Corrélation du PCA3 Score avec la probabilité de biopsies positives

L'analyse de la fonction d'efficacité du récepteur (ROC) a été effectuée en utilisant la biopsie de la prostate comme méthode de référence, conformément à CLSI GP10-A (1995) (4). Pour le test PROGENSA PCA3, la zone sous la courbe (AUC) était de 0,685 (intervalle de confiance de 95 % = 0,637 à 0,733). Le Tableau 5 donne la sensibilité et la spécificité diagnostiques pour différents seuils du PCA3 Score. Chaque laboratoire devra établir les seuils de sensibilité ou spécificité diagnostiques (voir *Interprétation des résultats*).

Tableau 5 : Sensibilité et spécificité diagnostiques du test PROGENSA PCA3 pour différents seuils du PCA3 Score

Seuil du PCA3 Score	5	10	15	25	35	50	95
Sensibilité	96 %	85 %	77 %	63 %	53 %	41 %	17 %
Spécificité	14 %	33 %	47 %	61 %	74 %	84 %	95 %

2. Etudes de la stabilité des échantillons

- Stabilité dans l'urine non centrifugée : L'urine de premier jet a été recueillie chez 10 sujets et conservée entre 2 °C et 8 °C ou à 30 °C avant d'être traitée par l'ajout de moyen de transport d'urine (UTM). A des températures comprises entre 2 °C et 8 °C, une dégradation significative du mRNA de PCA3 et PSA a été observée dans certains échantillons au bout de 4 heures. L'urine non centrifugée doit donc être traitée dans les 4 heures. A 30 °C, une dégradation significative a été observée en moins d'une heure. L'urine non centrifugée doit donc être toujours réfrigérée ou conservée sur de la glace avant la réalisation des tests.
- Stabilité dans l'urine traitée : Douze échantillons ont été incubés à 4 °C ou 30 °C jusqu'à 38 jours. A 4 °C, les mRNA de PCA3 et PSA sont restés stables pendant 21 jours et pendant 5 jours à 30 °C. Les échantillons conservés entre -20 °C et -70 °C ont fait preuve d'une stabilité de mRNA de PCA3 et PSA jusqu'à 90 jours.
- Stabilité du cycle de congélation-décongélation : Les échantillons ont été soumis 6 fois à des cycles compris entre 37 °C et -70 °C. Aucune diminution dans les taux de copie de mRNA de PCA3 ou PSA n'a été observée.

B. Résultats analytiques

1. Sensibilité analytique

Un panel de sensibilité analytique composé d'un transcrit mRNA dilué *in vitro* a été utilisé pour évaluer la sensibilité du test. Un opérateur a testé le panel sur douze séries de cinq réplicats en utilisant un seul lot de réactifs. La limite de détection et la limite de quantification ont été calculées conformément à CLSI EP17-A (2004) (5). La limite de détection de l'analyte PCA3 a été de 80 c/mL, et de 1 438 c/mL pour l'analyte PSA. Le Calibrateur 2 a représenté la limite de quantification des deux analytes.

2. Spécificité analytique

- a. Transcrit non épissé : Le test était conçu pour détecter uniquement le mRNA de PCA3 épissé des exon 3-exon 4 spécifiques au cancer de la prostate (2). Le test n'a pas détecté le 1 million c/mL de mRNA de PCA3 non épissé de manière significative au-dessus du bruit de fond.
- b. Spécificité prostatique du mRNA de PCA3 dans l'urine : Les échantillons de sujets ayant subi une prostatectomie radicale (n = 97) ont été testés avec le test PROGENSA PCA3 et les taux de mRNA de PCA3 ont été comparés à ceux de ces sujets avant la biopsie (n = 464). La médiane c/mL du mRNA de PCA3 était inférieure à la limite de détection du test pour les échantillons des sujets ayant subi une prostatectomie, alors que la médiane c/mL du mRNA de PCA3 des échantillons de sujets avant la biopsie était de 7 243 c/mL ; ces données confirment que le mRNA de PCA3 dans l'urine vient de la prostate.
- c. Spécificité des tissus : Le RNA total a été extrait des tissus de deux donneurs mâles uniques par type tissulaire, ajouté au diluant d'échantillon (10 ng par réaction) et analysé avec le test PROGENSA PCA3. Le tissu prostatique a été le seul type de tissu détecté au-dessus de la limite de détection de mRNA de PCA3 pour les types de tissus indiqués au Tableau 6.

Tableau 6 : Test du mRNA de PCA3 sur différents types de tissus masculins

Type de tissu	
Vessie (normal)	Rein
Vessie (tumeur)	Pénis
Moelle osseuse	Prostate
Canal déférent	Vésicule séminale
Epididyme	Testicule

- d. Substances interférentes : Les substances indiquées dans le Tableau 7 ont été ajoutées aux aliquotes des urines masculines groupées et traitées. Les échantillons ont été testés avec le test PROGENSA PCA3 conformément à CLSI EP7-A2 (2005) (6). Pour les concentrations indiquées, aucune interférence n'a été observée avec le test.

Tableau 7 : Substances testées pour l'interférence avec le test PROGENSA PCA3

Agents thérapeutiques		Agents thérapeutiques, suite	
Substance	Concentration du test	Substance	Concentration du test
Acétaminophène/Codéine	5,34 µmol/L	Uroxatral	30 mg/L
Atorvastatine	25 mg/L	Doxazosine	1,33 µmol/L
Lisinopril	0,74 µmol/L	Térazosine	7,8 µmol/L
Amlodipine	245 µmol/L	Finastéride	15 mg/L
Aténolol	37,6 µmol/L	Tamsulosine	1,2 µg/L
Sulfasalazine	754 µmol/L	Metformine	310 µmol/L
Esomeprazole	120 mg/L	Sildénafil	12,9 pmol/L
Allopurinol	294 µmol/L	Chou palmiste nain	1600 mg/L
Diphénhydramine	19,6 µmol/L	Sélénium	0,275 mg/L
Acétaminophène	1324 µmol/L		
Acide acétylsalicylique	3,62 mmol/L	Constituants de l'urine	
Ibuprofène	2425 µmol/L	Substance	Concentration du test
Furosémide	181 µmol/L	Acide urique	1,4 mmol/L
Ciprofloxacine	30,2 µmol/L	Hémoglobine	2 g/L
Levaquin	48,6 µmol/L	Globules blancs	4,56 x 10 ⁷ cellules/L
Doxycycline	67,5 µmol/L	Globules rouges	3,06 x 10 ⁷ cellules/L
Hydrochloride de fluoxétine	11,2 µmol/L	Albumine	50 g/L
Flutamide	1500 mg/L	Bilirubine (non conjuguée)	342 g/L
Dutastéride	1,5 mg/L	IgG	60 g/L

3. Précision

La précision du test PROGENSA PCA3 a été évaluée conformément à CLSI EP15-A2 (2005) (7). Les transcrits mRNA de PCA3 et PSA ont été quantifiés par spectrophotométrie ultraviolette et visible, puis ajoutés à des urines féminines traitées et normales (pas de mRNA de

PCA3 ou PSA détectable), et les concentrations mesurées dans le test PROGENSA PCA3. Le pourcentage de récupération (%) a été calculé comme ratio du c/mL mesuré divisé par le c/mL ajouté, multiplié par 100.

Tableau 8 : Récupération des copies du test PROGENSA PCA3

Analyte	Concentration connue, (c/mL)	Concentration mesurée, c/mL	% Récupération
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. Linéarité et fourchette

L'échelle linéaire du test PROGENSA PCA3 a été déterminée conformément à CLSI EP6-A (2003) (8) en se basant sur l'analyse de la régression linéaire (méthode des plus petits carrés). Deux jeux de séries de dilution ont été préparés à partir des échantillons contenant de fortes concentrations de mRNA de PCA3 et PSA. Un jeu a été dilué dans de l'urine féminine traitée et un autre dans un diluant d'échantillon. Les dilutions s'étaient sur la totalité de la fourchette du test, allant des calibrateurs positifs les plus élevés aux plus bas pour chaque analyte. Les résultats de test mesurés des deux analytes PCA3 et PSA ont montré une relation proportionnelle directe entre les dilutions testées et le c/mL de l'analyte signalé. Aucun effet de matrice de diluant significatif n'a été noté. Voir Figure 4.

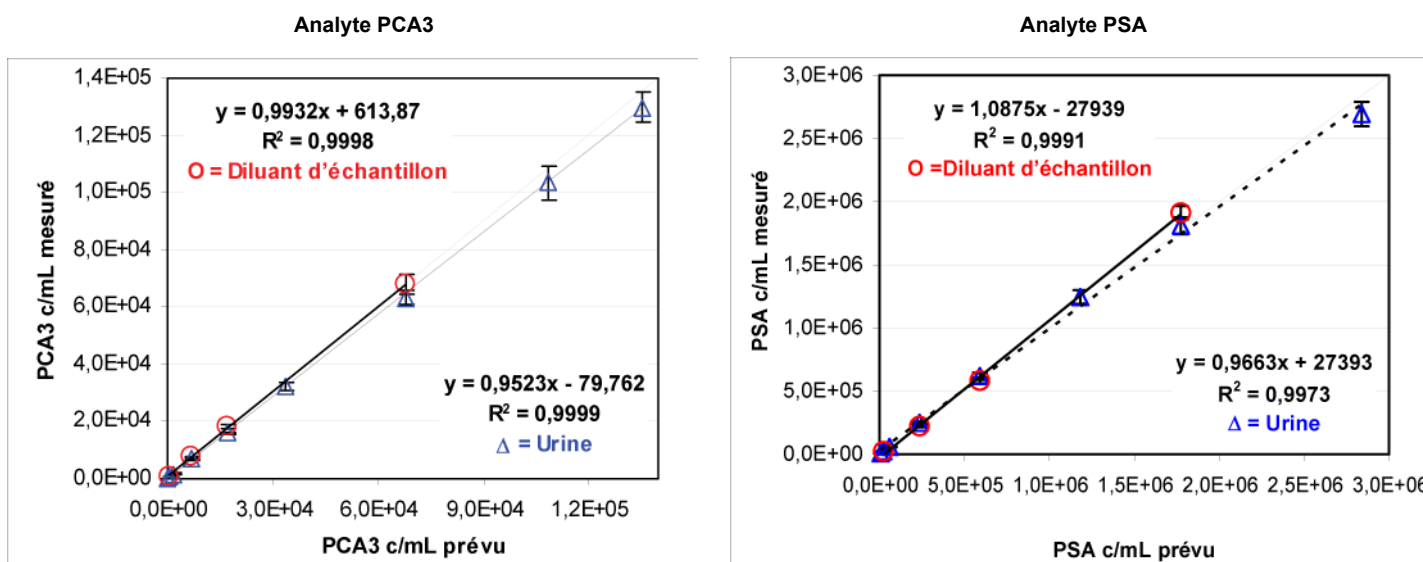


Figure 4. Linéarité du test PROGENSA PCA3 pour les analytes PCA3 et PSA

5. Exactitude

L'exactitude du test a été évaluée conformément à CLSI EP5-A2 (2004) (9). La répétabilité correspond à l'exactitude dans des conditions de variabilité minimum, et la reproductibilité à l'exactitude dans des conditions de variabilité maximum.

Pour la répétabilité, un panel de test de 3 membres comprenant un transcrite mRNA dilué *in vitro* a été préparé. L'opérateur d'un des sites a testé ce panel avec 20 séries de 5 réplicats pendant 20 jours en utilisant un seul lot de calibrateurs et de contrôles, un lot de réactifs et un jeu de matériel. Le Tableau 9 montre l'exactitude de la répétabilité du test PROGENSA PCA3 aux différents taux de concentration testés.

Tableau 9 : Répétabilité du test PROGENSA PCA3

Analyte	Membre du panel	Moyenne c/mL	Répétabilité ET	Répétabilité 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 %

Concernant la reproductibilité, un panel de test de 8 membres composé d'échantillons groupés (1 à 3) et un transcrit mRNA dilué *in vitro* (4 à 8) a été préparé. Trois opérateurs ont testé ce panel au cours de 18 séries effectuées en 3 jours en utilisant un seul lot de calibrateurs et de contrôles, 3 lots de réactifs et 3 jeux de matériel. Les Tableaux 10 et 11 résument la précision totale, intra-série et inter-série, de l'opérateur et du lot avec le test PROGENSA PCA3 pour le c/mL de l'analyte et le PCA3 Score.

Les variabilités intra-série, inter-opérateur et inter-série ont été, par ordre décroissant, les plus gros contributeurs à la variance générale du test. Le lot de réactif et le matériel ont peu contribué à la variance générale du test. Ces résultats prouvent que le test se comporte de manière reproductible et que la source principale de variation est due aux erreurs aléatoires (intra-série).

Tableau 10 : Reproductibilité du test PROGENSA PCA3 : Analyse des copies/mL

Analyte	Membre du panel	n	c/mL mesuré	Total CV	CV intra-série	CV inter-série	CV inter-opérateur	CV inter-matériel	CV inter-lot
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 %

Tableau 11 : Reproductibilité du test PROGENSA PCA3 : Analyse du PCA3 Score

Membre du panel*	n	Score moyen	Total CV	CV intra-série	CV inter-série	CV inter-opérateur	CV inter-matériel	CV inter-lot
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 %

*Les membres 4 à 6 du panel contenaient uniquement le transcrit mRNA de PCA3 ou PSA et n'ont donc pas été inclus dans cette analyse.

Bibliographie

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, et W.B. Isaacs.** 1999. DD3: A New Prostate-Specific Gene, Highly Overexpressed in Prostate Cancer. *Cancer Res.* **59**:5975-5979.
2. **Hessels, D., J.Mt. Klein Gunnewiek, I. van Oort, H.F.M. Karthaus, G.J.L. van Leenders, B. van Balken, L.A. Kiemeney, J.A. Witjes, et 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, et 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.

Développé, fabriqué
et distribué par :



Gen-Probe Incorporated
San Diego, CA 92121 Etats-Unis

Pour nous contacter aux Etats-Unis et dans d'autres pays :

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

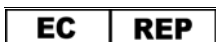
Service technique : +1 858 410 8511
technicalsupport@gen-probe.com

Numéro d'appel gratuit à partir des Etats-Unis et du Canada :

Service Client : +1 800 523 5001

Service technique : +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 et le design, APTIMA, LEADER, PROGNSA, et SB100 sont des marques de commerce de Gen-Probe Incorporated ; eppendorf (stylisé) est une marque de commerce de Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH ; RAININ est une marque de commerce de Rainin Instrument, LLC ; TECAN et FREEDOM EVO sont des marques de commerce de Tecan Group AG. Tout autre nom de marque pouvant apparaître sur cette notice de test appartient à son propriétaire respectif.

Ce produit et son utilisation sont couverts par un ou plusieurs des brevets suivants : Brevet U.S. 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, et 7,070,925 ; et homologues étrangers.

© 2006-2008 Gen-Probe Incorporated

501377FR Rév. A

2008-03