



A Sysmex Group Company



Mode d'emploi

REF : LPH 067-S / LPH 067

CLL PROFILER Kit



RÉSERVÉ À UN USAGE PROFESSIONNEL



www.cytocell.com

Informations supplémentaires et autres langues disponibles sur
www.ogt.com

Limitations

Ce dispositif est conçu pour détecter les pertes génomiques plus importantes que la région couverte par les clones rouges et verts de cet ensemble de sondes qui couvre les régions P53 (TP53), ATM et D13S319 ou les gains plus importants que la région couverte par le clone bleu de cet ensemble de sondes, qui couvre le centromère du chromosome 12. Les pertes/gains génomiques situés hors de ces régions ou les pertes/gains partiels de ces régions peuvent ne pas être détectés par ce produit.

Ce test ne convient pas aux applications suivantes : diagnostic autonome, dépistage prénatal, dépistage basé sur la population, test auprès du patient ou autotest. Ce produit est destiné à une utilisation professionnelle en laboratoire uniquement : tous les résultats doivent être interprétés par un personnel qualifié qui saura tenir compte d'autres résultats de tests pertinents.

Ce produit n'a pas été validé pour une utilisation sur des échantillons ou des maladies non spécifiés dans l'utilisation prévue.

La création de rapports et l'interprétation des résultats de la FISH doivent être conformes aux pratiques professionnelles de référence et tenir compte d'autres informations cliniques et diagnostiques. Ce kit est destiné à compléter d'autres tests diagnostiques de laboratoire, et aucune mesure thérapeutique ne doit être débutée sur la seule base du résultat de la FISH.

Le non-respect du protocole peut affecter les performances du produit et entraîner des faux positifs/négatifs.

Ce kit n'a pas été validé pour d'autres applications que celles indiquées dans ce document.

Utilisation prévue

CytoCell CLL PROFILER Kit est un test qualitatif non automatisé d'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) utilisé pour détecter les délétions chromosomiques de la région 11q22.3 sur le chromosome 11, la région 17p13.1 sur le chromosome 17 ou la région 13q14.2-q14.3 sur le chromosome 13 et/ou les gains sur la région centromérique du chromosome 12 dans des suspensions cellulaires d'origine hématologique fixées dans une solution de Carnoy (3:1 méthanol/acide acétique) provenant de patients atteints d'une leucémie lymphocytaire chronique (LLC).

Indications

Ce produit est conçu comme complément à d'autres analyses cliniques et histopathologiques dans le cadre d'un parcours diagnostique et clinique reconnu, pour lequel il est important de connaître le statut de la délétion de P53 (TP53), d'ATM ou de D13S319 et/ou du gain du centromère du chromosome 12 pour la prise en charge clinique.

Principes du test

L'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) permet de détecter des séquences d'ADN sur des chromosomes en métaphase ou dans les noyaux interphasiques d'échantillons cytogénétiques fixés. Cette technique utilise des sondes ADN qui s'hybrident à des chromosomes entiers ou à des séquences uniques spécifiques, et complète efficacement l'analyse cytogénétique en bandes G. Cette technique peut désormais être utilisée comme outil d'investigation essentiel dans l'analyse prénatale, hématologique, ainsi que dans l'analyse chromosomique des tumeurs solides. Après fixation et dénaturation, l'ADN cible est disponible pour l'annéage à une sonde ADN comportant une séquence complémentaire, dénaturée de

façon similaire et marquée par fluorescence. Après l'hybridation, la sonde ADN non liée et non liée spécifiquement est retirée et l'ADN est contre-coloré pour la visualisation. Un microscope à fluorescence permet alors la visualisation de la sonde hybridée sur le matériel cible.

Informations sur la sonde

CytoCell CLL PROFILER Kit est conçu pour détecter les délétions de TP53, ATM et D13S319, ainsi que les gains des séquences du centromère du chromosome 12 dans des échantillons de sang périphérique ou de moelle osseuse de patients atteints de leucémie lymphocytaire chronique (LLC).

P53(TP53)/ATM Probe Combination

Le gène TP53 (*protéine tumorale p53*) localisé sur 17p13.1 est l'un des gènes suppresseurs de tumeur les plus importants. Il agit comme un facteur de transcription puissant ayant un rôle fondamental dans le maintien de la stabilité génétique. La perte de TP53 est rapportée chez 10 % des patients atteints de LLC, et est également considérée comme le marqueur pronostique le plus défavorable pour cette pathologie^{1,2}.

ATM (*sérine/thréonine kinase ATM*) est un gène de point de contrôle important localisé sur 11q22.3 et impliqué dans la gestion des lésions cellulaires. Sa fonction est d'évaluer le niveau de lésion de l'ADN dans la cellule et de tenter de le réparer par phosphorylation des substrats importants impliqués dans les voies de réponse aux lésions de l'ADN³. La perte d'ATM est rapportée chez 18 % des patients atteints de LLC, et est également considérée comme un marqueur pronostique défavorable pour cette pathologie⁴.

L'analyse de l'interaction d'ATM/TP53 dans la LLC a montré que TP53 et ATM jouent un rôle important dans la prolifération du cancer lymphoïde⁵. Il a été démontré qu'ATM améliore la phosphorylation de TP53, si l'importance de la lésion nécessite la destruction de la cellule par apoptose (médiée par TP53). La délétion d'ATM supprime cette activité de contrôle, et donc l'activation de TP53. En conséquence, aucune tentative de réparation n'intervient, ni aucune apoptose des cellules endommagées, malgré la présence de TP53. En l'absence d'ATM, les cellules endommagées peuvent continuer de proliférer⁵.

D13S319/13qter/12cen Deletion/Enumeration

Les délétions du 13q14 sont également les aberrations génétiques structurales les plus fréquentes chez les patients atteints de leucémie lymphocytaire chronique (LLC)^{6,7,8}. La délétion est hétérozygote chez 30 à 60 % et homozygote chez 10 à 20 % des patients atteints de LLC dans cette région⁹. Le taux de survie s'est révélé similaire pour les deux groupes¹⁰. Les patients concernés par les délétions du 13q14 sont considérés comme à risque très faible, en l'absence d'autres lésions génétiques¹.

Deux gènes ARN non codants, DLEU1 (*délétion en cas de leucémie lymphocytaire 1*) et DLEU2 (*délétion en cas de leucémie lymphocytaire 2*), ainsi que le marqueur génétique D13S319, couvrent la région critique pathogène de 13q14¹¹. DLEU1 est considéré comme le gène suppresseur de tumeur candidat le plus probablement associé à la LLC au dans la région 13q14¹². La trisomie 12 est une anomalie récurrente de la LLC, on l'observe dans 20 % des cas¹³ et il s'agit souvent de la seule aberration cytogénétique (40 à 60 % des cas de trisomie 12)⁷. Les patients atteints de trisomie 12 sont considérés comme à risque faible, en l'absence d'autres lésions génétiques¹.

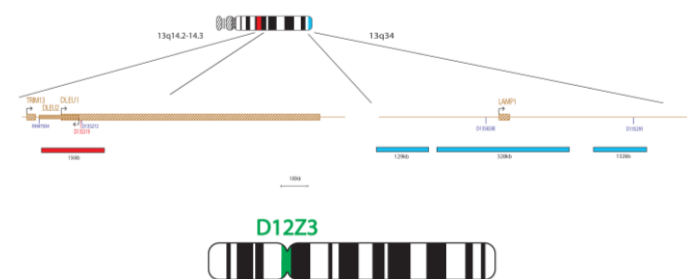
Caractéristiques des sondes

D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe

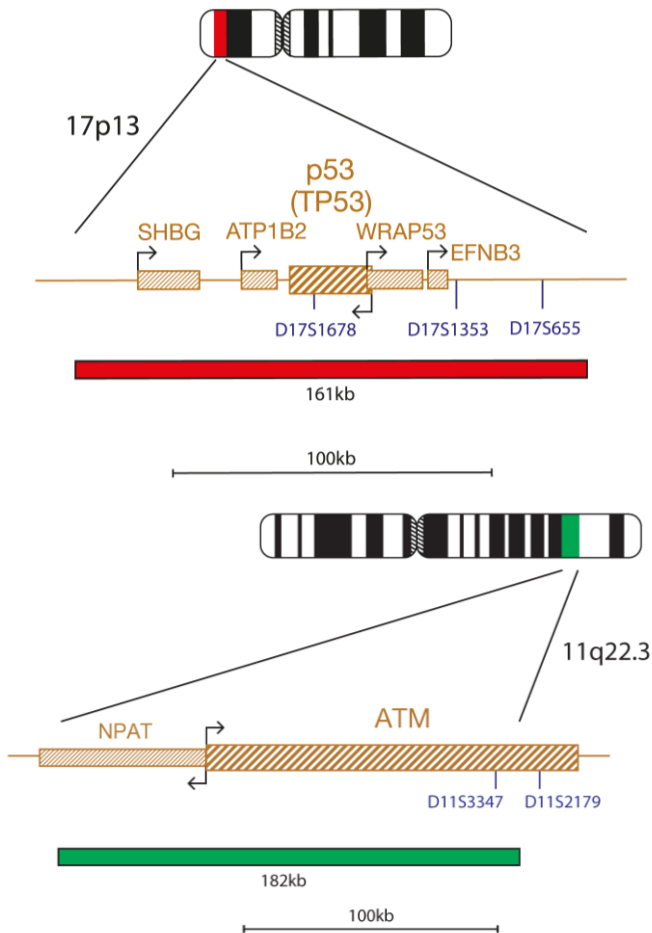
D13S319, 13q14.2, Rouge

13qter, 13q34, Bleu

D12Z3, 12p11.1-q11.1, Vert



Chromosome 12 Alpha Satellite Probe est une sonde de séquence répétée marquée en vert qui reconnaît la séquence centromérique D12Z3 répétée. La sonde D13S319 marquée en rouge couvre une région de 156kb qui comprend la totalité du gène DLEU1 et la majorité du gène DLEU2, ainsi que les marqueurs D13S319, D13S272 et RH47934. La sonde spécifique au sous-télomère 13qter, marquée en bleu, permet d'identifier le chromosome 13 et agit comme sonde de contrôle.



Le composant P53 est composé d'une sonde de 161kb, marquée en rouge qui couvre la totalité du gène P53 (TP53) et des régions flanquantes. Le composant ATM est composé d'une sonde de 182kb. Elle est marquée en vert et couvre l'extrémité télomérique du gène NPAT et l'extrémité centromérique du gène ATM au-delà du marqueur D11S3347.

Matériel fourni

D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe:
50 µl par flacon (5 tests) ou 100 µl par flacon (10 tests)

P53 (TP53)/ATM Probe :

50 µl par flacon (5 tests) ou 100 µl par flacon (10 tests)

Les sondes sont fournies préalablement mélangées dans une solution d'hybridation (formamide, sulfate de dextrane, solution saline de citrate de sodium (SSC)) et sont prêtes à l'emploi.

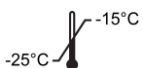
Contre-coloration : 150 µl par flacon (15 tests)

La contre-coloration DAPI/antifade est utilisée (ES : 0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)).

Avertissements et précautions

- Utilisation réservée au diagnostic *in vitro*. Exclusivement réservé à un usage professionnel.
- Le port de gants est obligatoire lors de la manipulation de sondes ADN et de contre-coloration DAPI.
- Les mélanges des sondes contiennent du formamide, un agent tératogène. Ne pas respirer les vapeurs et éviter tout contact cutané. Ce produit doit être manipulé avec précaution : le port de gants et d'une blouse de laboratoire est obligatoire.
- La coloration DAPI est potentiellement cancérigène. Ce produit doit être manipulé avec précaution : le port de gants et d'une blouse de laboratoire est obligatoire.
- Les matériaux dangereux doivent être éliminés conformément aux directives de votre établissement relatives à l'élimination des déchets dangereux.
- Les opérateurs doivent pouvoir distinguer les couleurs rouge, bleue et verte.
- Le non-respect du protocole spécifié et des instructions relatives aux réactifs peut affecter les performances du produit et entraîner des faux positifs/négatifs.
- La sonde ne doit pas être diluée ou mélangée avec d'autres sondes.
- La non-utilisation de 10 µl de sonde durant l'étape de pré-dénaturation du protocole peut affecter les performances et entraîner des faux positifs/négatifs.

Conservation et manipulation



Le kit doit être conservé entre -25 °C et -15 °C au congélateur jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquetage du kit. La sonde et les flacons de contre-coloration doivent être conservés dans l'obscurité.



La sonde reste stable pendant les cycles de congélation/décongélation qui interviennent dans le cadre d'une utilisation normale (un cycle correspond au retrait puis au remplacement de la sonde au congélateur). Elle est photostable jusqu'à 48 heures après une exposition continue à la lumière. Il est essentiel de limiter l'exposition aux variations de lumière et de température.

Équipement et matériel nécessaires non fournis

L'équipement utilisé doit être calibré :

- Plaque chauffante (avec plaque solide et contrôle précis de la température jusqu'à 80 °C)
- Micropipettes calibrées de volume variable et embouts de 1 µl à 200 µl
- Bain-marie avec contrôle précis de la température à 37 °C et 72 °C
- Tube pour microcentrifugeuse (0,5 ml)
- Microscope à fluorescence (consulter la section Recommandations relatives à la microscopie à fluorescence)
- Microscope à contraste de phase
- Bocaux Coplin propres en plastique, céramique ou verre réfractaire
- Forceps
- pH-mètre calibré (ou bandelettes de pH pouvant mesurer un pH de 6,5 à 8,0)
- Récipient humidifié
- Huile d'immersion de l'objectif du microscope à fluorescence
- Centrifugeuse de paillasse
- Lames pour microscope
- Lamelles couvre-objet de 24 x 24 mm
- Minuteur
- Incubateur à 37 °C
- Colle à base de caoutchouc
- Agitateur vortex
- Éprouvettes graduées
- Agitateur magnétique
- Thermomètre calibré

Équipement en option non fourni

- Chambre de séchage cytogénétique

Réactifs nécessaires, mais non fournis

- Solution saline de citrate de sodium (SSC) x20
- Éthanol à 100 %
- Tween-20
- Hydroxyde de sodium (NaOH) 1 M
- Acide chlorhydrique (HCl) 1 M
- Eau purifiée

Recommandations relatives à la microscopie à fluorescence

Utiliser une lampe à mercure de 100 watts ou un équivalent, et des objectifs plans apochromatiques à immersion dans l'huile x60/63 ou x100 pour une visualisation optimale. Les fluorophores utilisés pour cet ensemble de sondes excitent et émettent les longueurs d'onde suivantes :

Fluorochrome	Excitation _{max} [nm]	Émission _{max} [nm]
Aqua	418	467
Vert	495	521
Rouge	596	615

Vérifier que les filtres d'excitation et d'émission appropriés couvrant les longueurs d'onde indiquées ci-dessus sont installés dans le microscope. Utiliser un filtre passe-bande triple DAPI/spectre vert/spectre rouge ou un filtre passe-bande double pour spectre vert/rouge pour une visualisation simultanée optimale des fluorophores verts et rouges. Utiliser un filtre passe-bande unique pour spectre bleu pour une visualisation optimale du spectre bleu ou un filtre passe-bande triple pour spectre rouge/vert/bleu pour une visualisation simultanée des fluorophores verts, rouges et bleus.

Vérifier le microscope à fluorescence avant utilisation pour vérifier qu'il fonctionne correctement. Utiliser de l'huile d'immersion adaptée à la microscopie à fluorescence et formulée pour une auto-fluorescence faible. Éviter de mélanger du DAPI/antifade avec l'huile d'immersion pour microscope, car cela aura pour effet d'obscurcir les signaux. Suivre les recommandations du fabricant concernant la durée de vie de la lampe et l'ancienneté des filtres.

Préparation des échantillons

Ce kit est conçu pour être utilisé sur des cellules de sang périphérique ou de la moelle osseuse fixées dans une solution de Carnoy (3:1 méthanol/acide acétique), et préparées conformément aux directives du laboratoire ou de l'établissement. Préparer des échantillons séchés à l'air sur des lames pour microscope, conformément aux procédures cytogénétiques de référence. Le manuel *Cytogenetics Laboratory Manual* de l'AGT contient des recommandations sur le prélèvement des spécimens, la mise en culture, le recueil et la préparation des lames¹⁴.

Préparation des solutions

Solutions d'éthanol

DS214/CE-fr v008.00/2020-12-01 (H040 v5 / H041 v5 / H073 v3 / H074 v3)

Diluer de l'éthanol à 100 % avec de l'eau purifiée en respectant les proportions suivantes, puis mélanger soigneusement :

- Éthanol à 70 % : 7 volumes d'éthanol à 100 % pour 3 volumes d'eau purifiée
- Éthanol à 85 % : 8,5 volumes d'éthanol à 100 % pour 1,5 volumes d'eau purifiée

Les solutions peuvent être conservées jusqu'à 6 mois à température ambiante dans un contenant hermétique.

2 x solution SSC

Diluer un volume de solution 20xSSC avec 9 volumes d'eau purifiée et mélanger soigneusement. Vérifier le pH et l'ajuster à 7,0 à l'aide de NaOH ou de HCl si nécessaire. La solution peut être conservée jusqu'à 4 semaines à température ambiante dans un contenant hermétique.

0,4 x solution SSC

Diluer un volume de solution 20xSSC avec 49 volumes d'eau purifiée et mélanger soigneusement. Vérifier le pH et l'ajuster à 7,0 à l'aide de NaOH ou de HCl si nécessaire. La solution peut être conservée jusqu'à 4 semaines à température ambiante dans un contenant hermétique.

2 x SSC, solution Tween-20 à 0,05 %

Diluer un volume de solution 20xSSC avec 9 volumes d'eau purifiée. Ajouter 5 µl de Tween-20 pour 10 ml et mélanger soigneusement. Vérifier le pH et l'ajuster à 7,0 à l'aide de NaOH ou de HCl si nécessaire. La solution peut être conservée jusqu'à 4 semaines à température ambiante dans un contenant hermétique.

Protocole FISH

(Remarque : limiter en tout temps l'exposition de la sonde et de la contre-coloration à la lumière du laboratoire.)

Préparation des lames

1. Déposer une goutte d'échantillon cellulaire sur une lame pour microscope en verre. Laisser sécher. (**Facultatif, en cas d'utilisation d'une chambre de séchage cytogénétique** : les gouttes doivent être appliquées sur les lames à l'aide d'une chambre de séchage cytogénétique. La chambre doit fonctionner à environ 25 °C avec un taux d'humidité de 50 % pour garantir l'application optimale de l'échantillon cellulaire. En l'absence de chambre de séchage cytogénétique, il est possible d'utiliser une hotte aspirante.)
2. Immerger la lame dans 2xSSC pendant 2 minutes à température ambiante (TA) sans agitation.
3. Déshydrater par une série de bains d'éthanol (70 %, 85 % et 100 %), pendant 2 minutes à TA à chaque fois.
4. Laisser sécher.

Pré-dénaturation

5. Retirer la sonde du congélateur et la laisser se réchauffer à TA. Centrifuger rapidement les tubes avant utilisation.
6. Vérifier que la solution de la sonde est mélangée de façon homogène à l'aide d'une pipette.
7. Prélever 10 µl de sonde par test et transférer ce volume dans un tube de microcentrifugeuse. Replacer rapidement le reste de la sonde au congélateur.
8. Mettre la sonde et la lame de l'échantillon à préchauffer à 37 °C (+/- 1 °C) sur la plaque chauffante pendant 5 minutes.
9. Appliquer 10 µl de mélange de sonde sur l'échantillon cellulaire et appliquer soigneusement une lamelle couvre-objet. Sceller avec de la colle à base de caoutchouc et laisser la colle sécher complètement.

Dénaturation

10. Dénaturer l'échantillon et la sonde simultanément en chauffant la lame sur une plaque chauffante à 75 °C (+/- 1 °C) pendant 2 minutes.

Hybridation

11. Placer la lame dans un contenant humide et opaque à 37 °C (+/- 1 °C) toute la nuit.

Lavages post-hybridation

12. Retirer le DAPI du congélateur et le laisser se réchauffer à TA.
13. Retirer soigneusement la lamelle couvre-objet et toutes les traces de colle.
14. Immerger la lame dans 0,4 x SSC (pH 7,0) à 72 °C (+/- 1 °C) pendant 2 minutes sans agitation.
15. Vider la lame et l'immerger dans 2 x SSC et Tween-20 à 0,05 % à TA (pH 7,0) pendant 30 secondes sans agitation.
16. Vider la lame et appliquer 10 µl de DAPI/antifade sur chaque échantillon.
17. Appliquer une lamelle couvre-objet, éliminer les bulles d'air et laisser la couleur se développer dans le noir pendant 10 minutes.
18. Observer avec un microscope à fluorescence (voir **Recommandations relatives à la microscopie à fluorescence**).

Stabilité des lames finalisées

Les lames finalisées restent analysables jusqu'à 1 mois si celles-ci sont conservées dans l'obscurité à TA ou à une température inférieure.

Recommandations sur les procédures

1. La cuisson et le vieillissement des lames peuvent réduire la fluorescence du signal.
2. L'utilisation d'autres réactifs que ceux fournis ou recommandés par CytoCell Ltd. peut avoir une influence négative sur les conditions d'hybridation.
3. Utiliser un thermomètre calibré pour mesurer la température des solutions, des bains-maries et des incubateurs, car ces températures sont essentielles pour garantir des performances optimales du produit.

4. Les concentrations, le pH et les températures du lavage sont importants, car une stringence faible peut entraîner une liaison non spécifique de la sonde, et une stringence élevée une perte de signal.
5. Une dénaturation incomplète peut entraîner une perte de signal, et une dénaturation excessive peut également entraîner une liaison non spécifique.
6. L'hybridation excessive peut entraîner des signaux supplémentaires ou inattendus.
7. Les utilisateurs doivent optimiser le protocole pour leurs propres échantillons avant d'utiliser le test à des fins diagnostiques.
8. Des conditions sous-optimales peuvent entraîner une liaison non spécifique qui peut être interprétée de façon erronée comme un signal de la sonde.

Interprétation des résultats

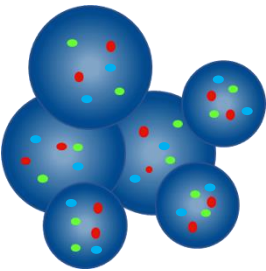
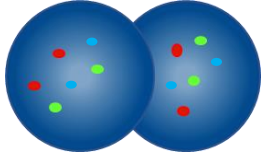
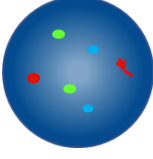
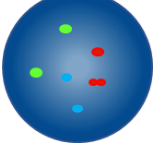
Évaluation de la qualité des lames

La lame ne doit pas être analysée dans les cas suivants :

- Les signaux sont trop faibles pour permettre une analyse avec des filtres uniques. Pour l'analyse, les signaux doivent être clairs, distincts et faciles à évaluer.
- L'analyse est obstruée par un grand nombre de cellules agglutinées ou se chevauchant.
- Plus de 50 % des cellules ne sont pas hybridées.
- Les particules fluorescentes sont trop nombreuses entre les cellules et/ou un halo fluorescent interfère avec le signal. Une lame optimale comporte un arrière-plan sombre ou noir et propre.
- Les bords des noyaux cellulaires ne peuvent pas être distingués et ne sont pas intacts.

Directives d'analyse

- Chaque échantillon doit être analysé et interprété par deux analystes. Toute différence doit être évaluée par un troisième analyste.
- Chaque analyste doit être qualifié conformément aux normes nationales reconnues.
- Chaque analyste doit évaluer indépendamment 100 noyaux pour chaque échantillon. Le premier analyste doit commencer l'analyse par le côté gauche de la lame et le deuxième par le côté droit.
- Chaque analyste doit consigner ses résultats dans des fiches distinctes.
- Seuls les noyaux intacts doivent être analysés. Les noyaux se chevauchant, agglutinés ou couverts par des débris cytoplasmiques ou associés à un degré élevé d'auto-fluorescence ne doivent pas être analysés.
- Éviter les zones présentant des débris cytoplasmiques trop nombreux ou une hybridation non spécifique.
- L'intensité du signal peut varier, même avec un seul noyau. Dans ce cas, utiliser des filtres uniques et/ou ajuster le plan focal.
- Le signal peut apparaître diffus si les conditions sont suboptimales. Si deux signaux de la même couleur se touchent, ou si la distance qui les sépare est inférieure à la largeur de deux signaux, ou lorsqu'un brin ténu connecte les deux signaux, ils doivent être comptés comme un seul et même signal.
- Si le caractère analysable d'une cellule est incertain, ne pas l'analyser.

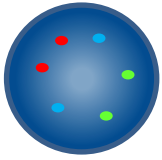
Directives d'analyse	
	Ne pas compter lorsque les noyaux sont trop proches pour en déterminer les limites.
	Ne pas compter les noyaux qui se chevauchent lorsque les surfaces des deux noyaux ne sont pas visibles.
	Compter comme deux signaux rouges, deux signaux bleus et deux signaux verts, si l'un des deux signaux rouges est diffus.
	Compter comme deux signaux rouges, deux signaux bleus et deux signaux verts, si l'espace d'un signal rouge est inférieur à la largeur de deux signaux.

Résultats attendus

D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe

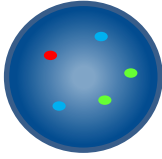
Séquence de signaux normaux attendue

DS214/CE-fr v008.00/2020-12-01 (H040 v5 / H041 v5 / H073 v3 / H074 v3)

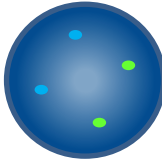


Pour une cellule normale, deux signaux rouges, deux signaux bleus et deux signaux verts (2R, 2B, 2V) sont attendus.

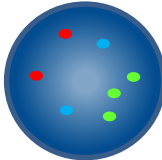
Séquences de signaux anormaux attendues



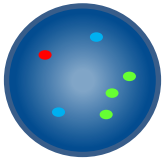
Dans une cellule présentant une délétion hémizygotique du locus D13S319, la séquence de signaux attendue correspondra à un signal rouge, deux signaux bleus et deux signaux verts (1R, 2B, 2V).



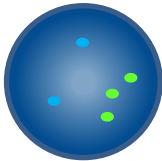
Dans une cellule présentant une délétion homozygote du locus D13S319, la séquence de signaux attendue correspondra à aucun signal rouge, deux signaux bleus et deux signaux verts (0R, 2B, 2V).



Dans une cellule présentant une trisomie 12 et un statut de D13S319 normal, la séquence de signaux attendue correspondra à deux signaux rouges, deux signaux bleus et trois signaux verts (2R, 2B, 3V).



Dans une cellule présentant une trisomie 12 et un statut de délétion de D13S319 hémizygotique, la séquence de signaux attendue correspondra à un signal rouge, deux signaux bleus et trois signaux verts (1R, 2B, 3V).

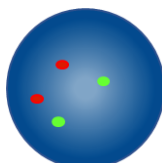


Dans une cellule présentant une trisomie 12 et un statut de délétion de D13S319 homozygote, la séquence de signaux attendue correspondra à aucun signal rouge, deux signaux bleus et trois signaux verts (0R, 2B, 3V).

D'autres séquences de signaux sont possibles pour les spécimens aneuploïdes/déséquilibrés.

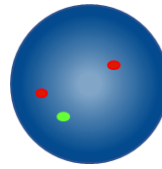
P53/ATM Probe

Séquence de signaux normaux attendue

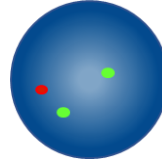


Pour une cellule normale, deux signaux rouges et deux signaux verts (2R, 2V) sont attendus.

Séquences de signaux anormaux attendues



Dans une cellule présentant une délétion d'ATM, la séquence de signaux attendue correspondra à deux signaux rouges et un signal vert (2R, 1V).



Dans une cellule présentant une délétion de P53, la séquence de signaux attendue correspondra à un signal rouge et à deux signaux verts (1R, 2V).

D'autres séquences de signaux sont possibles pour les spécimens aneuploïdes/déséquilibrés.

Réactivité croisée connue

La sonde verte D12Z3 peut montrer une hybridation croisée avec 3c, 6c, 7c et 10c.

Signalement des événements indésirables

Si vous pensez que ce dispositif a présenté un dysfonctionnement ou une détérioration de ses caractéristiques de performances, susceptible d'avoir contribué à un événement indésirable (ex. : retard ou erreur de diagnostic/traitement), vous devez le signaler au fabricant sans délai (**courriel** : vigilance@ogt.com).

Si applicable, l'événement doit également être signalé à l'autorité nationale compétente. Vous trouverez une liste des interlocuteurs pour les questions de vigilance à l'adresse suivante : <http://ec.europa.eu/growth/sectors/medical-devices/contacts/>.

Caractéristiques de performances spécifiques

Spécificité analytique

La spécificité analytique correspond au pourcentage de signaux qui s'hybrident au locus correct et nulle part ailleurs. La spécificité analytique a été établie par l'analyse de 200 loci cibles. La spécificité analytique a été calculée comme le nombre de signaux FISH hybridés au locus correct divisé par le nombre total de signaux FISH hybridés.

Tableau 1 Spécificité analytique de CLL PROFILER Kit

Trousse	Sonde	Locus cible	Nombre de signaux hybridés au locus correct	Nombre total de signaux hybridés	Spécificité (%)
D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe	Rouge D13S319	13q14.2	200	200	100
	Bleu 13qter	13q34	200	200	100
	Vert D12Z3	12p11.1-q11.1	200	200	100
P53/ATM Probe	Rouge P53	17p13	200	200	100
	Vert ATM	11q22.3	200	200	100

Sensibilité analytique

La sensibilité analytique correspond au pourcentage de cellules en interphase évaluables dans la séquence de signaux normaux attendue. La sensibilité analytique a été établie en analysant des cellules en interphase de plusieurs échantillons normaux. La sensibilité a été calculée comme le pourcentage de cellules évaluables pour la séquence de signaux attendue (avec un intervalle de confiance de 95 %).

Tableau 2 Sensibilité analytique de CLL PROFILER Kit

Trousse	Nombre de cellules avec des séquences de signaux attendues	Nombre de cellules avec des signaux évaluables	Sensibilité (%)	Intervalle de confiance de 95 %
D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe	467	500	93,4	2,6
P53/ATM Probe	479	500	95,8	1,7

Caractérisation des valeurs seuils normales

La valeur seuil normale, associée aux sondes FISH, correspond au pourcentage DS214/CE-fr v008.00/2020-12-01 (H040 v5 / H041 v5 / H073 v3 / H074 v3)

maximal de cellules en interphase évaluables pour une séquence de signaux anormaux spécifique selon laquelle un échantillon est considéré comme normal pour cette séquence de signaux.

La valeur seuil normale a été établie à l'aide d'échantillons provenant d'échantillons de patients normaux et positifs. Pour chaque échantillon, les séquences de signaux de 100 cellules ont été enregistrées. L'indice de Youden a été calculé pour identifier la valeur seuil selon laquelle l'équation sensibilité + spécificité-1 est maximisée.

Tableau 3 Caractérisation des valeurs seuils normales de CLL PROFILER Kit

Trousse	Réorganisation	Séquence de signaux anormaux	Indice de Youden	Seuil normal (%)
D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe	Délétion hémizygote du D13S319	1R, 2B, 2V	0,96	6
	Trisomie 12	2R, 2B, 3V	0,99	4
P53/ATM Probe	Délétion P53	1R, 2V	0,99	8
	Délétion ATM	2R, 1V	0,99	8

Les laboratoires doivent vérifier les valeurs seuils à partir de leurs propres données^{15,16}.

Précision et reproductibilité

La précision est la mesure de la variation naturelle d'un test lorsqu'il est répété plusieurs fois dans des conditions identiques. Elle a été évaluée en analysant les répétitions d'un numéro de lot de sonde testé sur un seul et même échantillon, dans des conditions identiques au cours de la même journée.

La reproductibilité est une mesure de la variabilité d'un test et a été établie en termes de variabilité d'un échantillon à l'autre, d'un jour à l'autre et d'un lot à l'autre. La reproductibilité d'un jour à l'autre a été évaluée en analysant les mêmes échantillons sur trois jours différents. La reproductibilité d'un lot à l'autre a été évaluée en analysant les mêmes échantillons à l'aide de trois numéros de lot de sonde différents au cours de la même journée. La reproductibilité d'un échantillon à l'autre a été évaluée en analysant trois répliqués d'un échantillon au cours de la même journée. Pour chaque échantillon, les séquences de signaux de 100 cellules en interphase ont été enregistrées, et le pourcentage des cellules avec une séquence de signaux attendue a été calculé.

La reproductibilité et la précision ont été calculées comme l'écart-type (ET) entre les répliqués pour chaque variable et la moyenne de l'ET global.

Tableau 4 Reproductibilité et précision de CLL PROFILER Kit

Variable	Écart-type (ET)	
	D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe	P53/ATM Probe
Précision	1,28	1,37
D'un échantillon à l'autre	1,30	1,60
D'un jour à l'autre	4,12	2,27
D'un lot à l'autre	2,04	1,77
Écart global	3,30	1,98

Performances cliniques

La performance clinique a été établie à partir d'un échantillon représentatif de la population cible du produit. Pour chaque échantillon, les séquences de signaux de ≥ 100 cellules en interphase ont été enregistrées. Une détermination des cas normaux/anormaux a été effectuée en comparant le pourcentage de cellules associé à la séquence de signaux anormaux spécifique à la valeur seuil normale. Les résultats ont ensuite été comparés au statut connu de l'échantillon.

Les résultats des données cliniques ont été analysés afin de fournir les valeurs de sensibilité, de spécificité et de seuil avec une approche unilatérale.

Tableau 5 Performances cliniques de CLL PROFILER Kit

Réorganisation	Sensibilité clinique (taux de vrais positifs, TVP)	Spécificité clinique (taux de vrais négatifs, TVN)	Taux de faux positifs (TFP) = 1 - Spécificité
<i>D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe</i>			
Délétion D13S319	96,6%	99,5%	0,5%
Trisomie 12	100%	100,0%	0%
<i>P53/ATM Probe</i>			
Délétion P53	100%	100%	0%
Délétion ATM	100%	100%	0%

Autres renseignements

Pour plus d'informations sur le produit, contactez le service d'assistance technique de CytoCell.

Tél. : +44 (0)1223 294048










Courriel : techsupport@cytozell.com

Site web : www.ogt.com

Références

- Rossi D, *et al.*, Blood. 2013 Feb 21;121(8):1403-12
- Baliakas P, *et al.*, Leukemia. 2014;(April):1-8
- Stankovic *et al.*, Blood 2004;103(1):291-300
- Dohner *et al.*, N Eng J Med 2000;343:1910-1916
- Khanna *et al.*, Nature Genetics 1998;20(4):398-400
- Juliusson G *et al.*, N Eng J Med 1990;323:720-4
- Puiggros *et al.*, Biomed Res Int 2014;1-13
- Kasar *et al.*, Nature Communications 2015;6:1-12
- Hammarsund M *et al.*, FEBS Letters 2004;556:75-80
- Van Dyke DL *et al.*, Br J Haematology 2009;148:544-50
- Liu Y *et al.*, Oncogene 1997;15:2463-73
- Wolf S *et al.*, Hum Mol Genet 2001;10:1275-85
- Swerdlow *et al.*, (eds.) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue, Lyon, France, 4th edition, IARC, 2017
- Arsham, MS., Barch, MJ. and Lawce HJ. (eds.) (2017) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
- Mascarello JT, Hirsch B, Kearney HM, et al. Section E9 of the American College of Medical Genetics technical standards and guidelines: fluorescence in situ hybridization. Genet Med. 2011;13(7):667-675.
- Wiktor AE, Dyke DLV, Stupca PJ, Ketterling RP, Thorland EC, Shearer BM, Fink SR, Stockero KJ, Majorowicz JR, Dewald GW. *Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice*. Genetics in Medicine. 2006;8(1):16-23.

Guide des symboles

REF	fr : Numéro de référence
	fr : Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
	fr : Numéro de lot
	fr : Consulter le mode d'emploi
	fr : Fabricant
	fr : Date de péremption
	fr : Limite de température
	fr : Tenir à l'abri de la lumière du soleil
	fr : Quantité suffisante pour <n> tests
	fr : Contenu

Brevets et marques déposées

CytoCell est une marque déposée de Cytozell Ltd.

Cytozell Ltd.

Oxford Gene Technology,
418 Cambridge Science Park,
Milton Road,
Cambridge, CB4 0PZ, UK
Tél. : +44(0)1223 294048
Fax : +44(0)1223 294986
Courriel : probes@cytozell.com
Site web : www.ogt.com