



AlloSeq HCT Software

Mode d'emploi

IFU108-FR

Numéro de version du logiciel : 2.2.2

Numéro de version du document : 3.0

Date de publication : Juillet 2025



ASHCTS2



CareDx Pty Ltd
20 Collie Street
Fremantle, WA 6160
Australie



CareDx AB
Franzégatan 5
112 51 Stockholm
Suède



QbD RepS BV
Groenenborgerlaan 16
2610 Wilrijk
Belgique



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

Table des matières

1.	Présentation.....	2
1.1	Vue d'ensemble du système et du logiciel	2
1.2	Utilisation prévue.....	2
1.3	Limitations.....	3
2.	Configuration requise et compatibilité informatique.....	3
2.1	Fichiers de données compatibles.....	3
3.	Instructions pour les utilisateurs expérimentés	3
4.	Instructions pour les nouveaux utilisateurs.....	4
4.1	Introduction	4
4.2	Receveurs et donneurs	4
4.3	Samples (Échantillons)	5
4.4	« Batches » (Lots).....	6
4.5	Analyse des résultats	7
4.6	Examen des résultats	7
5.	Résolution des problèmes	10
6.	Coordonnées.....	13

1. Présentation

Ce mode d'emploi (IFU) décrit les fonctionnalités et les étapes nécessaires pour effectuer l'analyse des données à l'aide du AlloSeq HCT Software. Le kit de test AlloSeq HCT et le AlloSeq HCT Software sont désignés collectivement sous le nom d'AlloSeq HCT.

Il existe un document « Guide d'installation » séparé (IFU106) pour la famille de produits AlloSeq, qui doit être lu avant ce mode d'emploi.

1.1 Vue d'ensemble du système et du logiciel

AlloSeq HCT est une solution multiplexée basée sur la PCR en une seule étape pour la préparation de banques de séquençage à partir d'ADN extrait d'échantillons biologiques de receveurs et de donneurs de greffes de cellules souches hématopoïétiques. Les données de séquençage générées (dans les fichiers FASTQ) sont utilisées pour calculer le pourcentage d'ADN du receveur et du ou des donneurs présents dans l'échantillon biologique afin de déterminer le niveau de chimérisme génétique du receveur post-greffe au moment où l'échantillon a été prélevé. Vous trouverez plus d'informations sur le test AlloSeq HCT dans le mode d'emploi du test AlloSeq HCT.

Les 202 polymorphismes nucléotidiques (SNP) cibles sont :

- (1) répartis sur les 22 paires de chromosomes autosomiques du génome humain,
- (2) bialléliques, avec une fréquence d'allèle comprise entre 0,4 et 0,6 dans toutes les populations,
- (3) situés dans des régions génomiques qui peuvent être séquencées avec un degré de confiance élevé, et
- (4) qui ne sont pas en déséquilibre de liaison ou associés à des maladies.

Les données de séquençage sont analysées à l'aide du AlloSeq HCT Software qui produit le pourcentage d'ADN (% d'ADN) pour un maximum de trois génomes distincts (contributeurs génétiques) détectés dans les échantillons post-greffe.

Le calcul du pourcentage d'ADN du receveur et du ou des donneurs présents dans les échantillons post-greffe est réalisé en déterminant la fraction de différents nucléotides séquencés à chaque emplacement SNP évalué. Les génotypes pré-greffe du receveur et du donneur obtenus à l'aide d'AlloSeq HCT doivent calculer le pourcentage d'ADN obtenu à partir de chaque contributeur génétique présent dans l'échantillon post-greffe. Les lectures qui se chevauchent sont fusionnées, alignées et comptées. Les résultats sont comparés aux génotypes du receveur et du ou des donneurs (SNP/loci informatifs). Il est recommandé d'entrer le génotype de tous les contributeurs génétiques (receveur et donneur) dans l'analyse des échantillons post-greffe, mais les échantillons peuvent toujours être analysés sans qu'un seul génotype soit manquant (soit un donneur, soit un receveur).

Une fois les données analysées par le logiciel, les résultats de tous les échantillons sont affichés dans une fenêtre d'interface utilisateur et sont exportés dans un fichier PDF ou Excel compatible. Les résultats comprennent des fractions d'ADN en % calculées pour chaque échantillon post-greffe, ainsi que des mesures de contrôle de la qualité utilisées par le logiciel pour accepter ou refuser un échantillon.

1.2 Utilisation prévue

L'utilisation prévue des produits AlloSeq HCT (kit de test et logiciel) fabriqués par CareDx Pty Ltd est d'aider l'utilisateur à surveiller la greffe après une greffe de cellules souches hématopoïétiques (HSCT).

Le kit AlloSeq HCT est destiné à être utilisé pour mesurer le % de donneur et le % d'ADN du receveur présents dans un seul échantillon chez les receveurs allogéniques de HSCT.

Le AlloSeq HCT Software est destiné à être utilisé avec les données générées à l'aide du kit AlloSeq HCT.

L'utilisation du logiciel est exclusivement réservée au personnel de santé dûment formé exerçant dans des laboratoires agréés. Le logiciel ne doit pas être utilisé comme seule source d'information pour des décisions à des fins cliniques. Le produit AlloSeq HCT n'est pas utilisé pour le diagnostic de la maladie et ne doit pas être utilisé comme seule base pour les décisions cliniques.

1.3 Limitations

Identité génétique entre le(s) donneur(s) et le(s) receveur(s)

AlloSeq HCT n'est pas en mesure d'effectuer une surveillance pour les jumeaux identiques.

Génotypes inconnus

- Donneur(s) sans lien de parenté : -
 - Il est possible d'effectuer une surveillance lorsque le génotype pré-greffe du receveur ou de l'un des donneurs est inconnu. Il n'est pas possible d'effectuer une surveillance s'il y a plus d'un génotype inconnu. Certaines mesures de contrôle qualité exigent la présence de tous les génotypes et sont désactivées si l'un des génotypes est inconnu.
 - Dans le cas d'un génotype inconnu, une rechute de la maladie ou une perte d'hétérozygotie peut avoir un impact sur les résultats
- Donneur(s) apparenté(s) - tous les génotypes pré-greffes sont requis pour les tests de surveillance.

Les anomalies connues sont enregistrées dans *TEC935_AlloSeq HCT Software - Known Anomalies*.

2. Configuration requise et compatibilité informatique

Reportez-vous au IFU106 AlloSeq Software Installation Guide pour plus de détails.

2.1 Fichiers de données compatibles

Le AlloSeq HCT Software est compatible avec le format de fichier zippé FASTQ (*.fastq.gz). Le système de séquençage Illumina génère ces formats de fichiers. Pour plus d'informations sur le format de fichier FASTQ, par exemple, consultez le MiSeq Reporter Generate FASTQ Workflow Reference Guide (document # 15042322).

3. Instructions pour les utilisateurs expérimentés

Les prélèvements pré-greffe sont recommandés pour AlloSeq HCT, pour toutes les parties concernées (receveur et tous les donneurs). Des échantillons pré-greffe sont nécessaires pour la surveillance multi-donneurs, pour toutes les parties concernées.

1. Créez des « Recipients » (Receveurs), ajoutez des « Donors » (Donneurs) aux « Recipients » (Receveurs), ajoutez des « Samples » (Échantillons) aux « Recipients » (Receveurs) et aux « Donors » (Donneurs).
 - a. Marquez les échantillons de « Donor » (donneurs) et de « Recipient » (receveur) pré-greffe comme des « genotypes » (génotypes).
2. Créez un « Batch » (Lot), ajoutez des « Samples » (Échantillons) au « Batch » (Lot). « Generate Run Sheet » (Générer une feuille de traitement) pour le Lot.
3. Exécutez le protocole de laboratoire, chargez le séquenceur.
4. Une fois le séquençage terminé, « Analyze Results » (Analyser les résultats) pour le « Batch » (Lot), sélectionnez le dossier contenant les fichiers fastq.
5. Échantillons pré-greffe – examinez les résultats, définissez « Approved » (Approuvé).
6. Échantillons de surveillance post-greffe – examinez les « Results » (résultats), définissez « Approved » (Approuvé) et exportez les résultats.

4. Instructions pour les nouveaux utilisateurs

4.1 Introduction

La convention dans ces modes d'emploi est de mettre en majuscule les « entités » dans le AlloSeq HCT Software, telles que « Recipient » (Receveur) ou « Sample » (Échantillon), pour attirer l'attention sur un élément qui est suivi par le logiciel.

Le AlloSeq HCT Software permet de suivre plusieurs tests de surveillance pour le même « Recipient » (receveur) au fil du temps. D'autres résultats de tests de chimérisme peuvent également être saisis dans le logiciel, pour faciliter la validation.

Les échantillons pré-greffe sont recommandés pour AlloSeq HCT et requis pour les échantillons de donneurs multiples. Le AlloSeq HCT Software peut surveiller un, deux ou trois* donneurs simultanément, à condition que le génotypage pré-greffe ait été effectué pour toutes les parties (receveur et tous les donneurs).

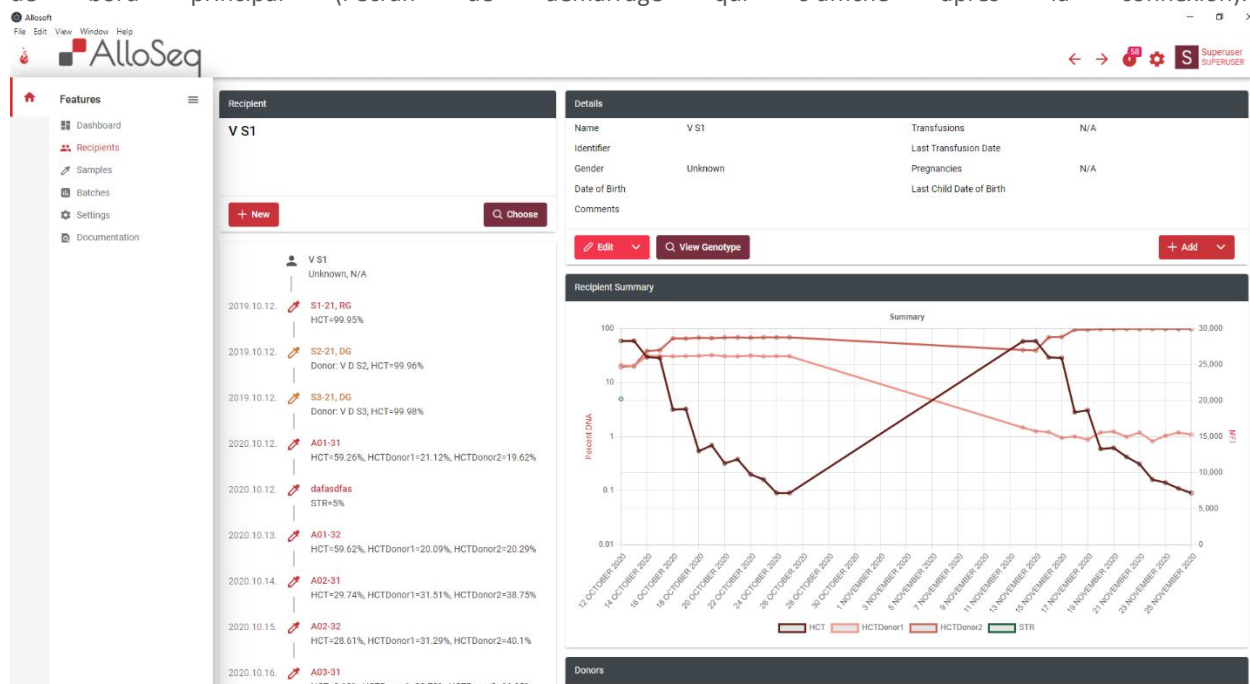
***Remarque :** Le logiciel n'a été validé que pour trois génomes, mais il est capable d'en analyser quatre. Il peut y avoir de rares cas où la variabilité génétique entre les parties est insuffisante pour suivre plusieurs donneurs apparentés. Les donneurs se voient actuellement attribuer des identifiants dans l'ordre dans lequel les échantillons sont saisis dans le AlloSeq HCT Software.

Le AlloSeq HCT Software permet également de combiner la « Sample Source » (source de l'échantillon) et la « Subpopulation » (sous-population), de sorte que les sous-populations séparées des cellules peuvent être surveillées séparément au fil du temps si nécessaire.

4.2 Receveurs et donneurs

Le point de départ du AlloSeq HCT Software est de créer un receveur et d'ajouter un ou plusieurs donneurs au receveur. Il est également possible d'ajouter au receveur les « Transplant time points », points temporels de la greffe (soit reçue, soit requise/prévue) et les « Treatments », traitements (interventions connues qui pourraient être utiles pour aider à interpréter les résultats du test).

L'écran « Recipient » est accessible depuis le menu principal à gauche (en cliquant sur la maison et en choisissant « Recipients », (Receveurs)) ou via le bouton rond de « Fast start » (Démarrage rapide) sur le « Dashboard », Tableau de bord principal (l'écran de démarrage qui s'affiche après la connexion).



Une fois sur l'écran « Recipient », vous pouvez ajouter un nouveau receveur en cliquant sur le bouton « New » (Nouveau). Vous pouvez également rechercher et choisir un receveur existant. Le logiciel n'effectue aucune vérification des doublons pour les receveurs. Il est donc préférable de commencer par vous assurer que le receveur que vous souhaitez ajouter n'a pas déjà été ajouté dans le logiciel.

L'écran « Recipient » contient une chronologie de tous les événements qui ont été enregistrés pour le receveur, ainsi qu'un graphique qui résume toutes les mesures AlloSeq HCT (et autres tests de chimérisme) qui ont été effectuées. Les résultats marqués comme « genotypes », génotypes (c'est-à-dire les résultats pré-greffe pour le receveur et le ou les donneurs) ne seront pas affichés dans le graphique. Vous pouvez ajouter des « Commentaires » (Commentaires) à chaque receveur, ce qui peut être utile pour résumer l'état clinique actuel.

Les donneurs sont répertoriés en-dessous du graphique de l'écran « Recipients ». Ici, vous pouvez ajouter de nouveaux donneurs, modifier les détails du donneur et ajouter des échantillons de génotypage pré-greffe aux donneurs (en utilisant le bouton « Edit », modifier). Le nom/l'identifiant et la « Relatedness » (parenté) sont obligatoires.

4.3 Samples (Échantillons)

Une fois que vous avez créé le(s) receveur(s) et le(s) donneur(s), la tâche suivante consiste à ajouter des « Samples » (échantillons). Cette opération peut être effectuée sur l'écran « Samples », accessible via le menu principal et le bouton de « Fast start » (Démarrage rapide). Vous pouvez également y accéder depuis l'écran Receveurs.

- Si vous commencez sur l'écran receveur, vous pouvez utiliser le bouton « Add » (la liste déroulante contient « Sample »), et pour les donneurs, vous pouvez cliquer sur le donneur et utiliser le bouton « Edit », qui a l'option « Add Sample ».
- Si vous commencez sur l'écran « Sample », vous pouvez sélectionner le bouton « New » et choisir d'ajouter un « Recipient Sample » (Échantillon de receveur), un « Control Sample » (Échantillon de donneur) ou un « Control Sample » (Échantillon de contrôle). Vous serez ensuite invité à sélectionner un receveur/donneur. C'est la seule façon d'ajouter des Échantillons de contrôle dans le logiciel.

Lors de l'ajout d'Échantillons, les seuls éléments de données obligatoires sont l'identifiant de l'Échantillon (il doit être unique parmi tous les Échantillons), la date de prélèvement de l'Échantillon et la concentration de l'ADN extrait (cette information n'est actuellement conservée qu'à des fins de référence). Pour HCT, vous pouvez également ajouter une source et une sous-population à votre échantillon. Si vous suivez différentes sous-populations à partir d'un seul échantillon de sang ou de moelle osseuse, celles-ci doivent être saisies dans le logiciel sous forme d'échantillons distincts. Chaque combinaison de source (y compris aucune) et de sous-population (y compris

aucune) fera l'objet d'un suivi distinct, par ex., un échantillon marqué à la fois comme « Source : Whole Blood + Subpopulation : CD14 », fera l'objet d'un suivi séparé de celui portant uniquement la mention « Source : Whole Blood », ou une mention « Subpopulation : CD14 ». Notez que ces métadonnées de l'Échantillon peuvent être modifiées à tout moment.

Pour les échantillons pré-greffe qui seront utilisés comme « genotype » pour le receveur ou le donneur, vous pouvez sélectionner l'option pour les définir comme genotype lors de la création de l'échantillon ou appuyer sur le bouton « Set Genotype » (Définir le genotype) une fois que vous avez créé l'échantillon. Cela permet au résultat d'être automatiquement attribué en tant que genotype une fois l'analyse terminée.

Sur l'écran Échantillons, il est également possible d'ajouter d'autres Mesures obtenues pour d'autres résultats de test effectués sur le même échantillon/au même moment. Pour AlloSeq HCT, il s'agit généralement de résultats STR ou qPCR pour l'échantillon, qui peuvent être utilisés pour valider les résultats AlloSeq HCT parallèlement à votre technique existante. Il est possible d'ajouter les résultats des tests d'anticorps ici. Vous pouvez également ajouter des « commentaires » à chaque Échantillon si nécessaire.

4.4 « Batches » (Lots)

Les « Batches » (lots) sont un groupe d'échantillons qui seront préparés ensemble à l'aide des réactifs AlloSeq HCT et séquencés ensemble. Vous pouvez créer un « Batch » à tout moment pour commencer à anticiper les prochaines semaines de test. Vous pouvez accéder à l'écran « Batch » via le menu principal et le bouton de démarrage rapide. Vous pouvez également ajouter un Échantillon à un lot existant ou en créer un nouveau depuis l'écran Échantillons.

Utilisez le bouton « New » (Nouveau) pour créer un nouveau Lot. Vous devrez ajouter une date et choisir « HCT » comme « Test Family » (Famille de test). Le nom du lot est facultatif mais recommandé pour distinguer plus facilement un lot d'un autre. Des commentaires peuvent également être ajoutés à un lot.

Sample	Stage	Assigned User	Results	QC
A01-31	Assigned	Superuser	59.26%	Pass
A02-31	Assigned	Superuser	29.74%	Pass
A03-31	Assigned	Superuser	3.18%	Pass
A04-31	Assigned	Superuser	0.54%	Pass
A05-31	Assigned	Superuser	0.32%	Pass
A06-31	Assigned	Superuser	0.2%	Pass
A07-31	Assigned	Superuser	0.09%	Pass
B01-31	Assigned	Superuser	58.29%	Pass

Une fois le lot créé, vous pouvez « Add Samples » (Ajouter des échantillons) et choisir les échantillons de la liste que vous souhaitez tester dans le lot. L'ordre des échantillons dans le lot correspondra à l'ordre des index d'échantillons à utiliser à partir de la plaque d'index dans le kit de réactifs AlloSeq HCT.

Remarque : l'ordre des échantillons dans le lot sera l'ordre dans lequel vous les ajoutez dans le lot. La seule façon de modifier l'ordre consiste à supprimer les échantillons et à les ajouter à nouveau.

Une fois que vous avez ajouté tous vos échantillons dans le lot, vous pouvez choisir l'option « Generate Run Sheet » (Générer une feuille d'exécution), ce qui créera un nouveau fichier de feuille d'exécution au format CSV à utiliser sur le séquenceur Illumina. Cette feuille d'exécution peut également être imprimée et apportée au laboratoire pour faciliter la mise en correspondance de chaque échantillon avec son index dans la plaque d'indexage.

Remarque : Soyez prudent si vous ouvrez ce fichier dans Excel - l'enregistrement des modifications apportées au fichier CSV dans Excel peut entraîner l'arrêt de son fonctionnement pour le séquenceur Illumina ! Il est généralement plus sûr d'imprimer ce fichier sous Excel et d'effectuer toute modification (normalement non requise) à l'aide d'un éditeur de texte tel que Notepad++.

Remarque : Vous pouvez choisir un « starting well » (puits de départ) pour la feuille d'exécution - si vous avez choisi de diviser un seul kit AlloSeq HCT en plusieurs cycles de séquençage, vous pouvez définir un puits de départ différent pour les index. Les index de la feuille d'exécution seront utilisés pour démultiplexer les données de l'échantillon (c'est-à-dire décider quelles données appartiennent à quel échantillon) à la fin du séquençage.

La feuille d'exécution peut être régénérée à tout moment – si rien n'a changé avec le lot, le contenu sera identique à chaque fois.

Une fois que la feuille de traitement a été générée, il est temps de passer au protocole de laboratoire AlloSeq HCT et de préparer les échantillons d'ADN pour le séquençage.

« Platemap » (Carte de plaque)

Un composant de carte de plaque a été ajouté au logiciel. Son utilisation est facultative pour l'utilisateur final. Cette fonctionnalité permet d'organiser le positionnement des puits sur la carte de plaque pour le fichier de sortie (feuille d'exécution).

4.5 Analyse des résultats

Une fois le séquençage terminé, un dossier contenant les fichiers fastq sera créé sur le séquenceur. Il y aura deux fichiers fastq par échantillon. Nous vous recommandons de copier/déplacer le dossier contenant les fichiers fastq vers le serveur pour l'analyse (l'accès aux fichiers fastq à distance sur un réseau peut ralentir l'analyse).

L'analyse est effectuée en accédant à l'écran « Batch », en sélectionnant le lot approprié et en utilisant le bouton « Analyze Results » (Analyser les résultats). Vous serez invité à renseigner l'emplacement du dossier contenant les fichiers fastq. Le système vérifiera le dossier pour s'assurer que tous les fichiers de chaque échantillon sont présents, puis il lancera une analyse. L'analyse prend environ 30 secondes par échantillon. Une fois qu'il est terminé, il créera une nouvelle « Task » (tâche) pour chaque résultat – ces tâches seront attribuées à la personne qui a effectué l'analyse. Vous pouvez consulter vos tâches dans le « Dashboard » (tableau de bord) principal lorsque vous vous connectez. Ces tâches peuvent être réattribuées à d'autres utilisateurs du logiciel si nécessaire. Ces tâches resteront ouvertes jusqu'à ce que le résultat ait été « Approved » (Approuvé) par un directeur de laboratoire (ou un super utilisateur).

Remarque : Les résultats s'afficheront dans les graphiques des écrans « Recipient » et « Sample », quel que soit leur statut d'approbation.

4.6 Examen des résultats

Il y a un résumé de très haut niveau de la qualité de chaque résultat visible dans le tableau de bord et l'écran lot - un bouton à code couleur avec une couleur verte, jaune ou rouge. Si le résultat contient un avertissement (jaune) ou une erreur (rouge), la raison de l'échec de ce contrôle qualité (CQ) s'affichera dans l'onglet « Quality Control » (Contrôle qualité) de l'écran « Results » (Résultats).

Les résultats peuvent être consultés (et doivent être examinés) individuellement. Cependant, il est généralement plus significatif de commencer par examiner le résultat résumé avec tous les autres résultats d'un receveur dans l'écran « Recipient ». Vous pouvez accéder à l'écran « Result » pour consulter les détails du résultat en cliquant sur

l'identificateur de l'échantillon dans la chronologie de l'écran « Recipient » (l'écran « Sample » s'ouvrira si vous n'avez pas encore de résultat pour cet échantillon).

Vous pouvez également accéder au détail de chaque résultat depuis le « Dashboard » principal en sélectionnant l'élément dans la liste des tâches et en choisissant « View Results » (Afficher les résultats) dans le menu « Workflow » (Flux de travail) ou en choisissant « Results » (Résultats) dans le menu « View » (Affichage). Vous pouvez également accéder aux résultats depuis l'écran « Sample » (cliquez avec le bouton droit de la souris sur l'élément dans la liste « Tests » puis sur « View Results » (Afficher les résultats)).

Une fois dans l'écran « Result », les détails de l'analyse sont disponibles. Le « Summary Result » (Récapitulatif des résultats) s'affiche. Celui-ci diffèrera dans son affichage en fonction des métadonnées disponibles.

- S'il s'agit d'un résultat de surveillance AlloSeq HCT avec des génotypes connus déjà attribués pour le receveur et le(s) donneur(s), le résultat indiquera les pourcentages exacts détectés pour chaque partie dans le mélange, par exemple, **Recipient 0,5 %, Donor 99,5 %**.
- S'il s'agit d'un résultat de génotypage du receveur avant la greffe (c'est-à-dire que l'échantillon est défini comme un « genotype »), le logiciel attribuera automatiquement le signal majoritaire comme receveur.
- S'il s'agit d'un résultat de génotypage de donneur avant la greffe (c'est-à-dire que l'échantillon est un « genotype »), le logiciel attribuera automatiquement le signal majoritaire à un donneur.

Le logiciel suppose que le génotypage pré-greffe aura été effectué à l'avance pour les receveurs et les donneurs d'AlloSeq HCT. Si vous avez un seul lot avec un mélange d'échantillons avant et après la greffe, les échantillons pré-greffe (génotypes) seront analysés en premier, puis tous les échantillons post-greffe par la suite.

Le flux de travail AlloSeq HCT peut être résumé comme suit :

1. Utilisez le logiciel pour créer des échantillons de génotype pré-greffe pour le receveur et le ou les donneurs, marquez ces échantillons comme « genotypes »
2. Utilisez le test pour préparer ces échantillons, séquencez-les et utilisez le logiciel pour analyser les résultats
3. Utilisez le test et le logiciel pour préparer et analyser les échantillons de surveillance post-greffe pour le receveur

Le récapitulatif des résultats indique le « Analysis Type » (Type d'analyse) utilisé pour l'analyse. Il existe deux types d'analyse :

- **En aveugle** : Effectué automatiquement pour tous les échantillons (pour AlloSeq HCT principalement utilisé pour le génotypage pré-greffe)
 - Comprend un mécanisme de « outlier detection » (Détection des valeurs aberrantes), pour filtrer automatiquement tout résultat statistique aberrant
 - Limitations : Il est impossible d'identifier avec certitude les contributeurs individuels dans un mélange, ni de gérer plusieurs donneurs. L'analyse en aveugle ne permet pas de détecter correctement le signal minoritaire lorsque sa proportion est relativement élevée, typiquement entre 30 et 70 % (c'est pourquoi il est recommandé d'effectuer un génotypage suivi d'une analyse ciblée complémentaire lors de l'utilisation d'AlloSeq HCT)
- **Ciblé** : Effectué automatiquement si les échantillons (de surveillance) appartiennent à des receveurs avec des génotypes de receveur et/ou de donneur.
 - Nécessite des données de séquençage approfondies
 - Il n'a pas de points faibles, mais nécessite un génotypage pré-greffe pour toutes les parties
 - Ne sera **pas** effectuée pour les échantillons/résultats qui sont déjà marqués comme étant un génotype, seule l'analyse en aveugle sera effectuée

Il est possible de réanalyser les résultats, en utilisant à nouveau le bouton « Analyze Results » (Analyser les résultats) de l'écran « Batch ». Il y a une option sur cet écran pour « Perform Only Meta Analysis » (Effectuer uniquement une méta-analyse) – cela signifie que l'analyse de base (et chronophage) des données fastq ne sera pas effectuée à nouveau, mais uniquement la méta-analyse (en aveugle/ciblée) qui suit l'analyse de base. Cela peut être utile pour

réanalyser rapidement les échantillons de surveillance lorsque les génotypes n'ont pas été définis correctement à l'avance.

Lors de l'examen des résultats, quelques éléments sont particulièrement importants :

- Le résultat principal, avec l'écart-type de tous les marqueurs informatifs
- « Total Reads Processed » (Nombre total de lectures traitées) : généralement limité par le logiciel à un maximum de 3 millions de lectures par échantillon. Si ce nombre est inférieur à 300 000 lectures, le système déclenche un avertissement de qualité (indiquant une perte potentielle de sensibilité pour les valeurs très faibles).
- « Avg Marker Coverage » (Couverture moyenne des marqueurs) : la quantité moyenne de lectures fastq couvrant chaque marqueur
- « QC Status » Statut QC (contrôle de la qualité) - dira « Passed » (Réussi) si tout est OK
- « QC Reason » (Raison QC) : s'affiche si l'état du contrôle qualité est « Warning or Failed » (Avertissement ou Échec). Les raisons motivant un problème de contrôle qualité peuvent être consultées dans l'onglet « Quality Control » (Contrôle qualité).

Plusieurs mesures de contrôle qualité sont mesurées, cela varie d'un échantillon à l'autre en fonction du type d'échantillon et du type d'analyse effectué. Le tableau suivant récapitule ces indicateurs de contrôle qualité.

Remarque : Les valeurs aberrantes sont détectées si la différence entre la valeur et la moyenne est supérieure à 5 fois la différence standard. Les marqueurs présentant un nombre total de lectures inférieur à 50 (« Low Coverage Markers », faible couverture) ou un troisième signal significatif attendu supérieur à 1 % (« Multi Allelic Marker », multialléliques) échoueront aux contrôles de qualité appliqués au niveau du locus et seront exclus de l'analyse.

Name	« Analysis » (Analyse)	« Sample Type » (Type d'Échantillon)	« Pass » (Réussi)	« Warn » (Avertissement)	« Fail » (Échec)	Description
« Too Many Outliers » (Trop de valeurs aberrantes)	« Blind » (En aveugle)	« All » (Tous)	<2	>=2	>10	Les valeurs statistiques aberrantes dans les résultats des marqueurs sont automatiquement détectées et exclues. Un nombre de valeurs aberrantes trop important peut indiquer une contamination ou un mélange dans l'échantillon.
« Markers Passing Filters » (Marqueurs passant les filtres)	« Blind » (En aveugle)	« All » (Tous)	>=186	<186	<101	Nombre total de marqueurs qui réussissent toutes les mesures de contrôle qualité au niveau du locus. Pour qu'un échantillon passe, le seuil minimal est de 92 % (186 marqueurs).
« Uniformity » (Uniformité)	« Blind » (En aveugle)	« All » (Tous)	>=151	<151	<81	Pour qu'un échantillon passe le filtre d'uniformité, ≥75 % (151) des 202 marqueurs doivent avoir une couverture supérieure à 20 % de la moyenne.
« Average Marker Coverage » (Couverture moyenne des marqueurs)	« Blind » (En aveugle)	« All » (Tous)	>=400	<400	<250	Nombre moyen de lectures couvrant chaque marqueur. Un nombre de lectures insuffisamment élevé entraînera une perte de sensibilité (avertissement) ou un résultat peu fiable (échec).
« Total Read » (Nombre total de lectures)	« Blind » (En aveugle)	« All » (Tous)	>300k	<=300k	<=150k	Nombre total de lectures traitées. Un nombre de lectures insuffisamment élevé entraînera une perte de sensibilité (avertissement) ou un résultat peu fiable (échec).
« Insufficient Heterozygous » (Hétérozygote insuffisant) « Markers » (Marqueurs)	« Targeted » (Ciblée)	2+ génotypes	>5	<=5	N/A	Attention s'il y a très peu de marqueurs hétérozygotes uniques disponibles.
« Unexpected Minor Signal » (Signal mineur inattendu)	« Targeted » (Ciblée)	2+ génotypes, aucun génotype manquant	0	<=2	>2	Il ne devrait pas y avoir de deuxième signal significatif (>0,5 %) dans les positions qui sont identiquement homozygotes pour toutes les parties.

						Détecte la contamination et les mélanges d'échantillons.
« Heterozygous » (Hétérozygote) « Imbalance » (Déséquilibre)	« Targeted » (Ciblée)	2+ génotypes, aucun génotype manquant	0	<=2	>2	Les positions identiquement hétérozygotes pour toutes les parties devraient être de 50/50 dans le résultat. Un nombre élevé de marqueurs déséquilibrés (en dehors de la plage de 70:30) est une indication possible d'un mélange ou d'une contamination de l'échantillon.
« Standard Deviation Too High » (Écart-type trop élevé)	« Targeted » (Ciblée)	Aucun génotype manquant	<=5	>5	>10	Un écart-type élevé dans les résultats est inattendu et peut être une indication d'un mélange de l'échantillon, d'une contamination ou d'informations génotypiques manquantes.
« Noise » (Bruit)	« Meta Analysis » (Méta-analyse)	« Genotype » (Génotype)	<0,5 %	>=0,5 %	>=25 %	On s'attend à ce que les génotypes antérieurs à la greffe soient à 100 % ceux du receveur ou du donneur. Les échantillons mixtes ne conviendront pas à l'utilisation comme génotype.

Par défaut, seuls les SNP les plus significatifs sont affichés. Si vous le souhaitez, vous pouvez choisir d'autres options pour filtrer la liste des SNP, dont l'affichage de tous les résultats SNP.

Un SNP sera considéré comme significatif dans l'un de ces deux cas :

- Il est hétérozygote chez une partie, et identiquement homozygote chez toutes les autres parties, par exemple AT chez le receveur et AA chez tous les donneurs
- Il est homozygote chez une partie et homozygote de façon opposée chez toutes les autres parties, par exemple TT chez un donneur et AA chez le receveur et tous les autres donneurs

L'onglet « Statistics » (Statistiques) fournit des points de données supplémentaires pour ceux qui s'intéressent davantage à la bioinformatique sous-jacente.

Lorsque vous êtes confiant quant aux résultats, vous pouvez les envoyer pour approbation au directeur du laboratoire afin qu'il les « Approve and Export » (approuve et les exporte). Les résultats peuvent être exportés aux formats CSV, TSV ou PDF. Plusieurs résultats peuvent être exportés ensemble depuis le « Dashboard » principal ou la liste des tâches.

5. Résolution des problèmes

Si tous les indicateurs de contrôle de la qualité sont verts/réussis, il ne devrait pas y avoir besoin de procéder à une résolution de problèmes sur les résultats.

Les indicateurs de contrôle qualité jaunes/Avertissement indiquent qu'un point du résultat nécessite un contrôle manuel. Dans ce cas, les résultats ne seront pas affectés et pourront être transmis. Les indicateurs de contrôle qualité Avertissement peuvent également fournir des informations générales si d'autres mesures de contrôle qualité ont échoué.

Les indicateurs de contrôle qualité rouges/Échec indiquent que le résultat est incertain. Dans certains cas, il est encore possible d'accepter et de transmettre des résultats présentant des échecs de contrôle qualité. Voir les exemples ci-dessous.

Un séquençage profond est nécessaire pour une sensibilité maximale

AlloSeq HCT n'est pas en mesure de fournir les niveaux de sensibilité les plus élevés si des données de séquençage insuffisantes ont été créées par la préparation et le séquençage d'un échantillon. Dans ce cas, l'échantillon sera marqué d'un échec du contrôle qualité en raison des mesures de contrôle qualité pour la « Marker Coverage » (Couverture moyenne des marqueurs) et/ou le « Total Reads » (Nombre total de lectures). Cependant, si le résultat

est supérieur à 1 %, les pertes de sensibilité n’auront pas d’impact majeur et le résultat pourra probablement être transmis malgré tout (à moins que d’autres indicateurs de contrôle qualité n’aient également échoué). Si le résultat est inférieur à 1 %, il est recommandé de répéter l’échantillon (répéter la préparation de l’échantillon en commençant par le début du protocole du test).

Génotypes bruyants

Un échantillon de génotype pré-greffe peut échouer à la mesure du contrôle qualité du bruit, ce qui indique que l’échantillon n’est pas à 100 % receveur ou donneur comme prévu. Cet échantillon peut encore être utilisé comme génotype dans ce cas, car le logiciel a une certaine tolérance intégrée pour cela (<25 %). Il est recommandé de vérifier le génotype à l’aide de la fonction « View Genotype » (Afficher le génotype) sur l’écran « Recipient » avant d’utiliser cet échantillon comme génotype pour les échantillons de surveillance ultérieurs. Le génotype du donneur doit être propre, le bruit attendu étant inférieur ou égal à 0,5 %.

Lot bruyant

Si plusieurs échantillons de génotype d’un lot échouent avec le paramètre de contrôle qualité « Noise » (Bruit) et/ou si plusieurs échantillons de surveillance échouent avec l’indicateur de contrôle qualité « Unexpected Minor Signal » (Signal mineur inattendu), cela est probablement dû à une contamination de l’index causée par l’utilisation des mêmes index d’échantillon que lors du séquençage précédent et/ou à la non-conformité du nettoyage du séquenceur entre les passages par rapport aux directives du mode d’emploi du test. Dans ce cas, les génotypes seront toujours utilisables et des échantillons de surveillance avec des résultats plus élevés (>10 %) pourront probablement encore être signalés, mais de faibles niveaux de contamination comme celui-ci nécessiteront la répétition d’échantillons de surveillance avec de faibles résultats.

Contamination de l’échantillon

La mesure de contrôle qualité du « Unexpexted Minor Signal » peut détecter une contamination supérieure à 0,5 % dans un échantillon. Cette mesure du CQ n’est disponible que pour « Targeted Analysis » (l’analyse ciblée), si tous les génotypes antérieurs à la greffe sont connus. Si le résultat est faible et que cette mesure de contrôle qualité a échoué, l’échantillon doit être répété.

Mélange d’échantillons

Si la métrique de contrôle qualité du « Unexpexted Minor Signal » échoue avec un « Heterozygous Imbalance » déséquilibre hétérozygote et/ou un écart-type trop élevé, ce n’est probablement pas l’échantillon correct pour le receveur, il y a donc eu une confusion avec les échantillons. Une attention particulière doit être portée aux autres échantillons du même lot, car deux échantillons peuvent avoir été échangés par accident. Il peut être possible de résoudre cette confusion sans répéter les échantillons, mais nous vous recommandons de contacter le support technique de CareDx et de demander leur aide.

Failed								
Name	Status	Algorithm	Sample Type	Value Detected	Pass Threshold	Warn Threshold	Fail Threshold	Description
Unexpected Minor Signal		Targeted	2+ Genotypes	55	0	<=2	>2	There should be no significant (>0.5%) second signal in positions that are identically homozygous for all parties. Detects contamination and sample mix ups.
Heterozygous Imbalance		Targeted	2+ Genotypes	37	0	<=2	>2	Identically heterozygous positions for all parties should be 50:50 in the result. High numbers of imbalanced markers (outside 70:30 range) is a possible indication of sample mix up or contamination.
Standard Deviation Too High		Targeted	All	30.08	<=5	>5	>10	A high standard deviation in the results is unexpected and may be an indication of sample mix up, contamination or missing genotype information.

« Unexpexted Minor Signal » (UMS) (Signal mineur inattendu)

La mesure de contrôle qualité (CQ) UMS repose sur l'analyse de marqueurs non informatifs, c'est-à-dire des marqueurs homozygotes pour lesquels le donneur et le receveur partagent le même nucléotide.

Cette métrique n'est utilisée que dans le cadre de « Targeted Analysis » (l'Analyse ciblée). Elle constitue un indicateur sensible de contamination et avertit l'utilisateur que l'échantillon pourrait contenir des éléments inattendus. Il arrive toutefois qu'elle génère une alerte simplement en raison d'une faible couverture. Il est donc essentiel de bien interpréter les avertissements et les échecs afin de tirer des conclusions précises et d'éviter de répéter inutilement les analyses.

Lorsqu'il n'y a que quelques alertes UMS, le résultat est généralement fiable. Une faible quantité de bruit de fond reste acceptable. Souvent, ces avertissements ou échecs sont corrélés à une couverture insuffisante, un faible nombre total de lectures, une couverture moyenne des marqueurs limitée, un nombre réduit de marqueurs passant les filtres et/ou une uniformité moindre.

En revanche, lorsque de nombreuses alertes UMS sont présentes, il est recommandé de répéter l'analyse de l'échantillon. Si plusieurs échantillons d'une même série, pourtant dotés d'une couverture adéquate, présentent également un grand nombre d'alertes UMS, il convient alors d'envisager une contamination potentielle affectant les échantillons, l'essai ou le séquenceur.

L'utilisateur peut identifier les marqueurs à l'origine des alertes en examinant l'ensemble des marqueurs figurant dans la liste des SNP et en les comparant aux génotypes.

Lorsque les avertissements ou échecs UMS concernent un déséquilibre hétérozygote et/ou un écart type élevé, il est généralement conseillé de répéter l'analyse. Cela est souvent lié à un échange d'échantillons ou à une contamination importante. Ce profil peut également être observé en cas d'anomalies chromosomiques ou de perte d'hétérozygotie.

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. : +61-8-9336-4212e
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/>

Amériques
CareDx Lab Solutions Inc.,
901 S. Bolmar St., Suite R, West Chester, PA 19382
Tél : 1-877-OLERUP1
Fax : 610-344-7989
E-mail : orders-us@caredx.com
Site web : <http://www.caredx.com>

Support technique et signalement d'incidents graves :

E-mail : techsupport-labproducts@caredx.com

Tout incident grave survenu en relation avec le dispositif doit être signalé au fabricant et à l'autorité compétente de l'État membre 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 :

AlloSeq HCT

Historique de la méthode

Version	Date	Modification (IFU108-FR v3.0 est traduit du document principal en anglais IFU108_AlloSeq HCT Software v2 IFU CE IVD v9.0)
IFU108 v1.0	31 mars 22	Première version du mode d'emploi CE pour le AlloSeq HCT Software, se reporter aux CR-2022-005 et DCR 2022-188. Publié le 1 avr. 22.
IFU108 v2.0	2 mai 22	Ajout des détails de l'importateur (symbole). Déplacement des limitations à la section 1.2. Ajout section 2. Suppression de la métrique CQ pour les marqueurs homozygotes insuffisants. Ajout section 5 résolution des problèmes. Republié le 5 mai 22 (DCR 2022-255)
IFU108 v2.1	11 mai 22	Mise à jour pour corriger le code postal de Qarad. Republié le 12 mai 22 (DCR 2022-272)
IFU108 v3.0	30 août 22	La version 2.1.1 a supprimé la restriction sur l'analyse à double parent, affiné les seuils pour 3 métriques de contrôle qualité Section 10 : Ajout d'exigences en matière de rapports de vigilance. Republié le 21 sept. 22.
IFU108 v4.0	25 juil. 23	Mise à jour 1.2 Limitations – génotypes requis pour les échantillons de surveillance avec des donneurs apparentés. Mise à jour 4.1 Receveurs et donneurs – Pour plus de détails sur les donneurs, la parenté est requise si des génotypes sont manquants. Ajout d'une fonctionnalité optionnelle Platemap à la section 4.4 « Batches » en tant qu'utilisation optionnelle des fonctionnalités
IFU108 v5.0	24 oct. 23	Ajout des coordonnées du représentant suisse.
IFU108 v6.0	11 janv. 24	Mise à jour 1.3 Limitations - Dans les cas d'un génotype inconnu, une rechute de la maladie ou une perte d'hétérozygotie peut avoir un impact sur les résultats. DCR-2023-217
IFU108 v7.0	9 fév. 24	Ajout de précisions concernant les identifiants d'échantillons de donneurs.
IFU108-FR v1.0	21 Mars 24	La première traduction en français.
IFU108-FR v2.0	26 juil. 24	Ajout du cas où le chimérisme total n'est pas égal à 100 % dans la section Résolution des problèmes.
IFU108-FR v3.0	04 juil. 25	Mise à jour du nom et de l'adresse pour EC-REP. Suppression de la mention « Pourcentage total différent de 100 % » de la section Résolution des problèmes. Reformulation des informations concernant l'analyse en aveugle. Ajout de la section Signal mineur inattendu dans la partie Résolution des problèmes.