

AlloSeq cfDNA

Notice d'utilisation

IFU090-FR

Numéro de version : 1.1

Date de publication : Mai 2025

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**

QbD RepS BV,
Groenenborgerlaan 16,
2610 Wilrijk,
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/UE



Limite de température

LOT

N° de lot

REF

N° de catalogue

IVD

Diagnostic in vitro
Dispositif médical



Nombre de réactions

CE

Conformité européenne



Importateur UE

CH **REP**

Rep suisse autorisé

Pour l'étiquetage des matières dangereuses, veuillez vous référer à la section 5.2 ci-dessous.

Table des matières

1.	Présentation.....	3
1.1	Principe	3
1.2	Kit cfDNA AlloSeq Utilisation prévue et description	4
1.3	Limitations et contre-indications	4
1.4	Exemples de considérations	5
1.5	Relation donneur-bénéficiaire	5
1.6	Comment fonctionne le test ?	6
1.7	Recommandations relatives à l'entrée d'ADN.....	6
1.8	Extraction d'ADN acellulaire	6
2.	Protocole PCR.....	7
2.1	Informations sur le protocole	7
2.2	Hypothèses	7
2.3	Configuration PCR	7
2.4	Nettoyage du produit PCR	9
2.5	Flux de travail de séquençage.....	10
	Procédure (sans contrôle PhiX)	12
	Procédure (avec contrôle PhiX).....	12
3.	Interprétation des résultats	13
3.1	Validité de l'exécution	13
3.2	Résultats.....	13
4.	Caractéristiques de performance	13
4.1	Limite de détection de méthode	13
4.2	Précision.....	14
4.3	Précision.....	14
4.4	Comparaison des méthodes	14
4.5	Contrôle de la qualité des lots de kits.....	14
5.	Informations complémentaires	14
5.1	Contenu du kit AlloSeq cfDNA et exigences de stockage	14
5.2	Sécurité	15
5.3	Consommables et équipement.....	16
6.	Coordonnées.....	18
7.	Références	19

1. Présentation

1.1 Principe

Le kit AlloSeq cfDNA et le logiciel AlloSeq cfDNA (désignés collectivement par le terme AlloSeq cfDNA Assay) forment un système qui permet la quantification relative de l'ADN acellulaire dérivé du donneur (ADNcf) dans un échantillon d'ADNcf dérivé d'un receveur de greffe. L'ADN acellulaire est un ADN fragmenté dans la circulation sanguine qui provient de cellules blessées ou mortes.

Après l'extraction de l'ADNcf du plasma, l'ADNcf est amplifié à l'aide d'une PCR multiplex comprenant des amorces de PCR pour 202 polymorphismes de nucléotides simples. Les produits PCR obtenus sont séquencés sur un instrument de séquençage MiSeq ou MiniSeq d'Illumina, Inc. (Illumina) (ou sur 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'ADNcf présent en tant que contributeur mineur d'ADNcf dans le cadre de transplantations cardiaques, rénales et pulmonaires est considéré comme « dérivé du donneur » (DeVlaminck et al., 2014 ; Khush et al., 2019 ; DeVlaminck et al., 2015 ; Grskovic et al., 2016 ; Bloom et al., 2017 ; Bromberg et al., 2017).

Le kit AlloSeq cfDNA permet également l'amplification et le séquençage de l'ADN génomique afin d'identifier les génotypes du donneur et du receveur, ou des deux. Cette étape peut être effectuée avant ou en même temps que le test ADNcf. Elle est nécessaire pour quantifier l'ADNcf dérivé du donneur chez les receveurs de transplantations hépatiques, chez lesquels les niveaux d'ADNcf dérivé du donneur, contrairement aux transplantations rénales, cardiaques et pulmonaires, peuvent représenter la fraction principale d'ADNcf total chez le receveur (Schütz et al., 2017).

Il a été démontré que des niveaux élevés d'ADNcf dérivé du donneur sont associés à des lésions et au rejet d'organes transplantés (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 tous les soins et l'attention requis. Nous recommandons à tous les utilisateurs de lire l'intégralité du document avant de commencer la procédure. Les procédures d'utilisation du logiciel AlloSeq cfDNA figurent dans le mode d'emploi du logiciel AlloSeq cfDNA.

Le test AlloSeq cfDNA offre les caractéristiques suivantes :

- ✓ Préparation rapide et facile des échantillons.
Préparer jusqu'à 24 bibliothèques en 2,5 heures environ, avec seulement 1,5 heure de travail pratique.
- ✓ Faible apport d'ADN.
Une qualité de données élevée et des performances robustes avec une entrée recommandée de 10 ng pour l'ADN génomique et le cfDNA, nécessitant une faible concentration d'échantillon de 0,625 ng/μl.
- ✓ Kit flexible, séquenceur et sélection de capacité
 - Formats pris en charge : Cellule à flux MiSeq Standard V3, kit MiniSeq Mid Output (300 cycles) et kit de réactifs MiniSeq High Output (150 cycles)
 - Capacité de séquençage flexible avec des bibliothèques contenant entre 6 et 24 échantillons
- ✓ L'échantillon d'ADN est transformé en un rapport généré par un logiciel en moins de 24 heures.

1.2 Kit cfDNA AlloSeq Utilisation prévue et description

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'ADNcf dérivé du donneur (% dd-cfDNA) chez les receveurs de greffes d'organes solides. Le kit est destiné à être utilisé par du personnel formé dans des laboratoires réglementés et ne doit pas être utilisé comme seule base pour prendre des décisions cliniques. Ce produit est destiné à être utilisé avec les séquenceurs Illumina MiSeq, MiniSeq ou tout autre séquenceur Illumina agréé.

Résumé, explication et principes du test

Le test AlloSeq cfDNA est une méthode multiplexée basée sur la PCR qui permet de préparer des bibliothèques pour le séquençage à partir de cfDNA extrait du plasma collecté dans des tubes Streck. Après l'extraction de l'ADNcf du plasma, l'ADNcf 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 appareil Illumina (Illumina, Inc.) Instrument MiSeq ou MiniSeq. Les données de séquençage sont analysées à l'aide du logiciel CareDx AlloSeq cfDNA où les nombres de lectures des séquences amplifiées sont utilisés pour mesurer la quantité de cfDNA provenant du donneur par rapport à la quantité totale de cfDNA provenant de l'échantillon de plasma du receveur. Enfin, le logiciel AlloSeq cfDNA rapporte le pourcentage d'ADNcf dérivé du donneur ainsi que les mesures de CQ. Reportez-vous à la section 1.6 pour plus de détails.

1.3 Limitations et contre-indications

Restrictions

- Les patients ayant reçu des transfusions de sang total ou d'autres transfusions de sang contenant des composants de globules blancs dans le mois précédant le test AlloSeq cfDNA peuvent présenter un résultat inexact. Les transfusions de globules rouges lavés ou 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 peuvent entraîner une augmentation à court terme de l'ADNcf 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 un nouveau rein ou un rein secondaire alors que le(s) rein(s) greffé(s) original(aux) est (sont) encore en place, la contribution de l'ADNcf provenant de l'organe (des organes) greffé(s) précédemment au plasma du receveur est actuellement inconnue. Les données provenant de patients ayant subi une retransplantation et dont le(s) rein(s) antérieur(s) reste(nt) in situ suggèrent que l'ADNcf d'AlloSeq peut être utilisé chez les patients ayant subi une retransplantation d'une manière similaire à l'utilisation dans la population ayant subi une transplantation d'un seul rein (Mehta, *et al.* 2019).

Contre-indications

- Étant donné que 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 receveur (plus que receveur + donneur), la contribution de l'ADNcf 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 des greffes de plusieurs organes provenant de différents donneurs, car les greffes introduisent chacune un génome unique (par ex., rein/pancréas) et contribuent à différents niveaux basaux d'ADNcf, ce qui fausse l'interprétation des résultats.
- Un receveur de plusieurs organes transplantés provenant tous d'un même donneur présente une situation où des taux élevés d'ADNcf dérivé du donneur auraient pu provenir d'un organe, d'un autre ou des deux. Si des deux, ils pourraient contribuer à différents niveaux basaux, ce qui pourrait fausser l'interprétation des résultats. Par conséquent, l'ADNcf AlloSeq ne doit pas être utilisé pour les receveurs de greffe ayant plusieurs organes transplantés 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.

NE PAS UTILISER AlloSeq cfDNA chez les transplantés qui :

- ont reçu une greffe d'un jumeau monozygote (identique)
- ont subi une greffe allogénique de sang ou de moelle osseuse
- sont enceintes
- ont eu plusieurs organes transplantés
- ont reçu une transfusion sanguine contenant des globules blancs au cours des 30 derniers jours (les globules rouges lavés ou déleucocytés sont acceptables) ;
- ont subi une biopsie au cours des dernières 24 heures

1.4 Exemples de considérations

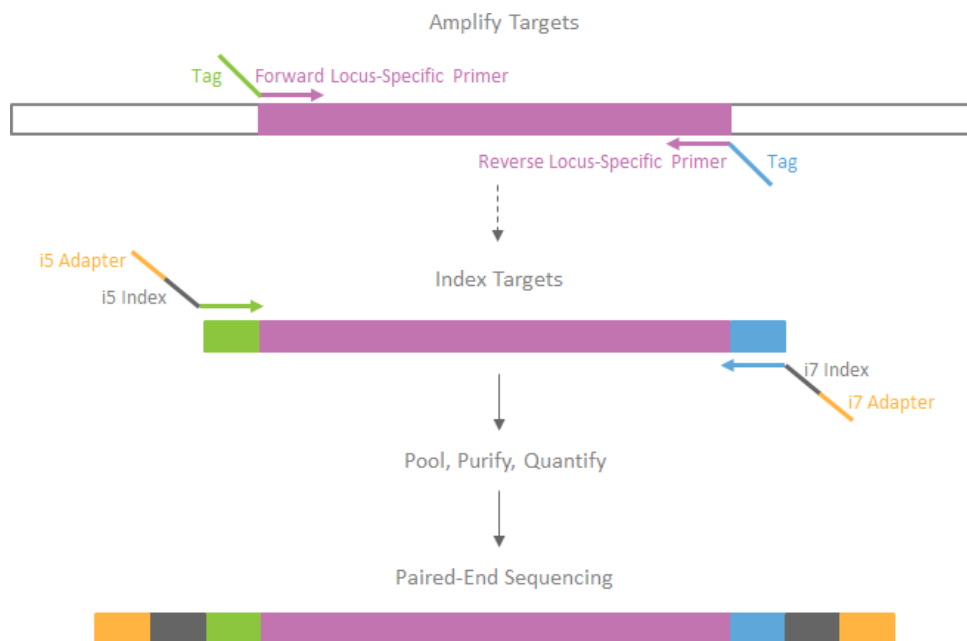
- Pour l'ADNcf, nous recommandons de prélever un échantillon de sang dans Streck Cell-Free DNA BCT® et de procéder à la séparation du plasma dans les 7 jours suivant la prise de sang. Deux échantillons de patients doivent être prélevés pour parer à toute éventualité.
- Les échantillons dans des tubes Streck congelés ou conservés à une température inférieure ou égale à 4 °C ne doivent pas être testés.
- Les échantillons dans les tubes Streck présentant une hémolyse supérieure à une trace/légère quantité par inspection visuelle (environ ≥ 50 mg/dl) ne doivent pas être testés.
- L'ADNcf extrait des échantillons de sérum non prélevés dans des tubes Streck peut ne pas être compatible avec les tests d'ADNcf dérivés du donneur en raison de la présence d'ADN génomique libéré par les cellules du receveur par le processus de coagulation.
- La pureté et la concentration de l'ADN extrait doivent être vérifiées avant le test à l'aide de 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 interférents courants dans les tests de laboratoire (EP07-A2 : Interference Testing in Clinical Chemistry ; Approved Guideline - Second Edition). La présence de ces interférents a été testée et n'affecte pas les performances du test.

1.5 Relation donneur-bénéficiaire

La relation donneur-bénéficiaire est utilisée dans le calcul du résultat d'AlloSeq cfDNA. Une relation incorrecte avec le donneur affectera le résultat calculé de l'ADNcf dérivé du donneur. Dans certains cas, la différence de dd-cfDNA calculée avec une relation correcte par rapport à une relation incorrecte peut avoir un impact sur l'interprétation du résultat.

1.6 Comment fonctionne le test ?

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



Le test est une PCR multiplexe unique dans laquelle les PCR spécifiques au SNP et index se produisent dans la même réaction. Le kit comprend un pool d'amorces oligonucléotidiques spécifiques aux SNP pour amplifier les SNP ciblés. En combinaison avec des adaptateurs d'index, le protocole de cyclage unique amplifie les régions spécifiques au 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 rapporte le pourcentage d'ADNcf dérivé du donneur.

1.7 Recommandations relatives à l'entrée d'ADN

Quantifier l'ADN d'entrée avant de commencer le protocole. Nous recommandons d'utiliser une méthode de quantification fluorométrique qui utilise des colorants de liaison à l'ADNdb, tels que Qubit™ ou PicoGreen®, conformément aux instructions du fabricant.

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

1.8 Extraction d'ADN acellulaire

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

- ✓ Prélever du sang dans deux (2) Streck Cell-Free DNA BCT® par patient. Au moins 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'ADNcf de haute qualité.
- ✓ Isoler le plasma conformément aux instructions du fabricant (le protocole de double centrifugation 2 est recommandé).
- ✓ Utiliser le kit d'acides nucléiques circulants QiAamp (Qiagen) pour extraire l'ADNcf du plasma.

AlloSeq cfDNA a été validé à l'aide de Streck Cell-Free DNA BCT et du kit QiAamp Circulating Nucleic Acid de Qiagen. D'autres produits peuvent être utilisés en association avec AlloSeq cfDNA s'ils sont validés de manière appropriée. Les tubes de prélèvement sanguin doivent être conçus pour stabiliser l'ADNcf sans contamination par l'ADNg, et les méthodes d'extraction de l'ADNcf doivent produire de l'ADNcf de bonne qualité et de bonne pureté, avec $\geq 10 \mu\text{l}$ à $\geq 0,625 \text{ ng}/\mu\text{l}$, idéalement avec un rendement total $> 20 \text{ ng}$ pour permettre de répéter les tests si nécessaire.

2. Protocole PCR

2.1 Informations sur le protocole

- Suivre le protocole AlloSeq cfDNA dans l'ordre indiqué en utilisant les paramètres spécifiés.
- Avant de continuer, confirmer le contenu du kit et s'assurer que l'on dispose des consommables et de l'équipement requis. Voir Contenu du kit, Consommables et Équipement au Chapitre 3.

2.2 Hypothèses

- Les instruments sont correctement étalonnés, entretenus et soumis à un plan de maintenance, selon les besoins.
- Des procédures opérationnelles normalisées (SOP) sont en place et contrôlées.
- Les BPL ont été mises en œuvre et sont respectées dans l'environnement utilisateur.
- Le protocole a été validé par l'utilisateur final.
- Les utilisateurs connaissent bien la procédure QiAamp Circulating Nucleic Acid Kit de Qiagen pour extraire l'ADNcf (Qiagen réf. 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 ce mode d'emploi, consulter les SOP internes et/ou le manuel d'utilisation du fournisseur pour obtenir des instructions.

2.3 Configuration PCR

Avant de démarrer, s'assurer que le thermocycleur est programmé pour minimiser l'exposition de la plaque à la température ambiante après la configuration de la plaque.

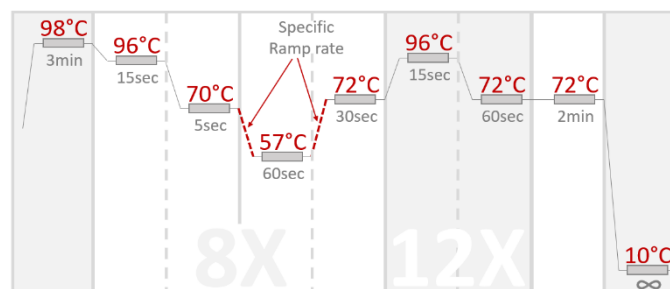
Le programme PCR doit être configuré pour un volume réactionnel de $40 \mu\text{l}$ et nécessite des réglages spécifiques de vitesse de rampe pour les 8 premières étapes de recuit (57°C) et d'allongement (72°C). Les équivalents de vitesse de rampe pour les différents thermocycleurs et le protocole de cycle PCR sont présentés dans le Tableau 1 et le Tableau 2. Les réactifs suivants sont nécessaires pour la configuration PCR :

- Mélange PCR AlloSeq cfDNA
- Enzyme AlloSeq cfDNA PCR
- AlloSeq cfDNA SNP Primer Pool
- Amorces AlloSeq cfDNA Index (en avant, i5 et en arrière, i7)

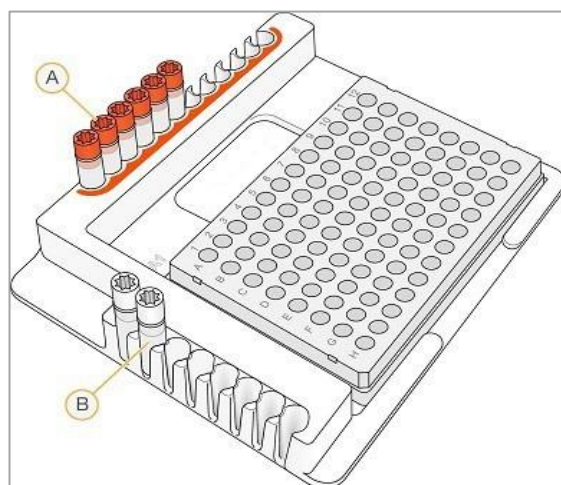
Décongeler les réactifs à température ambiante, puis les placer sur de la glace. Conserver les réactifs sur de la glace pendant la configuration.

Tableau 1 : Équivalents de taux de rampe du thermocycleur	
ABI 9700	$\geq 25\%$
Veriti	18
ABI SimpliAmp	0,7 °C/s
Eppendorf Nexus (bloc d'aluminium)	0,4 °C/s

Tableau 2 : Protocole de cyclisme PCR			
Choisir l'option de couvercle de préchauffage à 100 °C			
Température	Durée	Taux de rampe	Cycles
98 °C	3 min	Taux de rampe par défaut	1
96 °C	15 sec.	Taux de rampe par défaut	8
70 °C	5 sec.	Taux de rampe par défaut	
57 °C	60 sec.	Utiliser la vitesse de rampe appropriée pour votre thermocycleur dans le tableau 1 ci-dessus.	
72 °C	30 sec.		
96 °C	15 sec.	Taux de rampe par défaut	12
72 °C	60 sec.	Taux de rampe par défaut	1
72 °C	2 min	Taux de rampe par défaut	
10 °C	∞	Taux de rampe par défaut	



1. Diluer l'ADN de l'échantillon dans de l'eau exempte de nucléase à 10 ng dans un volume final de 16 µl. Enregistrer la quantité finale d'ADN à utiliser dans le logiciel AlloSeq cfDNA.
2. Dans une plaque PCR, sur de la glace (si le porte-plaque est utilisé, placer le porte-plaque sur de la glace), ajouter 4 µl des amorces d'indexation avant (i5) aux puits d'échantillon appropriés, en fonction de la disposition de la plaque définie dans la fiche d'échantillon.



Amorces de l'index inverse de l'A i7
(1-6 selon la disposition de la plaque pour les colonnes 1 à 6)

Amorces de l'index avant de B i5
(1-4 selon la disposition de la plaque pour les rangées 1 à 4)

3. Ajouter 4 µl des amorces d'indice inverse (i7) aux puits d'échantillon appropriés.

REMARQUE : Pour réduire les risques de contamination par séquençage inter-séries, il est recommandé de faire pivoter les combinaisons d'amorces i5 et i7 entre les séries, si possible (c.-à-d. pour 12 échantillons ou moins par série).

4. Ajouter 16 µl d'ADN préparé dans chaque puits d'échantillon.
5. Préparer 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 du PCR Master-Mix (MM)	
	Volume, 1 puits (µl)	Volume utilisé pour réaliser le MM pour le nombre « x » d'échantillons, permettant pour 12 % du 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, minimiser autant que possible l'exposition à la température ambiante pour limiter l'amplification non spécifique. Par exemple, démarrer le thermocycleur immédiatement après la configuration. Retards > 1 heure après l'ajout d'enzymes, il a été démontré que la diminution de Q > 30.

6. Mélanger au vortex pendant 5 secondes et centrifuger brièvement.

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

- Ajouter 16 µl du Master Mix préparé ci-dessus dans chaque puits d'échantillon, appliquer Microseal « B » et mélanger immédiatement la plaque au vortex pendant 5 secondes.
- Centrifuger immédiatement la plaque à 1 000 x g pendant 30 secondes. Vérifier qu'il n'y a pas de bulles. Le cas échéant, remettre la plaque sur de la glace pendant 5 minutes, puis répéter l'étape de centrifugation.
- Placer immédiatement la plaque sur le thermocycleur dans une zone post-amplification et exécuter le protocole de cyclage PCR. Le protocole PCR Cycling prend environ 1 heure.
- Point d'arrêt sécurisé. Vous pouvez laisser la plaque sur le thermocycleur jusqu'à 48 heures à une étape de maintien de 10 °C, si nécessaire. Procéder ensuite à la procédure de nettoyage ci-dessous.

2.4 Nettoyage du produit PCR

Les réactifs suivants sont nécessaires pour le nettoyage du produit PCR :

- Billes de purification d'AlloSeq cfDNA
- Tampon de resuspension AlloSeq cfDNA

Avant de commencer, s'assurer d'avoir fait ce qui suit :

- Retirer les billes de purification du stockage entre 2 et 8 °C et les équilibrer à température ambiante (au moins 30 minutes). Avant l'utilisation, mélanger les billes au vortex jusqu'à ce qu'elles soient complètement resuspensionnées (vérifier visuellement qu'aucune pastille n'est laissée libre), puis centrifuger brièvement pour obtenir toutes les billes au fond du tube.
- Retirer le tampon de resuspension du stockage entre 2 et 8 °C.
- Retirer la plaque PCR du stockage à une température comprise entre 2 et 8 °C ou du thermocycleur et l'équilibrer à température ambiante. Centrifuger à 1 000 x g pendant 30 secondes.
- Préparer 80 % d'éthanol, 3 ml au total.

2.4.1 Mélanger les billes de purification d'AlloSeq cfDNA et le produit de PCR

- Déterminer 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. À l'aide du volume déterminé ci-dessus, regrouper le nombre requis d'échantillons dans un tube Eppendorf de 1,5 ml.
3. Ajouter 100 µl de billes de purification d'AlloSeq cfDNA dans le tube d'échantillons groupés.
4. Agiter le tube au vortex pendant 5 secondes à pleine vitesse et incubé le tube pendant 5 minutes à température ambiante.
5. Placer le tube sur le support DYNAMAG-2 et laisser les billes culotter pendant 5 minutes, ou jusqu'à ce que le liquide soit clair.
6. Conserver le tube sur le support magnétique et retirer tout surnageant à l'aide d'une pipette P200.

2.4.2 Lavages EtOH

1. Ajouter 1 ml d'EtOH à 80 % fraîchement préparé dans le tube sans perturber les billes. S'assurer de laisser le tube sur le support magnétique.
2. Attendre 30 secondes ou jusqu'à ce que le liquide soit clair, puis retirer et jeter le surnageant, sans perturber les billes.
3. À l'aide d'une pipette P1000, retirer et jeter le surnageant résiduel.
4. Répéter les étapes 1 à 3 pour effectuer un deuxième lavage à l'EtOH à 80 %. Pour le lavage final, utiliser une pipette à déplacement plus petit pour éliminer tout résidu d'EtOH.
5. Laisser sécher à l'air libre pendant 5 minutes, avec les bouchons éteints (tube ouvert).

2.4.3 Remise en suspension et élution

1. Retirer le tube du support magnétique et ajouter 35 µl du tampon de resuspension AlloSeq cfDNA.
2. Agiter le tube au vortex pendant 5 secondes à pleine vitesse et incubé le tube pendant 5 minutes à température ambiante.
3. Placer le tube sur le support DYNAMAG-2 et laisser les billes culotter pendant 5 minutes, ou jusqu'à ce que le liquide soit clair.
4. Sans toucher ni perturber les billes, transférer 32 µl de surnageant, à l'aide d'une pipette à déplacement plus petit, dans un nouveau tube Eppendorf de 1,5 ml.
5. Point d'arrêt sûr. À conserver entre -15 et -25 °C pendant 7 jours maximum.
6. Déterminer la concentration du pool en utilisant une méthode fluorométrique telle que PicoGreen® ou Qubit™

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

2.5 Flux de travail de séquençage

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

Après chaque cycle de séquençage, effectuer deux lavages post-course : le premier à l'eau de Javel avec le lavage de la ligne de gabarit et le second au Tween uniquement sans le lavage de la ligne de gabarit, en suivant les instructions du fabricant. Effectuer une maintenance régulière de l'instrument en suivant les recommandations du fabricant pour les meilleures pratiques de lavage. Voir le document de référence Illumina [000001679](#).

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 et dilution de la bibliothèque pour le séquençage

Dans cette étape du flux de travail, l'utilisateur doit décider d'inclure ou non le contrôle de séquençage Illumina PhiX v3 à une concentration finale de 1 % dans la bibliothèque d'ADNcf. Selon le flux de travail choisi, les différents protocoles énumérés ci-dessous doivent être suivis pour préparer la bibliothèque à charger dans la cartouche de réactif Illumina.

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

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

Avant de commencer, s'assurer d'avoir fait ce qui suit :

- Décongeler le NaOH 2 N à température ambiante, puis le placer sur de la glace.
 - Préparer du NaOH 0,2 N fraîchement dilué à utiliser pour le PhiX et la dénaturation de l'échantillon : Mélanger 4 µl de NaOH 2N avec 36 µl d'eau de laboratoire. Utiliser cette dilution fraîche dans les 12 heures.
 - Décongeler la cartouche de séquençage dans un bain-marie à température ambiante comme spécifié dans le guide du système de séquençage.
 - Placer le HT1 décongelé sur de la glace pour le refroidir.
 - [Facultatif] Contrôle de séquençage par dénaturation et dilution PhiX à 20 pM, comme suit :
 - Dans un Eppendorf de 1,5 ml, mélanger 2 µl de PhiX 10 nM et 2 µl de NaOH 0,2 N.
 - Agiter brièvement (< 5 s) au vortex, centrifuger et incubé à température ambiante pendant 5 minutes.
 - Ajouter 996 µl de HT1 pour diluer votre PhiX dénaturé à une concentration finale de 20 pM de PhiX.
 - Générer une feuille d'échantillon en suivant les instructions du mode d'emploi du logiciel.
- REMARQUE :** La solution de NaOH absorbe facilement le CO₂ de l'atmosphère, ce qui modifie le pH et les performances du réactif. S'assurer que le tube NaOH 2N est scellé lorsqu'il n'est pas utilisé.
- En cas de séquençage sur l'instrument MiniSeq, se reporter aux sections 2.5.2 et 2.5.3 pour spécifier les paramètres de l'analyse et les échantillons.

Procédure (sans contrôle PhiX)

1. Diluer la bibliothèque finale à 2 nM dans le tampon de resuspension AlloSeq cfDNA. Si la concentration finale de la bibliothèque est en ng/μl, utiliser l'équation suivante pour convertir la concentration en nM :

$$Concentration\ (nM) = \frac{Concentration\ (ng/\mu l) * 1,000,000}{162,500}$$

2. Préparer du NaOH 0,2 N fraîchement dilué à utiliser dans la dénaturation de la bibliothèque 2 nM : Mélanger 4 μl de NaOH 2 N avec 36 μl d'eau de qualité PCR. La solution de NaOH 0,2 N doit être utilisée dans les 12 heures suivant la préparation.
3. Dans un tube Eppendorf de 1,5 ml, ajouter 11 μl de bibliothèque 2 nM et 5 μl de NaOH 0,2 N.
4. Agiter brièvement au vortex(< 5 secondes) ou mélanger par pipetage de haut en bas, puis centrifuger.
5. Ajouter 984 μl de HT1 réfrigéré pour ramener la concentration de la bibliothèque à 22 pM.
6. Agiter brièvement au vortex(< 5 secondes) ou mélanger par pipetage de haut en bas, puis centrifuger..
7. **Si un instrument MiSeq est utilisé**, charger 1 000 μl de la bibliothèque dénaturée à 22 pM dans la cartouche de séquençage Illumina MiSeq préalablement décongelée et préparée conformément aux recommandations du fabricant.

REMARQUE : 22 pM est la concentration de charge recommandée pour MiSeq. Cependant, en raison des variations attendues des performances de la bibliothèque et de l'instrument, une certaine optimisation peut être souhaitée pour ajuster la densité du cluster.

8. **En cas d'utilisation d'un instrument MiniSeq**, diluer davantage la bibliothèque dénaturée à 22 pM, de l'étape 5 à 2,2 pM, en ajoutant 100 μl de la bibliothèque dénaturée à 22 pM de l'étape 5 à 900 μl de HT1 refroidi. Agiter brièvement au vortex(< 5 secondes) ou mélanger par pipetage de haut en bas, puis centrifuger.. Charger 1 000 μl de la bibliothèque dénaturée diluée à 2,2 pM dans la cartouche de séquençage Illumina MiniSeq préalablement décongelée et préparée conformément aux recommandations du fabricant.

REMARQUE : 2,2 pM est la concentration de charge recommandée pour MiniSeq. Cependant, en raison des variations attendues des performances de la bibliothèque et de l'instrument, une certaine optimisation peut être souhaitée pour ajuster la densité du cluster.

9. Procéder conformément au manuel d'utilisation du séquenceur Illumina pour charger la cellule de débit et la cartouche de réactif dans l'instrument afin de démarrer le séquençage. S'assurer d'utiliser une feuille d'échantillon préalablement préparée conformément aux instructions du mode d'emploi du logiciel AlloSeq cfDNA.

Procédure (avec contrôle PhiX)

1. Diluer la bibliothèque finale à 2 nM dans le tampon de resuspension AlloSeq cfDNA. Si la concentration finale de la bibliothèque est en ng/μl, utiliser l'équation suivante pour convertir la concentration en nM :

$$Concentration\ (nM) = \frac{Concentration\ (ng/\mu l) * 1,000,000}{162,500}$$

2. Préparer du NaOH 0,2 N fraîchement dilué à utiliser dans la dénaturation de la bibliothèque 2 nM : Mélanger 4 μl de NaOH 2 N avec 36 μl d'eau de qualité PCR. La solution de NaOH 0,2 N doit être utilisée dans les 12 heures suivant la préparation.
3. Dans un tube Eppendorf de 1,5 ml, ajouter 11 μl de 2 nM library et 5 μl de NaOH 0,2 N.
4. Dans un Eppendorf de 1,5 ml, mélanger 2 μl de PhiX 10 nM et 2 μl de NaOH 0,2 N.
5. Mélanger brièvement les deux tubes au vortex (< 5 s), centrifuger brièvement et incubé à température ambiante pendant 5 minutes.
6. Ajouter 984 μl de HT1 réfrigéré dans le tube bibliothèque pour ramener la concentration à 22 pM. Mélanger au vortex brièvement (< 5 s) et tourner vers le bas.

7. Ajouter 996 µl de HT1 réfrigéré au tube PhiX pour ramener la concentration à 20 pM. Agiter brièvement au vortex(< 5 secondes) ou mélanger par pipetage de haut en bas, puis centrifuger..
8. Ajouter 10 µl de la solution PhiX 20 pM à 1000 µl de la bibliothèque dénaturée de l'étape 6. Agiter brièvement au vortex(< 5 secondes) ou mélanger par pipetage de haut en bas, puis centrifuger..
REMARQUE : La concentration finale de PhiX dans la bibliothèque est d'environ 1 %.
9. **En cas d'utilisation d'un instrument MiniSeq**, diluer davantage la bibliothèque dénaturée à 22 pM contenant du PhiX (à partir de l'étape 8) jusqu'à 2,2 pM, en ajoutant 100 µl de la bibliothèque dénaturée à 22 pM à 900 µl de HT1 refroidi. Agiter brièvement au vortex(< 5 secondes) ou mélanger par pipetage de haut en bas, puis centrifuger..
10. Charger 1 000 µl de la bibliothèque finale de l'étape 9 dans la cartouche de séquençage Illumina préalablement décongelée et préparée selon les recommandations du fabricant.

2.5.2 Spécifier les paramètres d'exécution pour un MiniSeq

1. Régler les paramètres de configuration de l'analyse sur le MiniSeq sur le dossier de sortie souhaité (se reporter au [Guide local du logiciel Illumina Run Manager](#)).
2. Créer une série sur le Gestionnaire local d'exécution à l'aide de l'Analyse du générateur FASTQ (consulter le [Guide de flux de travail du Module d'analyse Générer le Gestionnaire local d'exécution Illumina FASTQ](#)).
 - a. Sélectionner **TruSeq Amplicon** dans la liste déroulante Kit de bibliothèque.
 - b. Sélectionner **Double index pour** le nombre de lectures d'index.
 - c. Spécifier l'**extrémité appariée** comme type de lecture.
 - d. Saisir le nombre de cycles (par ex. 76 x 8 x 8 x 76).
3. Mélanger brièvement les deux tubes au vortex (< 5 s), centrifuger brièvement et incubé à température ambiante pendant 5 minutes.

2.5.3 Spécifier les échantillons pour une série MiniSeq

Se reporter au [Guide de flux de travail du module d'analyse Generate FASTQ de Local Run Manager](#) pour obtenir des instructions générales sur les deux méthodes de saisie d'échantillons (saisie manuelle d'échantillons ou importation d'échantillons).

3. Interprétation des résultats

3.1 Validité de l'exécution

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

3.2 Résultats

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

4. Caractéristiques de performance

4.1 Limite de détection de méthode

Avec l'entrée d'ADNcf recommandée de 10 ng, la limite de détection (LDD) de l'ADNcf AlloSeq a été déterminée à 0,23 %. La limite de blanc (LoB) et la limite de quantification (LoQ) ont été déterminées à 0,18 % et 0,23 %, respectivement.

4.2 Précision

AlloSeq cfDNA a été testé avec 29 échantillons uniques et bien caractérisés d'ADNcf à % connu (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 près de la LDD/LQ et 0,999138 dans notre analyse de linéarité (testé jusqu'à 70 %).

4.3 Précision

Un échantillon témoin artificiel avec un deuxième génome à une concentration relative de 1 % a un CV intra-série et inter-série < 15 %.

4.4 Comparaison des méthodes

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

4.5 Contrôle de la qualité des lots de kits

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

4.6 Intervalle de mesure du kit

Le test AlloSeq cfDNA a été validé selon les intervalles de mesure requis de 0 à 20 % sans génotype de receveur ou de donneur et de 0 à 100 % avec génotype de receveur ou de donneur, afin de distinguer avec précision le donneur et le receveur ADNcf dans un échantillon donné.

5. Informations complémentaires

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

5.1 Contenu du kit AlloSeq cfDNA et exigences de stockage

S'assurer d'avoir 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 lorsqu'il a été 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	Taille/type de tube	Couleur du bouchon
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	Taille/type de tube	Couleur du bouchon
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 entre 2 et 8 °C

Quantité	Réactif		
1	Billes de purification AlloSeq cfDNA	2 ml	clair
1	Tampon de resuspension AlloSeq cfDNA	2 ml	clair

5.2 Sécurité

Suivre les pratiques générales de sécurité du laboratoire et les pratiques de prévention de la contamination des salles blanches lors de l'exécution de cette procédure. Grâce au processus de gestion des risques de CareDx Pty Ltd, tous les risques ont été atténués à une limite acceptable. Le mode d'emploi doit être suivi, y compris le manuel fourni, pour éviter les scénarios d'utilisation dangereuse. Ce kit contient des matières dangereuses. Veuillez consulter les fiches de données de sécurité et prendre toutes les précautions nécessaires lors de la manipulation et de l'élimination. Porter un EPI approprié à tout moment, y compris des gants, des lunettes de sécurité et une blouse de laboratoire.



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

COMPOSANT DU KIT	SYMBOLE/PICTOGRAMES	AVERTISSEMENT DE SÉCURITÉ
NaOH 2N Contient de l'hydroxyde de sodium		Terme d'avertissement Danger Mentions de danger H314 - Provoque de graves brûlures cutanées et des lésions oculaires Mises en garde - UE (§28, 1272/2008) P260 - Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols P264 - Se laver soigneusement le visage, les mains et toute peau exposée après manipulation P280 - Porter des gants de protection/des vêtements de protection/une protection des yeux/du visage 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/sous la douche

COMPOSANT DU KIT	SYMBOLE/PICTOGRAMES	AVERTISSEMENT DE SÉCURITÉ
		P363 - Laver les vêtements contaminés avant réutilisation P310 - Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin P304 + P340 - EN CAS D'INHALATION : Amener la victime à l'air libre et la maintenir au repos dans une position confortable pour respirer. P305 + P351 + P338 - DANS LES YEUX : Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Retirer les lentilles de contact, si elles sont présentes et si c'est facile à faire. Continuer à rincer P405 - Stockage verrouillé P501 - Éliminer le contenu/réceptacle conformément aux réglementations locales, régionales, nationales et internationales, le cas échéant
Tampon de resuspension AlloSeq cfDNA Contient de l'EDTA		Terme d'avertissement Danger Mentions de danger H319 - Provoque une grave irritation des yeux Mises en garde - UE (§28, 1272/2008) P264 – Laver soigneusement la peau après manipulation P280 – Porter des gants de protection/des vêtements de protection/une protection des yeux/du visage P337 + P313 – Si l'irritation oculaire persiste : Consulter un médecin. P305 + P351 + P338 - DANS LES YEUX : Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes.

Pour plus de détails sur toutes les matières dangereuses contenues dans le kit AlloSeq cfDNA, veuillez consulter la fiche de données de sécurité SDS 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 pour effectuer le test, mais ne sont pas inclus dans le kit AlloSeq cfDNA.

Le protocole a été optimisé et validé à l'aide des éléments énumérés. Des performances comparables ne sont pas garanties lors de l'utilisation de consommables et d'équipements alternatifs.

Consommables requis, non fournis

Consommable	N° de fournisseur/catalogue	Quantité
ADN sans cellule Streck BCT CE	Streck, référence 218997	1
Kit d'acides nucléiques circulants Qiagen QIAamp	N° de catalogue Qiagen 55114	1
Tubes Eppendorf DNA LoBind, 1,5 ml	Eppendorf, référence 022431021 ou équivalent	1
Jeu de pipettes de 20 µl, 200 µl, 1 000 µl	Fournisseur général de laboratoire	1
Jeu de pipettes multicanaux de 20 µl, 200 µl	Fournisseur général de laboratoire	1
Embouts de pipette barrière de 20 µl, 200 µl, 1 000 µl	Fournisseur général de laboratoire	2 boîtes
Tubes à centrifuger coniques (15 ml)	Fournisseur général de laboratoire	1

Éthanol 200 (absolu) pour la biologie moléculaire	Sigma-Aldrich, référence E7023 ou équivalent	1
Plaques PCR 96 puits	Fournisseur général de laboratoire	1 plaque
Joints adhésifs Microseal « B »	Bio-Rad, référence MSB-1001 ou équivalent	2
Eau de qualité PCR	Fournisseur général de laboratoire	10 ml
Réactifs de quantification à base de fluorescence tels que Qubit High Sensitivity ou PicoGreen®	Thermo Fisher, référence catalogue Q32851 Thermo Fisher, référence P7581	Un kit
Plaque de fixation d'index (RÉUTILISABLE)	Illumina, FC-130-1005	1
Kit de réactifs de séquençage MiSeq V3 (150 cycles)	Illumina, MS-102-3001	1
Kit de sortie intermédiaire MiniSeq (300 cycles)	Illumina, FC-420-1004	1
Kit de réactifs à haut débit MiniSeq (150 cycles)	Illumina, FC-420-1002	1

Équipement de laboratoire général requis, non fourni

Équipement	N° de fournisseur/catalogue	Quantité
Illumina MiSeq	Illumina	1
Aimant DYNAMAG-2	Thermo Fisher, référence 12321D	1
Microcentrifugeuse	Fournisseur général de laboratoire	1
Centrifugeuse pour microplaques	Fournisseur général de laboratoire	1
Vortexeur	Fournisseur général de laboratoire	1
L'un des thermocycleurs à 96 puits suivants :		1
• Système PCR GeneAmp 9700	Applied Biosystems (arrêté)	
• Cycleur thermique Veriti	Thermo Fisher, référence 4375786	
• Cycleur thermique SimpliAmp	Thermo Fisher, référence catalogue A24811	
• Mastercycler® Nexus gradient (Bloc aluminium)	Eppendorf, référence 6331000025	
Agitateur de microplaques	Qinstruments, référence 1808-0506	1
L'un des éléments suivants (pour la quantification de la bibliothèque) :		1
• Qubit	Fournisseur général de laboratoire	1
• Lecteur de plaques à fluorescence	Thermo Fisher, référence catalogue Q33216	1

6. Coordonnées

Fabricant :

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

Distribué par :

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

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

CH-REP :

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

Support technique :

E-mail : techsupport-global@caredx.com

Tout incident grave lié au dispositif est signalé au fabricant et à l'autorité compétente de l'État membre ou du ministère local de la santé dans lequel l'utilisateur et/ou le patient est établi.

Pour plus d'informations, veuillez consulter le site Web de CareDx (<https://www.caredx.com/contact-us/>).

Produits connexes :

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 (IFU090-FR v1.1 est basé sur le document maître anglais IFU090_AlloSeq cfDNA IFU – CE IVD v10.0)
IFU 090 1.0	24Oct19	Première version du mode d'emploi d'AlloSeq cfDNA - version marquée CE rédigée Publiée le 17Dec19
IFU 090 2.0	16Mar20	Suppression de la référence à PCR ProFlex Réémis le 22Jun20
IFU 090 2.1	20Oct20	Remarque sur l'utilisation du NaOH ajoutée Réémis le 20Oct20
IFU 090 3.0	14Jan20	Mise à jour :Section 1 : ajout d'une référence à MiniSeq, ajout d'informations supplémentaires pour le kit flexible Section 1.2/2.3 : ajout d'une référence à 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 de MiniSeq au tableau des consommables requis Réémis le 21Jan21
IFU 090 3.1	22Jan21	Mise à jour de l'adresse des distributeurs de Vienne à Stockholm – voir CR 2020-097. Réémis le 27Jan21
IFU 090 4.0	04May22	C.Banda a apporté les modifications suivantes : Mise à jour de la couleur du bouchon des composants de la boîte 1 de transparent à rouge. Voir CR 2021-083. Mise à jour de la taille du tube pour les billes de purification conformément à CR 2022-010. Mise à jour du logo et des détails Qarad. Réémis le 04May sous le numéro DCR-2022-254
IFU 090 5.0	27May22	Mise à jour de la section Consommables et équipement pour inclure les tubes Streck. Supprimer l'énoncé « À usage de recherche uniquement ». Ajouter un importateur européen. Réémis le 31 mai 2022
IFU 090 6.0	21Mar23	Suppression du mot « CareDx » du nom du produit AlloSeq cfDNA et du logiciel AlloSeq cfDNA tout au long de ce mode d'emploi. Mise à jour de la section 6 pour la vigilance Ajout de nouveaux thermocycleurs selon CR 2021-052.
IFU 090 7.0	03Nov23	Ajout du représentant autorisé suisse.
IFU 090 8.0	17Nov23	Corriger la durée de conservation à 24 mois pour s'aligner sur les études de stabilité et la date de péremption de fabrication.
IFU 090-FR 1.0	28Mai25	Une déclaration générique a été ajoutée sur la qualité et le rendement de l'ADNcf, fournissant des exigences et clarifiant que la responsabilité de la validation des tubes de prélèvement sanguin alternatifs et/ou des kits d'extraction de l'ADNcf incombe aux utilisateurs.

Version	Date	Modification (IFU090-FR v1.1 est basé sur le document maître anglais IFU090_AlloSeq cfDNA IFU – CE IVD v10.0)
		Plusieurs cas de « Mélanger brièvement au vortex » ont été clarifiés avec « < 5 sec » et, dans certains cas, « < 5 sec ou mélange en pipetant de haut en bas », pour éviter toute confusion et tout vortex excessif. La déclaration sur la rotation de l'indice a été modifiée. Les remarques sur le lavage et la maintenance des instruments ont été déplacées à la section 2.5. Les recommandations de lavage et d'entretien des instruments ont été clarifiées. Le calcul de conversion de la concentration de la bibliothèque a été mis à jour avec le facteur de conversion correct, ce qui entraîne une diminution correspondante de la concentration de charge du séquenceur. Une déclaration sur l'optimisation de la concentration de chargement du séquenceur a été ajoutée. La plage de mesure du logiciel AlloSeq cfDNA a été mise à jour. Les recommandations relatives aux tubes de microcentrifugeuse à faible liaison et la référence du produit ont été spécifiées. Première version du document IFU090-FR. Mise à jour du nom et de l'adresse d'EC-REP.
IFU 090-FR 1.1	28Mai25	Date de publication corrigée