

AlloSeq cfDNA

Mode d'emploi

IFU090

Numéro de version : 8.0

Date de publication : Nov 2023

REF ASCF.1(24)-IVD

IVD **CE**

 **CareDx**[®]
CareDx Pty Ltd



CareDx Pty Ltd,
20 Collie Street,
Fremantle, WA 6160,
Australie



CareDx AB,
Franzégatan 5,
112 51, Stockholm,
Suède

EC **REP**

Qarad BV,
Cipalstraat 3,
2440 Geel,
Belgique

CH **REP**

Qarad Suisse S.A.,
World Trade Center, Avenue Gratta-Paille 2
1018 Lausanne,
Suisse
CHRN: CHRN-AR-20002058

Glossaire des symboles



Fabricant



Date de fabrication



Consulter le mode d'emploi



Date d'expiration

EC **REP**

Représentant autorisé
dans la CE/l'UE



Limite de température

LOT

Numéro de lot

REF

Numéro de référence

IVD

Diagnostic in vitro
Dispositif médical



Nombre de réactions

CE

Conformité européenne



Importateur pour l'UE

CH **REP**

Mandataire Suisse

Pour l'étiquetage des matériaux dangereux, consulter la section 5.2.

Sommaire

1.	Aperçu.....	3
1.1	Principe	3
1.2	Utilisation prévue et description du kit AlloSeq cfDNA	4
1.3	Limites et contre-indications	4
1.4	Collecte et préparation des échantillons	5
1.5	Lien donneur-receveur.....	5
1.6	Comment fonctionne l'analyse ?	6
1.7	Recommandations sur la quantité d'entrée d'ADN.....	6
1.8	Extraction d'ADN acellulaire (ADNa).....	6
2.	Protocole PCR.....	7
2.1	Informations sur le protocole	7
2.2	Prérequis	7
2.3	Configuration de la PCR	7
2.4	Nettoyage du produit PCR	9
2.5	Workflow de séquençage	10
3.	Interprétation des résultats	13
3.1	Validité de l'analyse	13
3.2	Résultats.....	13
4.	Caractéristiques des performances	13
4.1	Limite de détection de la méthode.....	13
4.2	Précision.....	13
4.3	Précision.....	13
4.4	Comparaison des méthodes	13
4.5	Contrôle de la qualité des lots de kits de réactifs.....	13
5.	Informations complémentaires	13
5.1	Contenu et exigences de stockage du kit AlloSeq cfDNA	14
5.2	Sécurité	14
5.3	Consommables et équipement.....	15
6.	Coordonnées.....	17
7.	Références	18

1. Aperçu

1.1 Principe

Le kit AlloSeq cfDNA kit et le logiciel AlloSeq cfDNA (dénommés ensemble le dosage AlloSeq cfDNA) forment un système permettant d'obtenir la quantification relative d'ADN sans cellule dérivé du donneur (ADNcf) dans un échantillon d'ADNcf dérivé d'un receveur de transplantation. L'ADN sans cellule est de l'ADN fragmenté présent dans le flux sanguin, qui provient de cellules touchées par un processus lésionnel ou d'élimination.

Après l'extraction d'ADNcf du plasma, cet ADN est amplifié à l'aide d'une PCR multiplexe qui comprend les PCR primers de 202 polymorphismes mononucléotidiques. Les produits PCR résultants sont séquencés sur un appareil Illumina, Inc. (Illumina) MiSeq ou MiniSeq (ou un autre séquenceur Illumina validé), et les données de séquence sont analysées à l'aide du logiciel AlloSeq cfDNA. En l'absence d'informations sur le génotype du donneur ou du receveur (voir ci-dessous), l'ADNa présent en tant que contributeur mineur d'ADNa dans les contextes de transplantation cardiaque, rénale et pulmonaire est considéré comme « issu du donneur » (DeVlaminck et coll., 2014 ; Khush et coll., 2019 ; DeVlaminck et coll., 2015 ; Grskovic et coll., 2016 ; Bloom et coll., 2017 ; Bromberg et coll., 2017).

Le kit AlloSeq cfDNA permet également l'amplification et le séquençage de l'ADN génomique pour identifier les génotypes du donneur et du receveur, ou des deux. Cette étape peut être effectuée avant ou en même temps que le test d'ADNcf et est requise pour la quantification de l'ADNcf dérivé du donneur chez les receveurs de transplantation hépatique, lorsque le taux d'ADNcf dérivé du donneur, contrairement aux transplantations de rein, de cœur ou de poumon, peut représenter une fraction majeure de l'ADNcf total du receveur (Schütz et al., 2017).

Un taux élevé d'ADNcf dérivé du donneur est associé à une lésion de l'organe transplanté et à un rejet (Grskovic et al. 2016, Bloom et al. 2017, Bromberg et al. 2017; Khush et al., 2019; DeVlaminck et al., 2015).

Ce *mode d'emploi* décrit la procédure d'utilisation du kit AlloSeq cfDNA. Les produits doivent être manipulés avec tout le soin et l'attention nécessaires. Nous recommandons à tous les utilisateurs de lire la totalité du document avant de commencer la procédure. Les procédures d'utilisation du logiciel AlloSeq cfDNA se trouvent dans le mode d'emploi du logiciel AlloSeq cfDNA.

Le test AlloSeq cfDNA offre les caractéristiques suivantes :

- ✓ Préparation rapide et facile des échantillons.
Préparez jusqu'à 24 bibliothèques en 2,5 heures environ, avec seulement 1,5 heure de temps de manipulation.
- ✓ Faible apport d'ADN.
Qualité élevée des données et performances robustes avec une entrée recommandée de 10 ng pour l'ADN génomique et l'ADNa, nécessitant une faible concentration d'échantillon de 0,625 ng/μl.
- ✓ Sélection flexible du kit, du séquenceur et de la capacité.
 - Formats pris en charge : MiSeq Standard V3 flow cell, MiniSeq Mid Output Kit (300 cycles) et MiniSeq High Output Reagent Kit (150 cycles).
 - Capacité de séquençage flexible avec des bibliothèques contenant entre 6 et 24 échantillons
- ✓ Échantillon d'ADN au rapport généré par logiciel en moins de 24 heures.

1.2 Utilisation prévue et description du kit AlloSeq cfDNA

Utilisation prévue et description du produit

Le kit AlloSeq cfDNA est destiné à être utilisé avec le logiciel AlloSeq cfDNA pour mesurer la quantité relative d'ADNa dérivé du donneur (% dd-cfDNA) chez les receveurs de greffes d'organes solides. Le kit est destiné à être utilisé par un personnel formé dans des laboratoires réglementés et ne doit pas être utilisé comme seul paramètre pour prendre des décisions cliniques. Ce produit est destiné à être utilisé avec les séquenceurs Illumina MiSeq, MiniSeq ou tout autre séquenceur Illumina validé.

Résumé, explication et principes du test

Le test AlloSeq cfDNA est une méthode multiplexée basée sur la PCR permettant de préparer des bibliothèques pour le séquençage à partir de l'ADNa extrait du plasma recueilli dans des tubes Streck. Après l'extraction de l'ADNa du plasma, l'ADNa est amplifié à l'aide de paires d'amorces PCR couvrant 202 loci de polymorphisme nucléotidique simple (SNP). Les produits PCR obtenus sont séquencés sur un instrument MiSeq ou MiniSeq d'Illumina (Illumina, Inc.). Les données de séquençage sont analysées à l'aide du logiciel CareDx AlloSeq cfDNA, où le nombre de lectures des séquences amplifiées est utilisé pour mesurer la quantité d'ADNa provenant du donneur par rapport à la quantité totale d'ADNa provenant de l'échantillon de plasma du receveur. Enfin, le logiciel AlloSeq cfDNA indique le pourcentage d'ADNa provenant du donneur, ainsi que les paramètres de contrôle de qualité. Reportez-vous à la section 1.6 pour plus de détails.

1.3 Limites et contre-indications

Restrictions

- Les patients ayant reçu des transfusions de sang total ou d'autres transfusions sanguines contenant des composants de globules blancs dans le mois précédant le test AlloSeq cfDNA peuvent obtenir un résultat inexact. Les transfusions de globules rouges lavés ou les transfusions de concentrés de globules rouges déleucocytés n'ont pas d'incidence sur le résultat.
- Certains éléments indiquent que les dommages causés au greffon par des procédures invasives, telles que la biopsie, sont susceptibles de provoquer une élévation à court terme d'ADNa dérivé du donneur. Jusqu'à ce que des études définitives soient réalisées, AlloSeq cfDNA ne doit pas être utilisé sur des patients dans les 24 heures suivant une biopsie.
- Dans les cas où un patient reçoit une transplantation rénale répétée ou secondaire avec le ou les rein(s) transplanté(s) d'origine toujours en place, la contribution d'ADNa provenant de ou des organe(s) transplanté(s) antérieurement au plasma du receveur est actuellement inconnue. Les données provenant de patients retransplantés chez qui le ou les rein(s) antérieur(s) reste(nt) *in situ* suggèrent que AlloSeq cfDNA peut être utilisé chez les patients retransplantés d'une manière similaire à l'utilisation dans la population des transplantations d'un seul rein (Mehta, *et coll.* 2019).

Contre-indications

- Comme le test évalue les différences génétiques entre le donneur et le receveur, il n'est pas possible d'effectuer le test pour un receveur de greffe qui est un jumeau monozygote du donneur.
- Lorsque plus de deux génomes sont présents dans le plasma du receveur (plus que receveur + donneur), la contribution d'ADNa de chaque génome n'est pas différenciée par le test. Cela inclut la grossesse, en raison de la présence d'ADN fœtal dans le plasma maternel, et les greffes d'organes multiples provenant de donneurs différents, car les greffons introduisent chacun un génome unique (par exemple, rein/pancréas) et contribuent à des niveaux basaux différents d'ADNa, ce qui brouille l'interprétation des résultats.
- Un receveur de plusieurs organes transplantés provenant tous du même donneur présente une situation où des niveaux élevés d'ADNa provenant du donneur pourraient provenir d'un organe, d'un autre ou des deux. S'ils proviennent des deux, ils pourraient contribuer à des niveaux basaux différents, ce qui brouille l'interprétation des résultats. Par conséquent, le test AlloSeq cfDNA ne doit pas être utilisé pour les receveurs de greffes d'organes multiples provenant du même donneur.

- Les receveurs d'une greffe allogénique de sang ou de moelle osseuse qui ont reçu des cellules dont le génome est différent de celui du receveur (par exemple, un jumeau non monozygote) ne doivent pas subir le test AlloSeq cfDNA.

N'UTILISEZ PAS AlloSeq cfDNA chez les receveurs de greffes qui :

- Receveur ayant reçu une greffe d'un jumeau monozygote (identique) ;
- Ont subi une greffe allogénique de sang ou de moelle osseuse
- Sont enceintes
- Ont subi de multiples transplantations d'organes
- Receveur ayant reçu une transfusion sanguine contenant des leucocytes au cours des 30 derniers jours (les concentrés de globules rouges (CGR) lavés ou déleucocytés sont acceptables).
- Ont subi une biopsie au cours des 24 dernières heures.

1.4 Collecte et préparation des échantillons

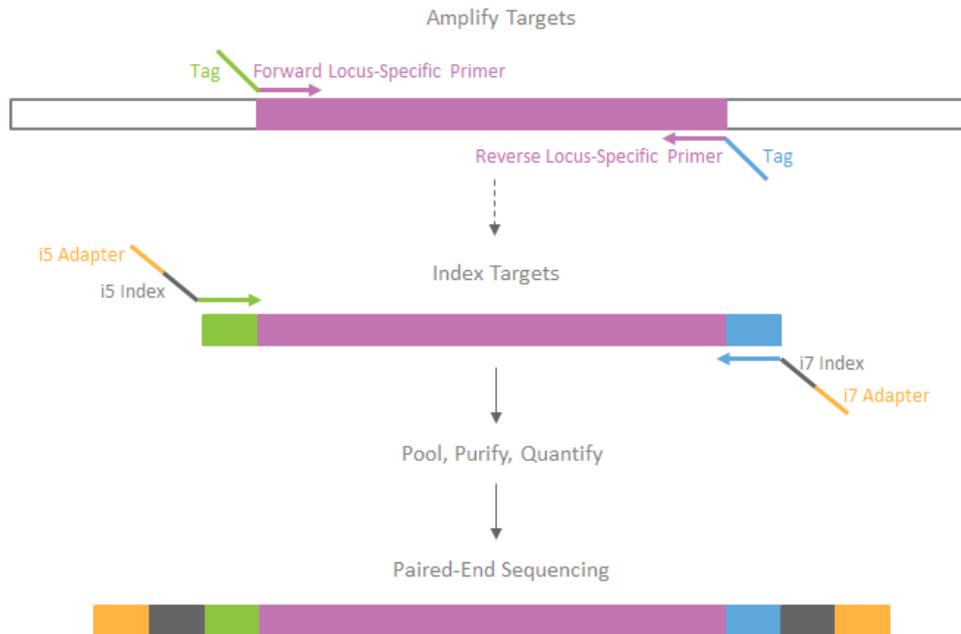
- Pour l'ADNa, nous recommandons de prélever un échantillon de sang dans Streck Cell-Free DNA BCT® et de procéder à la séparation du plasma dans les 7 jours suivant la prise de sang. Il convient de prélever deux échantillons de patients pour parer à toute éventualité.
- Les échantillons dans des tubes Streck qui sont ou ont été congelés ou stockés à 4 °C ou moins ne doivent pas être testés.
- Les échantillons dans des tubes Streck présentant une hémolyse supérieure à une trace/une légère quantité par inspection visuelle (environ ≥ 50 mg/dl) ne doivent pas être testés.
- L'ADNa extrait d'échantillons de sérum non recueillis dans des tubes Streck peut ne pas être compatible avec le test cfDNA dérivé du donneur en raison de la présence d'ADN génomique libéré des cellules du receveur par le processus de coagulation.
- La pureté et la concentration de l'ADN extrait doivent être testées pour en vérifier l'acceptabilité avant de procéder au test en utilisant des méthodes d'absorbance standard.
- La bilirubine, l'hémoglobine ou les triglycérides, lorsqu'ils sont présents à des niveaux élevés dans les échantillons de sang, sont des interférences courantes dans les tests de laboratoire (EP07-A2 : Interference Testing in Clinical Chemistry ; Approved Guideline – Seconde édition). La présence de ces interférents a été testée et n'affecte pas la performance du test.

1.5 Lien donneur-receveur

Le lien donneur-receveur est utilisé dans le calcul du résultat d'AlloSeq cfDNA. Un lien donneur-receveur incorrect affectera le résultat d'ADNa dérivé du donneur calculé. Dans certains cas, la différence entre le dd-cfDNA (ADNa dérivé du donneur) calculé avec un lien correct ou incorrect peut avoir un impact sur l'interprétation du résultat.

1.6 Comment fonctionne l'analyse ?

Le test AlloSeq cfDNA est un test ciblé de séquençage de nouvelle génération (NGS) qui utilise les différences entre les loci de polymorphisme nucléotidique unique (SNP) pour mesurer la quantité d'ADN provenant du donneur par rapport à la quantité totale d'ADN provenant d'un échantillon de plasma. 202 loci SNP amplifiés par PCR constituent une bibliothèque de séquençage qui est indexée de manière unique et combinée à d'autres bibliothèques de séquençage (de 6 à 24 échantillons d'ADN individuels) pour être séquençée en une seule série de séquençage. Sur la base d'un algorithme breveté qui utilise les fréquences de population connues des SNP séquençés et les distributions attendues des allèles, le pourcentage de l'ADN qui provient de l'organe transplanté est calculé.



Le test est une PCR multiplex unique dans laquelle la PCR spécifique au SNP et la PCR de l'index ont lieu dans la même réaction. Le kit comprend un pool d'amorces oligonucléotidiques spécifiques des SNP pour amplifier les SNP ciblés. En combinaison avec des adaptateurs d'index, le protocole de cyclage unique amplifie les régions spécifiques du locus et indexe les bibliothèques simultanément. Les échantillons indexés sont ensuite regroupés pour préparer le séquençage. Une fois le séquençage terminé, les données sont analysées à l'aide du logiciel AlloSeq cfDNA qui indique le pourcentage d'ADN provenant du donneur.

1.7 Recommandations sur la quantité d'entrée d'ADN

Quantifiez l'ADN d'entrée avant de commencer le protocole. Nous recommandons d'utiliser une méthode de quantification fluorimétrique qui utilise des colorants de liaison à l'ADN double brin, comme Qubit™ ou PicoGreen®, conformément aux instructions du fabricant.

Il est recommandé d'utiliser 10 ng d'ADN par échantillon dans le kit AlloSeq cfDNA. Diluez l'ADN dans de l'eau exempte de RNase/DNase de sorte que le volume d'entrée de l'échantillon d'ADN par puits soit de 16 µl.

1.8 Extraction d'ADN acellulaire (ADNa)

Les mesures d'AlloSeq cfDNA seront affectées par la présence d'ADN génomique dans le matériel de départ. L'ADN génomique est libéré lors de la lyse des cellules sanguines nucléées et est difficile à éliminer lors de l'extraction. Un échantillon d'ADNa contaminé par de l'ADN génomique supprimera le pourcentage de mesures d'ADNa provenant du donneur. Pour minimiser la contamination de l'ADN cellulaire, utilisez les méthodes suivantes pour extraire l'ADN acellulaire des échantillons de sang :

- ✓ Prélevez du sang dans deux (2) Streck Cell-Free DNA BCT® par patient. Au minimum, un tube Streck plein (≥ 8 ml de sang) est nécessaire. Ces tubes de prélèvement sanguin sont conçus pour stabiliser les cellules sanguines nucléées, afin de permettre des extractions d'ADNa de haute qualité.
- ✓ Isolez le plasma selon les instructions du fabricant (le protocole de double spin 2 est recommandé).
- ✓ Utilisez le QiAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen) pour extraire l'ADNa du plasma.

2. Protocole PCR

2.1 Informations sur le protocole

- Suivez le protocole AlloSeq cfDNA dans l'ordre indiqué en utilisant les paramètres spécifiés.
- Avant de procéder, vérifiez le contenu du kit et assurez-vous que vous disposez des consommables et de l'équipement nécessaires. Reportez-vous aux sections Contenu du kit et Consommables et équipement du chapitre 3.

2.2 Prérequis

- Les instruments sont correctement calibrés, entretenus et font l'objet d'un plan de maintenance selon les besoins.
- Des procédures opérationnelles normalisées (PON) sont en place et contrôlées.
- De bonnes pratiques de laboratoire (Good Laboratory Practices [GLP]) ont été mises en œuvre et sont respectées dans l'environnement de l'utilisateur.
- Le protocole a été validé par l'utilisateur final.
- Les utilisateurs connaissent la procédure du QiAamp Circulating Nucleic Acid Kit de Qiagen pour extraire le l'ADNa (n° de cat. Qiagen 55114), l'utilisation du support DYNAMAG-2, le protocole de purification de l'ADN à base de billes magnétiques, la quantification Qubit™ (ou équivalent), la configuration du programme du thermocycleur et la réaction de séquençage Illumina, y compris l'utilisation des contrôles de référence PhiX. Sauf indication contraire dans le présent mode d'emploi, reportez-vous aux procédures opératoires normalisées internes et/ou au manuel d'utilisation du fournisseur pour les instructions.

2.3 Configuration de la PCR

Avant de commencer, assurez-vous que le Thermal Cycler est programmé pour minimiser l'exposition de la plaque à la température ambiante après la configuration de la plaque.

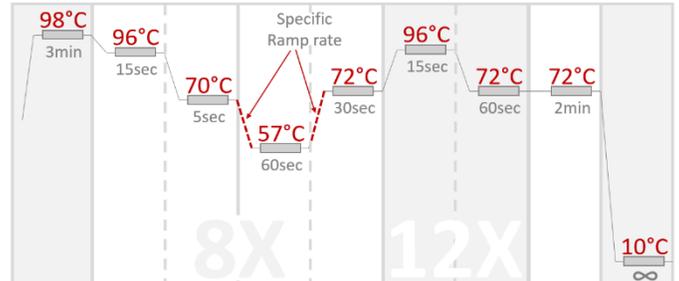
Le programme de PCR doit être configuré pour un volume de réaction de 40 μ l et nécessite des réglages de variations de température spécifiques pour les 8 premières étapes d'annexion (57 °C) et d'élongation (72 °C). Les équivalents de variation de température pour différents thermocycleurs et PCR Cycling Protocol sont indiqués dans le tableau 1 et le tableau 2. Les réactifs suivants sont nécessaires pour la configuration de la PCR :

- AlloSeq cfDNA PCR Mix
- AlloSeq cfDNA PCR Enzyme
- AlloSeq cfDNA SNP Primer Pool
- AlloSeq cfDNA Index Primers (avant, i5 et arrière, i7)

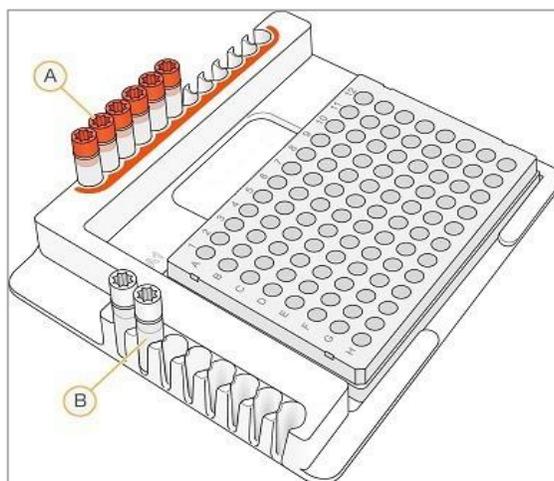
Décongelez les réactifs à température ambiante, puis placez-les sur de la glace. Conservez les réactifs sur de la glace pendant l'installation.

Modèle	Vitesse de variation de température (°C/s)
ABI 9700	25 %
Veriti	18 %
ABI SimpliAmp	0,7 °C/s
Eppendorf Nexus (bloc en aluminium)	0,4 °C/s

Choisissez l'option de préchauffage du couvercle à 100 °C			
Température	Durée	Progression	Cycles
98 °C	3 min	Progression par défaut	1
96 °C	15 s	Progression par défaut	8
70 °C	5 s		
57 °C	60 s	Utilisez la variation de température appropriée pour votre Thermal Cycler à partir du tableau 1 ci-dessus.	12
72 °C	30 s		
96 °C	15 s	Progression par défaut	1
72 °C	60 s		
72 °C	2 min	Progression par défaut	1
10 °C	∞	Progression par défaut	1



- Diluez l'ADN de l'échantillon dans de l'eau exempte de nucléase jusqu'à 10 ng dans un volume final de 16 µl. Enregistrez la quantité finale d'ADN à utiliser dans le logiciel AlloSeq cfDNA.
- Dans une plaque PCR, sur la glace (si vous utilisez un porte-plaque, faites en sorte qu'il soit placé sur la glace), ajoutez 4 µl d'amorces d'indexation avant (i5) dans les puits d'échantillons appropriés, en fonction de la



disposition de la plaque définie dans la feuille d'échantillons.

- A Amorces d'indexation inverse (R) i7
(1–6 selon la disposition de la plaque pour les colonnes 1 à 6)
- B Amorces d'indexation avant (F) i5
(1–4 selon la disposition de la plaque pour les rangées 1 à 4)

- Ajoutez 4 µl d'amorces d'indexation R (i7) dans les puits d'échantillons appropriés.

REMARQUE : Pour réduire les risques de contamination du séquençage d'une série à l'autre, il est recommandé d'alterner la combinaison d'amorces i5 et i7 et l'utilisation des puits entre les séries. Pour réduire les risques de contamination du séquençage d'une série à l'autre, il faut également envisager d'effectuer des lavages d'entretien du séquenceur (tels que définis dans le guide de l'utilisateur du système MiSeq, pièce Illumina n° 15027617 ou dans le guide de l'utilisateur du système MiniSeq, pièce Illumina n° 1000000002695v03) de façon hebdomadaire, surtout lorsque la rotation des amorces d'index n'est pas possible.

- Ajoutez 16 µl de votre ADN préparé dans chaque puits d'échantillon.

5. Préparez un Master Mix dans un tube Eppendorf de 1,5 ml pour le nombre approprié d'échantillons nécessaires en utilisant le tableau suivant :

Réactif	Composants de PCR Master-Mix (MM)	
	Volume, 1 puits (µl)	Volume utilisé pour faire le MM pour « x » échantillons, en tenant compte des 12 % de volume mort recommandé
AlloSeq cfDNA PCR Mix	13.0	(13,0) *x*1,12
AlloSeq cfDNA PCR Enzyme	0.8	(0,8) *x*1,12
AlloSeq cfDNA SNP Primer Pool	2.2	(2,2) *x*1,12
Volume total	16.0	

REMARQUE : Après l'ajout de l'enzyme, minimisez autant que possible l'exposition à la température ambiante pour limiter l'amplification non spécifique. Par exemple, démarrez le thermocycleur immédiatement après l'installation. Il a été démontré que les délais > 1 heure après l'ajout de l'enzyme diminuent le score Q > 30.

6. Vortexez le Master Mix pendant 5 secondes pour le mélanger, et centrifugez brièvement.

REMARQUE : Aliquotez le Master Mix dans des bandes de tubes pour permettre l'utilisation de pipettes multicanaux.

- Ajoutez 16 µl du Master Mix préparé ci-dessus dans chaque puits d'échantillon, appliquez le Microseal 'B' et faites immédiatement vortexer la plaque pendant 5 s pour mélanger.
- Centrifugez immédiatement la plaque à 1 000 x g pendant 30 secondes. Vérifiez l'absence de bulles. S'il y en a, remettez la plaque sur la glace pendant 5 minutes, puis répétez l'étape de centrifugation.
- Placez immédiatement la plaque dans le Thermal Cycler, dans une zone post-amplification et exécutez le PCR Cycling Protocol. Le PCR Cycling Protocol prend environ 1 heure.
- Il s'agit d'un point d'arrêt sans risque. Vous pouvez laisser la plaque sur le thermal cycler jusqu'à 48 heures pour une étape d'arrêt à 10 °C, si nécessaire. Ensuite, passez à la procédure de lavage ci-dessous.

2.4 Nettoyage du produit PCR

Les réactifs suivants sont nécessaires pour le nettoyage des produits PCR :

- AlloSeq cfDNA Purification Beads
- AlloSeq cfDNA Resuspension Buffer

Avant de commencer, assurez-vous d'avoir effectué les opérations suivantes :

- Retirez les Purification Beads du stockage à 2–8 °C et équilibrez-les à température ambiante (au moins 30 minutes). Avant l'utilisation, agitez les billes au vortex jusqu'à ce qu'elles soient complètement remises en suspension (vérifier visuellement qu'aucun culot ne reste non remis en suspension), puis centrifugez brièvement pour que toutes les billes se retrouvent au fond du tube.
- Retirez le Resuspension Buffer du stockage à 2–8 °C.
- Retirez la plaque PCR du stockage à 2–8 °C ou du Thermal Cycler et l'équilibrez à température ambiante. Centrifugez à 1 000 x g pendant 30 secondes.
- Préparez de l'éthanol à 80 %, 3 ml au total.

2.4.1 Mélange des AlloSeq cfDNA Purification Beads et du produit PCR

- Déterminez le volume de chaque échantillon à regrouper dans un volume final de 120 µl, comme dans les exemples du tableau ci-dessous :

Nombre d'échantillons préparés	Volume de chaque échantillon à regrouper (µl)
10	12
15	8
16	7.5
24	5

2. En utilisant le volume déterminé ci-dessus, poolez le nombre d'échantillons requis dans un tube Eppendorf de 1,5 ml.
3. Ajoutez 100 µl de AlloSeq cfDNA Purification Beads au tube d'échantillons groupés.
4. Placez le tube au vortex pendant 5 secondes à pleine vitesse et incubez le tube pendant 5 minutes à température ambiante.
5. Placez le tube sur le support DYNAMAG-2 et laissez les perles s'agglomérer pendant 5 minutes, ou jusqu'à ce que le liquide soit clair.
6. Maintenez le tube sur le support magnétique et éliminez tout le surnageant avec une pipette P200.

2.4.2 Lavages à l'éthanol (EtOH)

1. Ajoutez 1 ml d'EtOH à 80 % fraîchement préparé dans le tube sans déranger les billes. Veillez à laisser le tube sur le support magnétique.
2. Attendez 30 secondes ou jusqu'à ce que le liquide soit clair, puis retirez et jetez le surnageant, sans déranger les billes.
3. Avec une pipette P1000, retirez et jetez le surnageant résiduel.
4. Répétez les étapes 1 à 3 pour effectuer un deuxième lavage à l'EtOH à 80 %. Pour le dernier lavage, utilisez une pipette à déplacement plus petit pour éliminer tout résidu d'EtOH.
5. Séchez à l'air pendant 5 minutes, sans les bouchons (tube ouvert).

2.4.3 Remise en suspension et élution

1. Retirez le tube du support magnétique et ajoutez 35 µl de l'AlloSeq cfDNA Resuspension Buffer.
2. Placez le tube au vortex pendant 5 secondes à pleine vitesse et incubez le tube pendant 5 minutes à température ambiante.
3. Placez le tube sur le support DYNAMAG-2 et laissez les perles s'agglomérer pendant 5 minutes, ou jusqu'à ce que le liquide soit clair.
4. Sans toucher ni perturber les billes, transférez 32 µl de surnageant à l'aide d'une pipette à plus petit déplacement dans un nouveau tube Eppendorf de 1,5 mm.
5. Il s'agit d'un point d'arrêt sans risque. Conservez entre -15 et -25 °C jusqu'à 7 jours.
6. Déterminez la concentration du pool en utilisant une méthode fluorimétrique telle que PicoGreen® ou Qubit™.

REMARQUE : La concentration du pool peut être aussi faible que 0,3 ng/µl. Modifier le protocole de la méthode de quantification si nécessaire pour vérifier que les mesures sont dans la gamme de détection. Généralement, l'utilisation de 4 µl de pool de bibliothèques avec 196 µl de solution tampon + solution colorante est suffisante pour être dans la plage de quantification Qubit.

2.5 Workflow de séquençage

Cette section décrit les étapes nécessaires pour préparer la bibliothèque finale à charger dans l'instrument de séquençage. Veuillez consulter le manuel d'instructions du séquenceur d'Illumina pour obtenir des renseignements complets sur le flux de travail et le fonctionnement de l'instrument pour commencer un cycle de séquençage.

Sauf indication contraire, les instructions suivantes sont spécifiques à l'instrument MiSeq.

Des instructions supplémentaires spécifiques à l'instrument MiniSeq sont décrites dans les sections 2.5.2 et 2.5.3.

2.5.1 Dénaturation de la bibliothèque et dilution pour le séquençage

À cette étape du flux de travail, l'utilisateur doit décider s'il veut inclure le contrôle de séquençage PhiX v3 d'Illumina à une concentration finale de 1 % dans la bibliothèque de cfDNA. Selon le flux de travail choisi, différents protocoles énumérés ci-dessous doivent être suivis pour préparer la bibliothèque à charger dans la cartouche de réactifs Illumina.

Les réactifs suivants sont nécessaires pour la dénaturation et la dilution :

- a) Banque de séquençage final de l'étape précédente
- b) NaOH 2 N d'AlloSeq cfDNA, boîte 1 conservée entre -15 et -25 °C
- c) Eau de qualité PCR – non fournie
- d) Kit Illumina MiSeq v3 150 cycles, MiniSeq Mid Output Kit (300 cycles) ou MiniSeq High Output Reagent Kit (150 cycles) – non fourni
- e) [Facultatif] contrôle de séquençage Illumina PhiX v3 – non fourni

Avant de commencer, assurez-vous d'avoir effectué les opérations suivantes :

- Décongelez le 2N NaOH à température ambiante, puis placez-le sur de la glace.
 - Préparez du NaOH 0,2 N fraîchement dilué à utiliser pour PhiX et la dénaturation des échantillons : Mélangez 4 µl de NaOH 2 N avec 36 µl d'eau de qualité laboratoire. Utilisez cette dilution fraîche dans les 12 heures.
 - Décongelez la cartouche de séquençage dans un bain-marie à température ambiante comme indiqué dans le guide du système de séquençage.
 - Placez le HT1 décongelé sur de la glace pour le refroidir.
 - [Facultatif] Dénaturez et diluez le contrôle de séquençage PhiX à 20 pM, comme suit :
 - Dans un tube Eppendorf de 1,5 ml, mélangez 2 µl de PhiX 10 nM et 2 µl de NaOH 0,2 N.
 - Mélangez au vortex, centrifugez et incubez à température ambiante pendant 5 minutes.
 - Ajoutez 996 µl de HT1 pour diluer votre PhiX dénaturé à une concentration finale de 20 pM PhiX.
 - Générez une feuille d'échantillons en suivant les instructions de la notice d'utilisation du logiciel.
- REMARQUE :** La solution de NaOH absorbera immédiatement le CO₂ de l'atmosphère, ce qui altère le pH et les performances du réactif. Vérifiez que le tube de 2N NaOH est scellé lorsqu'il n'est pas utilisé.
- En cas de séquençage sur l'instrument MiniSeq, reportez-vous aux sections 2.5.2 et 2.5.3 pour spécifier les paramètres d'exécution et les échantillons.

Procédure (sans contrôle PhiX)

1. Diluez la bibliothèque finale à 2 nM dans l'AlloSeq cfDNA Resuspension Buffer. Si la concentration finale de la bibliothèque est en ng/µl, utilisez l'équation suivante pour convertir la concentration en nM :

$$\text{Concentration (nM)} = \frac{\text{Concentration (ng/}\mu\text{l)} * 1,000,000}{120,065}$$

2. Préparez du NaOH 0,2 N fraîchement dilué à utiliser pour la dénaturation de la bibliothèque 2 nM : Mélangez 4 µl de NaOH 2N avec 36 µl d'eau de qualité PCR. La solution de NaOH 0,2N doit être utilisée dans les 12 heures suivant sa préparation.
3. Dans un tube Eppendorf de 1,5 ml, ajoutez 15 µl de bibliothèque 2 nM et 5 µl de NaOH 0,2 N.
4. Agitez au vortex, centrifugez brièvement et incubez à température ambiante pendant 5 minutes.
5. Ajoutez 980 µl de HT1 réfrigéré pour porter la concentration de la bibliothèque à 30 pM.
6. Passez brièvement au vortex et centrifugez.
7. **Si vous utilisez un instrument MiSeq**, chargez 1 000 µl de la bibliothèque dénaturée à 30 pM dans la cartouche de séquençage Illumina MiSeq préalablement décongelée et préparée selon les recommandations du fabricant.
8. **Si vous utilisez un instrument MiniSeq**, diluez davantage la bibliothèque dénaturée à 30 pM, de l'étape 5 jusqu'à 3 pM, en ajoutant 100 µl de la bibliothèque dénaturée à 30 pM de l'étape 5 à 900 µl de HT1 réfrigéré. Passez brièvement au vortex et centrifugez. Chargez 1 000 µl de la bibliothèque dénaturée diluée à 3 pM dans la cartouche de séquençage Illumina MiniSeq préalablement décongelée et préparée selon les recommandations du fabricant.
9. Procédez conformément au manuel de l'utilisateur du séquenceur Illumina pour charger la cellule d'écoulement et la cartouche de réactifs dans l'instrument afin de commencer le cycle de séquençage. Assurez-vous d'utiliser une feuille d'échantillons préalablement préparée conformément aux instructions du manuel d'utilisation du logiciel AlloSeq cfDNA.

Procédure (avec contrôle PhiX)

1. Diluez la bibliothèque finale à 2 nM dans l'AlloSeq cfDNA Resuspension Buffer. Si la concentration finale de la bibliothèque est en ng/μl, utilisez l'équation suivante pour convertir la concentration en nM :

$$\text{Concentration (nM)} = \frac{\text{Concentration (ng/}\mu\text{l)} * 1,000,000}{120,065}$$

2. Préparez du NaOH 0,2 N fraîchement dilué à utiliser pour la dénaturation de la bibliothèque 2 nM : Mélangez 4 μl de NaOH 2 N avec 36 μl d'eau de qualité PCR. La solution de NaOH 0,2N doit être utilisée dans les 12 heures suivant sa préparation.
3. Dans un tube Eppendorf de 1,5 ml, ajoutez 15 μl de bibliothèque 2 nM et 5 μl de NaOH 0,2 N.
4. Dans un tube Eppendorf de 1,5 ml, mélangez 2 μl de PhiX 10 nM et 2 μl de NaOH 0,2 N.
5. Agitez les deux tubes au vortex, centrifugez brièvement et incubez à température ambiante pendant 5 minutes.
6. Ajoutez 980 μl de HT1 réfrigéré dans le tube de bibliothèque pour porter la concentration à 30 pM. Passez brièvement au vortex et centrifugez.
7. Ajoutez 996 μl de HT1 réfrigéré au tube PhiX pour porter la concentration à 20 pM. Passez brièvement au vortex et centrifugez.
8. Ajoutez 10 μl de la solution PhiX à 20 pM à 1 000 μl de la bibliothèque dénaturée de l'étape 6. Passez brièvement au vortex et centrifugez.
REMARQUE : La concentration finale du PhiX dans la banque est d'environ 1 %.
9. **Si vous utilisez un instrument MiniSeq**, diluez davantage la bibliothèque dénaturée à 30 pM contenant PhiX (de l'étape 8) jusqu'à 3 pM, en ajoutant 100 μl de la bibliothèque dénaturée à 30 pM à 900 μl de HT1 réfrigéré. Passez brièvement au vortex et centrifugez.
10. Chargez 1 000 μl de la bibliothèque finale de l'étape 9 sur la cartouche de séquençage Illumina préalablement décongelée et préparée selon les recommandations du fabricant.

2.5.2 Spécification des paramètres d'exécution d'un MiniSeq

1. Réglez les paramètres de configuration de l'analyse sur le MiniSeq au dossier de sortie souhaité (consultez le [guide du logiciel Run Manager local d'Illumina](#)).
2. Créez une exécution sur le gestionnaire d'exécution local à l'aide du module d'analyse Generate FASTQ (consultez l'[Illumina Local Run Manager Generate FASTQ Analysis Module Workflow Guide \(Guide du flux de travail du module d'analyse FASTQ du gestionnaire d'exécution local d'Illumina\)](#)).
 - a. Sélectionnez **TruSeq Amplicon** dans la liste déroulante Library Kit.
 - b. Sélectionnez **Dual-Indexed** pour le nombre de lectures d'index.
 - c. Spécifiez **Paired End** comme type de lecture.
 - d. Entrez le nombre de cycles (par exemple 76 x 8 x 8 x 76).
3. Agitez les deux tubes au vortex, centrifugez brièvement et incubez à température ambiante pendant 5 minutes.

2.5.3 Spécification des échantillons pour un cycle MiniSeq

Reportez-vous au [Local Run Manager Generate FASTQ Analysis Module Workflow Guide \(Guide du flux de travail du module d'analyse FASTQ du gestionnaire d'exécution local\)](#) pour obtenir des instructions générales sur les deux méthodes de saisie des échantillons (saisie manuelle des échantillons ou importation des échantillons).

3. Interprétation des résultats

3.1 Validité de l'analyse

La validité de l'exécution des données de séquençage est évaluée en mesurant la qualité des lectures de séquence dans le logiciel AlloSeq cfDNA. Plusieurs mesures de contrôle de la qualité sont évaluées et ces valeurs sont comparées à des seuils prédéfinis contenus dans le fichier du kit logiciel, afin de déterminer si la valeur du % dd-cfDNA déterminée est valide. Si l'une des mesures de contrôle de qualité ne répond pas aux critères de contrôle de qualité, aucune valeur de dd-cfDNA n'est affichée.

3.2 Résultats

Pour les échantillons répondant au seuil CQ, les valeurs % dd-cfDNA sont affichées par le logiciel et sont exportées dans un fichier TSV qui peut être utilisé et imprimé comme rapport.

4. Caractéristiques des performances

4.1 Limite de détection de la méthode

Avec l'apport recommandé de 10 ng d'ADNa, la limite de détection (LoD) d'AlloSeq cfDNA a été déterminée à 0,23 %. La limite du blanc (LoB) et la limite de quantification (LoQ) ont été déterminées à respectivement 0,18 % et 0,23 %.

4.2 Précision

AlloSeq cfDNA a été testé avec 29 échantillons uniques et bien caractérisés d'un % connu de dd-cfDNA (ou équivalent) et a montré une concordance avec les résultats orthogonaux avec un $R^2 = 0,91362$ pour les échantillons cliniques, 0,945799 pour les échantillons analytiques proches de la LoD/LoQ, et 0,999138 dans notre analyse de linéarité (testée jusqu'à 70 %).

4.3 Précision

Un échantillon de contrôle artificiel contenant un second génome à une concentration relative de 1 % présente un CV intra et inter série de < 15 %.

4.4 Comparaison des méthodes

Les résultats d'AlloSeq cfDNA ont été comparés aux méthodes prédictives en interne, en utilisant 127 points de données de 101 échantillons cliniques uniques et en aveugle. L'étude montre que AlloSeq cfDNA présente un ajustement R^2 global de 0,941499.

4.5 Contrôle de la qualité des lots de kits de réactifs

Chaque mélange réactionnel est testé par rapport à un panel d'un minimum de 74 répliques de 23 échantillons d'ADN uniques provenant d'échantillons d'ADN bien caractérisés de différents % d'équivalents dd-cfDNA.

4.6 Intervalle de mesure du kit

Le test AlloSeq cfDNA a été validé pour les intervalles de mesure requis de 0 à moins de 50 % (sans génotype du receveur ou du donneur) et de 0 à 100 % (avec génotype du receveur ou du donneur) afin de distinguer avec succès l'ADN acellulaire du donneur et du receveur dans un échantillon donné.

5. Informations complémentaires

Le protocole décrit dans ce guide suppose d'avoir examiné le contenu de cette section, confirmé le contenu du flux de travail et obtenu tous les consommables et équipements requis.

5.1 Contenu et exigences de stockage du kit AlloSeq cfDNA

Assurez-vous de disposer de tous les réactifs identifiés dans cette section avant de passer aux procédures de préparation de la bibliothèque. Tous ces réactifs ont une durée de conservation de 24 mois à compter de la date de fabrication. Ces kits ont fait l'objet de tests de stabilité en cours d'utilisation qui ont démontré que les réactifs congelés peuvent supporter un maximum de 12 cycles de congélation/décongélation.

Réactifs, Partie 1 sur 3, à conserver entre -15 et -25 °C

Quantité	Réactif	Type/taille de tube	Couleur
1	AlloSeq cfDNA PCR Mix	2 ml	Rouge
1	AlloSeq cfDNA PCR Enzyme	0,5 ml	Rouge
1	AlloSeq cfDNA SNP Primer Pool	0,5 ml	Rouge
1	AlloSeq cfDNA 2N NaOH	0,5 ml	Rouge

Réactifs, Partie 2 sur 3, à conserver entre -15 et -25 °C

Quantité	Réactif	Type/taille de tube	Couleur
1	AlloSeq cfDNA A501	Tube FluidX	Blanc
1	AlloSeq cfDNA A504	Tube FluidX	Blanc
1	AlloSeq cfDNA A505	Tube FluidX	Blanc
1	AlloSeq cfDNA A508	Tube FluidX	Blanc
1	AlloSeq cfDNA A701	Tube FluidX	Orange
1	AlloSeq cfDNA A702	Tube FluidX	Orange
1	AlloSeq cfDNA A703	Tube FluidX	Orange
1	AlloSeq cfDNA A704	Tube FluidX	Orange
1	AlloSeq cfDNA A706	Tube FluidX	Orange
1	AlloSeq cfDNA A710	Tube FluidX	Orange

Réactifs, Partie 3 sur 3, à conserver à 2–8 °C

Quantité	Réactif	Type/taille de tube	Couleur
1	AlloSeq cfDNA Purification Beads	2 ml	Transparent
1	AlloSeq cfDNA Resuspension Buffer	2 ml	Transparent

5.2 Sécurité

Suivez les pratiques générales de sécurité en laboratoire et les pratiques de prévention de la contamination en salle blanche lorsque vous effectuez cette procédure. Grâce au processus de gestion des risques de CareDx Pty Ltd, tous les risques ont été mitigés jusqu'à une limite acceptable. Les instructions d'utilisation doivent être suivies, y compris le cahier d'exercices fourni, pour éviter les scénarios d'utilisation dangereux. Ce kit ne contient pas de matériaux dangereux. Veuillez consulter les fiches de données de sécurité et prendre toutes les précautions requises pour la manipulation et l'élimination. Portez les EPI appropriés en permanence, notamment des gants, des lunettes de sécurité et une blouse de laboratoire.



Le NaOH est une substance corrosive et doit être manipulé avec précaution. Suivez les directives appropriées pour l'élimination des déchets.

COMPOSANT DU KIT	SYMBOLE/PICTOGRAMME	AVERTISSEMENT DE SÉCURITÉ
<p>NaOH 2N Contient de l'hydroxyde de sodium</p>		<p>Mention d'avertissement Danger</p> <p>Mention de danger H314 – Provoque des brûlures de la peau et de graves lésions des yeux.</p> <p>Mises en garde – EU (§28, 1272/2008) P260 – Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols. P264 – Se laver soigneusement le visage les mains et la peau exposée après manipulation. P280 – Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage/une protection auditive. P301 + P330 + P331 – EN CAS D'INGESTION : rincer la bouche. NE PAS faire vomir. P303 + P361 + P353 – EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux) : enlever immédiatement tous les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau ou se doucher. P363 – Laver les vêtements contaminés avant réutilisation. P310 – Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON/un médecin. P304 + P340 – EN CAS D'INHALATION : transporter la personne à l'extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer. P305 + P351 + P338 – EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. P405 – Garder sous clef. P501 – Éliminer le contenu/récipient dans le respect des réglementations locales, régionales, nationales et internationales en vigueur.</p>
<p>AlloSeq cfDNA Resuspension Buffer Contient de l'EDTA (acide éthylènediamine tétracétique)</p>		<p>Mention d'avertissement Danger</p> <p>Mention de danger H319 – Provoque une sévère irritation des yeux.</p> <p>Mises en garde – EU (§28, 1272/2008) P264 – Se laver les mains soigneusement après manipulation. P280 – Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage P337 + P313 – Si l'irritation oculaire persiste : Consulter un médecin. P305 + P351 + P338 – EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes.</p>

Pour plus de détails sur toutes les matières dangereuses contenues dans le kit AlloSeq cfDNA, veuillez consulter la fiche de données de sécurité FDS TEC510_AlloSeq cfDNA à l'adresse <http://www.caredx.com>.

5.3 Consommables et équipement

Les consommables et l'équipement énumérés ci-dessous sont nécessaires à la réalisation du test, mais ne sont pas inclus dans le kit AlloSeq cfDNA.

Le protocole a été optimisé et validé à l'aide des articles énumérés. Les performances peuvent ne pas être comparables en cas d'utilisation d'autres consommables et équipements.

Consommables requis, non fournis

Consommables	Fournisseur/n° de référence	Quantité
Streck Cell-Free DNA BCT CE	Streck, n° réf. 218997	1
Qiagen QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	Qiagen n° réf. 55114	1
Tubes pour microcentrifugeuse de 1,7 ml	Fournisseur de laboratoire général	50
Jeu de pipettes 20 µl, 200 µl, 1 000 µl.	Fournisseur de laboratoire général	1
Jeu de pipettes multicanaux 20 µl, 200 µl.	Fournisseur de laboratoire général	1
Embouts de pipette, barrière de 20 µl, 200 µl, 1 000 µl.	Fournisseur de laboratoire général	2 boîtes
Tubes de centrifugeuse conique (15 ml)	Fournisseur de laboratoire général	1
Ethanol 200 proof (absolu) pour la biologie moléculaire	Sigma-Aldrich, réf. E7023 ou équivalent	1
Plaquette pour PCR à 96 puits	Fournisseur de laboratoire général	1 plaque
Films adhésifs Microseal « B »	Bio-Rad, réf. MSB-1001 ou équivalent	2
Eau de qualité PCR	Fournisseur de laboratoire général	10 ml
Réactifs de quantification basés sur la fluorescence, tels que Qubit haute sensibilité ou PicoGreen®.	Thermo Fisher, réf. Q32851 Thermo Fisher, réf. P7581	Un kit
Plaquette de fixation d'index (réutilisable)	Illumina, FC-130-1005	1
Kit de réactifs de séquençage MiSeq V3 (150 cycles)	Illumina, MS-102-3001	1
MiniSeq Mid Output Kit (300 cycles)	Illumina, FC-420-1004	1
MiniSeq High Output Reagent Kit (150 cycles)	Illumina, FC-420-1002	1

Équipement général de laboratoire requis, non fourni

Équipement	Fournisseur/n° de référence	Quantité
Illumina MiSeq	Illumina	1
Aimant DYNAMAG-2	Thermo Fisher, réf. 12321D	1
Microcentrifugeuse	Fournisseur de laboratoire général	1
Microplaquette pour centrifugeuse	Fournisseur de laboratoire général	1
Vortex	Fournisseur de laboratoire général	1
L'un des thermocycleurs à 96 puits suivants :		1
<ul style="list-style-type: none"> GeneAmp PCR System 9700 Veriti Thermal Cycler SimpliAmp Thermal Cycler Mastercycler® Nexus gradient (bloc en aluminium) 	Applied Biosystems (production arrêtée) Thermo Fisher, réf. 4375786 Thermo Fisher, réf. A24811 Eppendorf, réf. 6331000025	
Agitateur de microplaques	Qinstruments, réf. 1808-0506	1
L'un des éléments suivants (pour la quantification des bibliothèques) :		1
<ul style="list-style-type: none"> Qubit Lecteur de plaque Fluorescence 	Fournisseur de laboratoire général Thermo Fisher, réf. Q33216	1

6. Coordonnées

Fabricant :

CareDx Pty Ltd,
20 Collie Street, Fremantle, WA, Australia, 6160.
Tél. : +61-8-9336-4212
Courriel : orders-aus@cairedx.com
Site Web : <http://www.cairedx.com>

Distribué par :

Asie du Pacifique (APAC)
CareDx Pty Ltd,
20 Collie Street, Fremantle, WA, Australia, 6160.
Tél. : +61-8-9336-4212
Courriel : orders-aus@cairedx.com
Site Web : <http://www.cairedx.com>

Europe, Moyen-Orient et Afrique (EMEA)
CareDx AB,
Franzégatan 5, SE-112 51 Stockholm, Sweden.
Tél. : +46-8-508 939 00
Télécopie : +46-8-717 88 18
Courriel : orders-se@cairedx.com
Site Web : <http://www.cairedx.com/>

CH-REP:

Qarad Suisse S.A.,
World Trade Center, Avenue Gratta-Paille 2, 1018 Lausanne, Suisse,
CHRN: CHRN-AR-20002058

Assistance technique :

E-mail: techsupport-global@cairedx.com

Tout incident grave survenu en association au dispositif doit être signalé au fabricant et à l'autorité compétente ou le ministère de la Santé de l'état membre dans lequel l'utilisateur et/ou le patient est établi.

Pour des renseignements complémentaires, veuillez consulter le site Web de CareDx (<https://www.cairedx.com/contact-us/>).

Produits associés :

Logiciel AlloSeq cfDNA



7. Références

Circulating cell-free DNA enables noninvasive diagnosis of heart transplant rejection, **DeVlaminck et al.**, *Sci Transl Med.* 2014 Jun 18;6(241):241ra77

Noninvasive detection of graft injury after heart transplant using donor-derived cell-free DNA: A prospective multicenter study, **Khush et al.**, *Am J Transplant.* 2019 Mar 5. doi: 10.1111/ajt.15339

Graft-derived cell-free DNA, a noninvasive early rejection and graft damage marker in liver transplantation: A prospective, observational, multicenter cohort study, **Schütz et al.**, *PLoS Med.* 2017 Apr 25;14(4):e1002286

Noninvasive monitoring of infection and rejection after lung transplantation, **DeVlaminck et al.**, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Oct 27;112(43):13336-41

Validation of a Clinical-Grade Assay to Measure Donor-Derived Cell-Free DNA in Solid Organ Transplant Recipients, **Grskovic et al.**, *J Mol Diagn.*, 2016 Nov;18(6):890-902

Cell-Free DNA and Active Rejection in Kidney Allografts, **Bloom et al.**, *J Am Soc Nephrol.*, 2017 Jul; 28(7):2221-2232
Biological Variation of Donor-Derived Cell-Free DNA in Renal Transplant Recipients: Clinical Implications. **Bromberg et al.**, *JALM*, 2017 Nov; 2(3): 309-321

Repeat kidney transplant recipients with active rejection have elevated donor-derived cell-free DNA, **Mehta, et al.** *Am J Transplant.* 2019 May;19(5):1597-1598

Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline—Second Edition, **EP7-A2 (ISBN 1-56238-584-4)**

Historique de la méthode

Version	Date	Modification
1.0	24 Oct. 19	Première version de l'IFU d'AlloSeq cfDNA Version marquée CE, rédigée par L. Westwood Publié par E. Naughton le 17 décembre 2019
2.0	16 Mars 20	L. Westwood a supprimé la référence à la PCR ProFlex. Réédité par E. Naughton le 22 juin 2020
2.1	20 Oct. 20	H. Hogan a ajouté une note sur l'utilisation du NaOH. Republié par E. Naughton le 20 octobre 2020
3.0	14 Janv. 20	A. Murphy a mis à jour les points suivants au nom de L. Westwood : Section 1 : ajout d'une référence à MiniSeq, ajout de plus d'informations sur le kit flexible. Section 1.2/2.3 : ajout d'une référence au MiniSeq Section 2.4.3 : ajout de l'étape 6 Section 2,5 : Mise à jour de toutes les parties de cette section Section 5,3 : Ajout du MiniSeq au tableau des consommables requis Réédité par S. Antony/ A. Murphy le 21 janvier 2021.
3.1	22 Janv. 21	Mise à jour de l'adresse du distributeur de Vienne à Stockholm – Se référer à CR 2020-097. Réédité par A. Murphy le 27 janvier 2021
4.0	04 Mai 22	C. Banda a effectué les modifications suivantes : Mise à jour de la couleur des bouchons des composants de la boîte 1 de transparent à rouge. Voir CR 2021-083. Mise à jour de la taille des tubes pour les purification beads selon CR 2022-010. Mise à jour du logo et des détails de Qarad. Republié par E. Sauer le 4 mai sous DCR-2022-254
5.0	27 Mai 22	N. Tangprasertchai a mis à jour la section Consommables et équipement pour y inclure les tubes Streck. Suppression de la mention « Utilisation à des fins de recherche uniquement ». Ajout de l'importateur pour l'UE. Republié par L. Langley le 31 mai 22
6.0	21 Mars 23	Suppression de la mention « CareDx » dans le nom du produit AlloSeq cfDNA et du logiciel AlloSeq cfDNA dans tout le mode d'emploi. Mise à jour de la section 6 pour la vigilance. Ajout de nouveaux thermocycleurs, selon CR 2021-052
7.0	03 Nov. 23	Ajout d'un mandataire suisse
8.0	17 Nov. 23	Correction de la durée de conservation à 24 mois pour l'aligner sur les études de stabilité et la date de d'expiration de fabrication.