



AlloSeq HCT

AlloSeq HCT

Mode d'emploi

IFU100-FR

Numéro de version : 1.0

REF ASHCT.1(96)-IVD

IVD

CE



CareDx Pty Ltd
20 Collie Street
Fremantle,
WA 6160
Australie



CareDx AB
Franzégatan 5
SE-112 51
Stockholm
Suède

EC **REP**

Qarad BV
Cipalstraat 3
2440 Geel
Belgique



CareDx[®]
CareDx Pty Ltd

CH **REP**

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

Table des matières

1.	Introduction	3
1.1.	Principe	3
1.2.	Utilisation prévue.....	4
1.3.	Limites et contre-indications	5
1.4.	Définitions.....	5
1.5.	Interférences de substances	6
1.6.	Caractéristiques des performances	7
1.7.	Précision.....	7
1.8.	Spécificité.....	7
1.9.	Reproductibilité et répétabilité (précision)	7
1.10.	Limite de détection/plage de mesure.....	7
1.11.	Intervalle de mesure	7
1.12.	Prérequis.....	8
2.	Workflow de préparation de la banque AlloSeq HCT	8
2.1.	Considérations sur l'échantillon	8
2.2.	Amplification de la PCR multiplexe en une étape.....	8
	Avant de commencer.....	8
	Procédure.....	10
2.3.	Lavage de la banque et détermination de la concentration.....	11
	Avant de commencer.....	11
	Procédure.....	12
3.	Workflow de séquençage	13
3.1.	Dénaturation et dilution de la banque pour le séquençage.....	14
	Avant de commencer.....	14
	Procédure (sans contrôle PhiX).....	14
	Procédure (avec contrôle PhiX)	14
4.	Informations supplémentaires.....	15
4.1.	Contenu du kit AlloSeq HCT et conditions de stockage	15
4.2.	Sécurité associée à AlloSeq HCT	16
4.3.	Consommables et équipements requis supplémentaires	17
4.4.	Références pertinentes.....	18
5.	Coordonnées.....	19
6.	Références	20

1. Introduction

Ce mode d'emploi (IFU) décrit les étapes permettant de préparer une banque pour le séquençage à l'aide du kit AlloSeq HCT, afin de générer des données à analyser avec le logiciel AlloSeq HCT. Le logiciel et le kit de réactif font partie du produit AlloSeq HCT.

1.1. Principe

Le kit de réactif AlloSeq HCT et le logiciel AlloSeq HCT (dénommés ensemble « AlloSeq HCT ») forment un système qui permet la quantification relative du chimérisme génétique dans un échantillon d'ADN issu d'un patient ayant reçu une greffe de cellules souches hématopoïétiques (HCT – Hematopoietic Cell Transplant). Les cellules souches hématopoïétiques issues d'un donneur ont un génome différent de celui des cellules souches hématopoïétiques du receveur. Après la HCT, les cellules greffées reconstruisent la moelle osseuse et le système sanguin du receveur. Toutefois, les cellules du donneur et du receveur peuvent être détectées à plusieurs niveaux après la HCT, ce qui donne lieu à un chimérisme génétique chez le receveur.

AlloSeq HCT est un test de séquençage de nouvelle génération (NGS) ciblé qui utilise les différences des polymorphismes mononucléotidiques (SNP) pour mesurer la quantité d'ADN dérivé du receveur et du donneur présente dans un échantillon post-greffe. Chaque kit de réactif contient tous les réactifs requis pour l'amplification multiplexée de 202 locis par échantillon. Chaque produit d'amplification couvre un SNP unique, ces derniers sont répartis sur tous les chromosomes autosomiques humains. Tous les produits d'amplification prêts pour le séquenceur sont générés en une seule étape d'amplification et contiennent la région cible, des indices doubles spécifiques à l'échantillon et des adaptateurs pour cuve à flux continu, comme indiqué dans la Figure 1. Une fois toutes les banques d'échantillon générées et regroupées, la banque ainsi obtenue fait l'objet d'un nettoyage par billes magnétiques pour éliminer les amorces non utilisées avant la quantification. Le workflow Illumina MiSeq est ensuite suivi par la préparation de la banque pour le séquençage. La réaction de séquençage est effectuée à l'aide du kit de réactif MiSeq v3 à l'aide d'une lecture d'extrémités appariées de 75 bp et d'un double code-barres. Une feuille d'échantillon est préparée pour la réaction de séquençage et l'analyse des données des fichiers fastq obtenus est effectuée à l'aide du logiciel AlloSeq HCT.

Le logiciel AlloSeq HCT bénéficie d'un algorithme propriétaire qui permet la résolution de jusqu'à 3 génomes différents (contributeurs génétiques) qui sont présents dans un même échantillon post-greffe (1 receveur et jusqu'à 2 donneurs). Les informations du génotype pré-greffe générées avec AlloSeq HCT pour les 3 ou au moins 2 des contributeurs génétiques présents dans l'échantillon post-greffe sont requises et peuvent être obtenues avant ou en même temps que l'analyse des échantillons post-greffe. L'algorithme propriétaire qui utilise des fréquences connues dans la population des SNP séquencés et les distributions attendues des allèles permet de calculer les pourcentages des différents génomes présents dans un même échantillon. Le processus d'analyse des données est automatisé et nécessite moins de 20 minutes d'intervention. L'interface utilisateur intuitive affiche le % de fraction d'ADN de chaque contributeur génétique présent dans l'échantillon post-greffe. En outre, il est possible de générer des fichiers de résultats compatibles avec Excel et pouvant être intégrés dans les systèmes LIMS pour faciliter l'édition de rapports. Pour plus de renseignements sur la réalisation de l'analyse de données, consultez le mode d'emploi du logiciel AlloSeq HCT.

Le produit AlloSeq HCT bénéficie des fonctions et performances techniques suivantes :

- Délais rapides :
 - 3 h pour la préparation de banques
 - 3 h d'intervention manuelle
 - Résultats d'ADN en 24 h max.
- Logiciel d'analyse des données automatisé
- Compatible avec l'instrument Illumina MiSeq et le kit de réactif MiSeq v3 (150 cycles)
- Capacité de séquençage flexible avec des banques contenant entre 8 et 48 échantillons par analyse.
- Nécessite une faible quantité d'ADN de 10 ng et une concentration minimale de 0,625 ng/μl

- Performances techniques évaluées à 1 % par le contrôle de séquençage Illumina PhiX v3
- Sensibilité élevée pour présenter la limite inférieure de quantification (évaluée selon la description de la section « Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation » (Protocole de détermination des limites de détection et des limites de quantification), CLSI oct. 2004) de 0,36 % pour les échantillons post-greffe à deux donneurs.
- Précision élevée pour présenter la variabilité :
 - entre les expériences, égale à 1,7 % pour une fraction d'ADN de 10 % et à 6,5 % pour une fraction d'ADN de 1 %
 - pour une même expérience, égale à 1,3 % pour une fraction d'ADN de 10 %, et à 4,7 % pour une fraction d'ADN de 1 %.
- Précision élevée entre la détermination de la fraction d'ADN attendue et observée avec une valeur

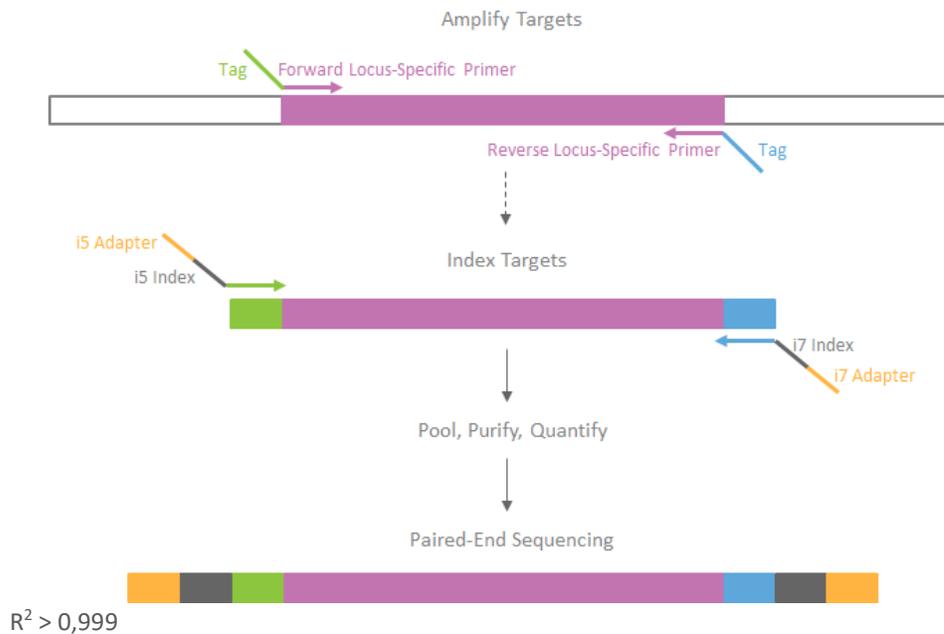


FIGURE 1. L'ETAPE D'AMPLIFICATION UNIQUE IMPLIQUE L'UTILISATION D'AMORCES SPECIFIQUES A LA CIBLE ET QUI CONTIENNENT DES CODES-BARRES D'ECHANTILLONS (INDICES I5 ET I7) ET DES ADAPTATEURS DE SEQUENCEURS (ADAPTATEURS I5 ET I7) POUR GENERER DES PRODUITS D'AMPLIFICATION PRETS POUR LE SEQUENCEUR EN UNE SEULE ETAPE. LA BANQUE OBTENUE EST ALORS PRETE POUR UNE

1.2. Utilisation prévue

Le kit et le logiciel AlloSeq HCT correspondent à des tests diagnostiques semi-quantitatifs in vitro pour surveiller le chimérisme dans des échantillons de receveur post-greffe HCT allogéniques, dans lesquels le chimérisme mixte (CM) implique un échec de la greffe en présence de cellules hématopoïétiques du donneur et du receveur. Les échantillons correspondent à de l'ADNg purifié issu du sang de patients impliqués dans une greffe, du donneur et du receveur (patient greffé, avant la greffe).

Le produit est destiné à être utilisé avec les instruments de séquençage Illumina MiSeq, ainsi que le logiciel AlloSeq HCT.

Le produit est destiné à être utilisé par du personnel ayant reçu une formation adaptée dans des laboratoires réglementés.

Les produits AlloSeq HCT sont destinés à être utilisés uniquement par des professionnels et ne doivent pas servir de paramètre unique à une décision clinique. Les produits AlloSeq HCT ne doivent pas être utilisés pour le diagnostic de pathologies.

1.3. Limites et contre-indications

Le produit AlloSeq HCT est utilisé pour calculer le pourcentage d'ADN (% d'ADN) de jusqu'à trois génomes distincts présents dans des échantillons post-greffe de cellules hématopoïétiques (HCT).

NE PAS UTILISER AlloSeq HCT chez des patients ayant reçu une greffe dans les cas suivants :

- Receveur ayant bénéficié d'une ou plusieurs procédure(s) HCT impliquant 3 donneurs génétiquement distincts ou plus ;
- Receveur ayant reçu une greffe d'un jumeau monozygote (identique) ;
- 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).

1.4. Définitions

Cette section contient les définitions des acronymes et concepts utiles pour comprendre les instructions de préparation d'une banque de séquençage AlloSeq HCT.

Acronyme/terme	Définition
Échantillon post-greffe	Correspond à l'ADN extrait d'un échantillon biologique issu du sang ou de la moelle osseuse d'un patient ayant reçu une HCT à des fins d'analyse du chimérisme génétique. Comme la source du tissu contient des cellules du ou des donneur(s) et du receveur, l'ADN extrait contiendra un mélange de plusieurs génomes humains distincts pouvant être évalués par AlloSeq HCT.
Contributeurs génétiques	Génomes distincts présents dans un échantillon post-greffe.
Locus	Emplacement spécifique dans un génome.
Produit d'amplification	Produit de PCR issu du dosage AlloSeq HCT représentant une région génomique qui contient un SNP bi-allélique parmi le total des 202 SNP.
Génotype	Informations génétiques recueillies pour les échantillons d'ADN à l'aide d'AlloSeq HCT pour les 202 SNP ciblés par le dosage.
Fichiers fastq	Données générées par l'instrument Illumina MiSeq et utilisées pour l'analyse de données afin de calculer le pourcentage d'ADN. Chaque échantillon est associé à une paire de fichiers fastq (R1 et R2, lectures respectivement vers l'avant et vers l'arrière) contenant les lectures séquencées d'un échantillon biologique préparé à l'aide du dosage AlloSeq HCT.
Feuille de l'échantillon	Fichier au format .csv qui recueille les informations nécessaires pour le séquençage sur le MiSeq et l'analyse de données sur le logiciel AlloSeq HCT.
% d'ADN	Pourcentage calculé de la fraction d'ADN de chaque contributeur génétique présent dans l'échantillon post-greffe.
Analyse de données	Traitement de fichiers fastq pour estimer le % d'ADN et calculer la qualité et les mesures de performance.
Donneur unique	Dans un échantillon post-greffe, on s'attend à retrouver deux génomes distincts, car il est issu d'un receveur de HCT ayant reçu des cellules hématopoïétiques d'un seul donneur.
Deux donneurs	Dans un échantillon post-greffe, on s'attend à retrouver trois génomes distincts, car il est issu d'un receveur de HCT qui a reçu des cellules hématopoïétiques de deux donneurs uniques.

1.5. Interférences de substances

Inhibiteur	Source potentielle	Risque	Commentaires
EDTA	Tampon TE, tubes de collecte de sang	Très faible	Resuspendre l'ADN dans du Tris-HCl pH 8 ou du TE avec < 1 mM EDTA. Utiliser un kit de préparation de l'ADN sanguin et/ou éviter les tubes de prélèvement de sang contenant de l'EDTA
Alcools	Éthanol, isopropanol, alcool isoamylique	Faible	Vérifier que les granulés d'ADN ou les billes sont séchés à l'air et vérifier visuellement l'absence de gouttelettes d'éthanol (1 % d'éthanol = 1,25 µl à 80 % dans une réaction PCR de 100 µl). Le protocole AlloSeq HCT comporte plusieurs étapes de lavage à l'éthanol à 80 %, ce qui fait de l'inhibition due au transfert d'éthanol un risque faible, mais légèrement plus élevé que les autres facteurs.
Excès de sels	KCl, NaCl, CsCl, NaAc	Très faible	S'assurer de rincer soigneusement les granulés d'ADN ou les billes avec de l'éthanol à 80 % Vérifier que la DO 260/230 de l'ADN génomique initial est d'environ 2
Sels chaotropiques	Chlorure de guanidinium ; MgCl ₂ ; urée	Très faible	S'assurer de rincer soigneusement les granulés d'ADN ou les billes avec de l'éthanol à 80 % Vérifier que la DO 260/230 de l'ADN génomique initial est d'environ 2
Phénol : chloroforme	Transfert organique	Très faible	Un composant de la procédure d'extraction d'ADN commerciale Trizol souvent utilisée S'assurer de rincer soigneusement les granulés d'ADN ou les billes avec de l'éthanol à 80 % Vérifier que la DO 260/230 de l'ADN génomique initial est d'environ 2
Protéines	BSA, PEG, albumine sanguine	Très faible	Utiliser des kits de préparation de l'ADN sanguin du commerce Vérifier que la DO 260/280 de l'ADN génomique initial est supérieure à 1,8
Hème, hémoglobine, immunoglobulines	Sang	Très faible	Éviter l'utilisation d'échantillons sanguins présentant une hémolyse importante Utiliser des kits de préparation de l'ADN sanguin du commerce Vérifier que la DO 260/280 de l'ADN génomique initial est supérieure à 1,8
Détergents/DTT	Désoxycholate de sodium, sarkosyl, SDS, NP40, Tween 20, Triton X-100, N-octyl glucoside	Très faible	S'assurer de rincer soigneusement les granulés d'ADN ou les billes avec de l'éthanol à 80 % Vérifier que la DO 260/230 de l'ADN génomique initial est d'environ 2
Protéases	Protéinase K, manipulation des échantillons	Très faible	Utiliser des kits de préparation de l'ADN sanguin ou salivaire du commerce Porter un EPI approprié à tout moment
Nucléases	Manipulation d'échantillons, enzymes de restriction, nucléase micrococciale	Très faible	Utiliser des kits de préparation de l'ADN sanguin du commerce Porter un EPI approprié à tout moment
ADN/ARN exogène	Transfert, contamination	Très faible	Préparer l'ADN génomique dans une zone pré-PCR dédiée
Supports	ARN, héparine, glycogène	Très faible	Utiliser un kit de préparation de l'ADN sanguin et/ou éviter les tubes de prélèvement de sang contenant de l'héparine

Ions métalliques en excès	Mg2+ du tampon PCR, ions Fe	Très faible	S'assurer de rincer soigneusement les granulés d'ADN ou les billes avec de l'éthanol à 80 % Vérifier que la DO 260/230 de l'ADN génomique initial est d'environ 2
Médicaments antiviraux (ex. : acyclovir)	Sang	Très faible	Utiliser des kits de préparation de l'ADN sanguin du commerce Vérifier que la DO 260/280 de l'ADN génomique initial est supérieure à 1,8
Poudre des gants	Gants poudrés	Très faible	Utiliser des gants non poudrés
Tubes pour PCR avec irradiation UV	Traitement UV des tubes pour PCR	Très faible	Éviter de faire subir un traitement par UV au matériel en plastique

1.6. Caractéristiques des performances

La performance du dosage a été évaluée à l'aide d'échantillons témoins d'ADNg à génome unique obtenus auprès de SeraCare, d'ADNg de volontaires sains et d'un panel de mélanges d'ADNg composés des témoins de SeraCare. La performance du dosage a été évaluée en fonction de critères d'acceptation définis.

1.7. Précision

Les produits AlloSeq HCT, y compris le kit pour HCT(96) et le logiciel, sont conçus pour quantifier le chimérisme. Dans le cadre d'études de vérification et d'évaluation des performances, les produits AlloSeq HCT ont été utilisés pour évaluer la quantification du chimérisme de témoins à un seul génome, d'un panel de mélanges à plusieurs génomes et d'échantillons cliniques de receveur/donneur/post-greffe. Les résultats concernant le chimérisme d'AlloSeq HCT montrent une forte corrélation avec ceux d'autres méthodes de test du chimérisme standard du secteur (NGS et STR) pour des échantillons cliniques, avec une valeur R² de 0,9991.

1.8. Spécificité

Dans le cadre du dosage AlloSeq HCT, la spécificité est définie comme le pourcentage de lectures de séquençage mappées aux loci cibles. Les données de vérification ont démontré une spécificité moyenne de 97,43 % (valeur minimale observée de 90,17 % et maximale de 98,78 %).

1.9. Reproductibilité et répétabilité (précision)

Les produits AlloSeq HCT ont prouvé qu'ils permettaient d'obtenir des résultats équivalents d'un lot à l'autre, dans le cadre d'études de vérification, et d'un utilisateur à l'autre, d'un instrument à l'autre et d'un laboratoire à l'autre dans le cadre d'études de vérification et d'évaluation des performances. Les produits AlloSeq HCT ont prouvé qu'ils permettaient d'obtenir des résultats équivalents pour les mêmes échantillons lors d'analyses répétées, avec des coefficients de variation (CV) inférieurs à 15 % pour tous les échantillons supérieurs à la LOD du dosage.

1.10. Limite de détection/plage de mesure

Avec la source recommandée de 10 ng d'ADNg, la limite de détection (LOD) d'AlloSeq HCT est de 0,22 %. La limite de blanc (LOB) et la limite de quantification (LOQ) sont de respectivement de 0,13 % et 0,36 %.

1.11. Intervalle de mesure

Le dosage AlloSeq HCT a été validé selon les intervalles de mesure requis de 0 à 100 % (avec le génotype du receveur ou du donneur), afin de distinguer correctement l'ADN du donneur et celui du receveur pour un échantillon donné. Le dosage a été validé sur des échantillons chimériques avec une plage de 0,05 à 60,00 %.

1.12. 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.
- Le kit est utilisé par un personnel de laboratoire formé et autorisé
- Les réactifs sont utilisés dans les limites des dates d'expiration indiquées.
- Les réactifs des différents lots de kits ne sont PAS utilisés ensemble. Cela peut avoir un impact sur la performance du kit.
- Seuls les réactifs répertoriés comme non inclus mais requis dans ce document sont utilisés.
- Il convient de faire attention d'éviter la contamination croisée des échantillons d'ADN ou les mélanges d'échantillons

2. Workflow de préparation de la banque AlloSeq HCT

Cette section décrit le workflow d'AlloSeq HCT, de l'échantillon d'ADN à la banque finale, y compris les considérations sur l'échantillon d'ADN, l'amplification PCR, le lavage et les étapes de détermination de la concentration.

2.1. Considérations sur l'échantillon

Il est recommandé d'utiliser des échantillons d'ADN de haute qualité pour la procédure de préparation de la banque. Dans ce contexte, la qualité de l'ADN est définie par les rapports de lecture de l'absorbance obtenus avec un spectrophotomètre à micro-volume comme NanoDrop. Vous trouverez ci-dessous les valeurs de référence de l'ADN de haute qualité et pur aux rapports suivants :

1. Absorbance à 260/230 nm : 2–2,2
2. Absorbance à 260/280 nm : 1.8

Même si le dosage tolère une qualité d'ADN plus faible, les mesures de séquençage, en particulier la couverture moyenne, seront affectées si un échantillon d'une banque est de qualité inférieure au reste des échantillons.

Il est essentiel de quantifier la concentration en ADN des échantillons avant de lancer le protocole. Nous recommandons l'utilisation de Qubit™ comme méthode de quantification fluorométrique ou des méthodes équivalentes qui utilisent des colorants de liaison d'ADNs, conformément aux instructions du fabricant. La concentration de chaque échantillon d'ADN à tester doit être normalisée à 0,625 ng/μl à l'aide d'eau pour PCR, afin de correspondre aux exigences de la source de 10 ng dans un volume de 16 μl.

2.2. Amplification de la PCR multiplexe en une étape

Cette section décrit les étapes à suivre pour configurer la PCR pour l'amplification de 202 régions cibles par échantillon. Le produit final est un ensemble de 202 produits d'amplification qui contiennent la région cible, des séquences d'index spécifiques à l'échantillon et des séquences d'adaptateur de cuve à flux continu pour chaque échantillon.

Avant de commencer

1. Vérifiez le contenu du kit, que la température de stockage est appropriée et vérifiez que vous disposez des consommables et de l'équipement requis.
2. Suivez le manuel d'instruction du fabricant pour programmer les instruments de cyclage thermique.
Instruments pris en charge pour ce workflow :
 - a) GeneAmp PCR System 9700 (Thermo Fisher),
 - b) Veriti Thermal Cycler (Thermo Fisher),
 - c) SimpliAmp Thermal Cycler (Thermo Fisher),

- d) Mastercycler® Nexus gradient (Eppendorf)
3. Suivez le protocole d'AlloSeq HCT dans l'ordre indiqué et à l'aide des paramètres spécifiés.
 4. Préparez la feuille de l'échantillon pour le séquençage (les instructions se trouvent dans le mode d'emploi du logiciel AlloSeq HCT).
 5. Programmez le thermocycleur en créant un protocole ayant des paramètres spécifiques :
 - a) Volume de réaction : 40 µl
 - b) Option de préchauffage du couvercle à 100 °C
 - c) Protocole de cyclage PCR indiqué dans le tableau 1
 - Des paramètres de montée en température spécifiques sont requis pour les étapes indiquées par un astérisque dans le tableau 1. Les équivalents de montée en température pour les thermocycleurs pris en charge sont indiqués dans le tableau 2.
 - Le protocole de cyclage PCR global est illustré à la figure 2.
 6. Réactifs nécessaires pour la configuration PCR :
 - a) AlloSeq HCT PCR Mix, boîte 1 à conserver entre -15 et -25 °C
 - b) AlloSeq HCT PCR Enzyme, boîte 1 à conserver entre -15 et -25 °C
 - c) AlloSeq HCT SNP Primer Pool, boîte 1 à conserver entre -15 et -25 °C
 - d) AlloSeq HCT Index Plate, boîte 2 à conserver entre -15 et -25 °C

REMARQUE : Décongelez la plaque de 96 indices congelés, mélangez rapidement au vortex, puis centrifugez rapidement les mélanges d'index avant le prélèvement à la pipette pour la réaction PCR.

REMARQUE : Utilisez les 48 autres indices entre les analyses MiSeq.
 7. Vérifiez que les échantillons d'ADN à utiliser dans la préparation de la banque sont normalisés à une concentration finale de 0,625 ng/µl et à un volume minimal de 18 µl pour pouvoir pipetter 16 µl dans la plaque PCR finale.

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		
72 °C*	30 s		
96 °C	15 s	Progression par défaut	12
72 °C	60 s		
72 °C	2 min	Progression par défaut	1
10 °C	∞	Progression par défaut	1

TABLEAU 1. PROTOCOLE DE CYCLAGE PCR

Thermocycleurs pris en charge	Équivalent de montée en température
GeneAmp PCR System 9700	25 %
Veriti Thermal Cycler	18 %
ABI SimpliAmp	0,7 °C/s
Eppendorf Nexus (bloc d'aluminium)	0,4 °C/s

TABLEAU 2. PROGRESSIONS DU THERMOCYCLEUR

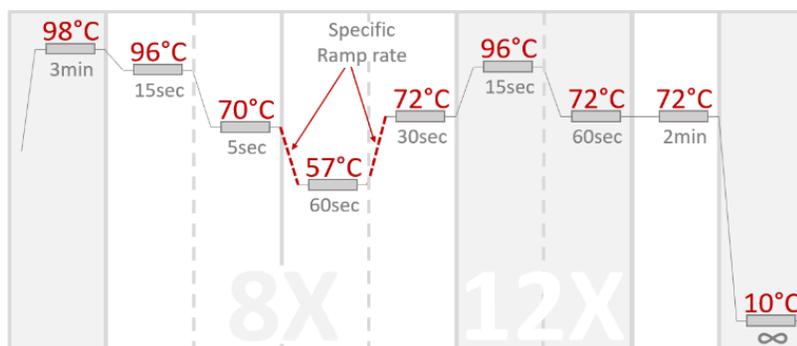


FIGURE 2. REPRESENTATION GRAPHIQUE DU PROTOCOLE DE CYCLAGE PCR

Procédure

- Allumez le thermocycleur pour s'assurer qu'il est à la bonne température après la configuration de la plaque PCR.
REMARQUE : Un délai de ≥ 1 heure avant de commencer le protocole de thermocyclage de la plaque PCR réduit les scores Q30.
- Décongelez le mélange pour PCR, l'amorce SNP et la plaque d'index à température ambiante, passez au vortex et centrifugez brièvement avant l'utilisation, puis conservez sur de la glace. Confirmez que l'orientation de la plaque est correcte, l'emplacement A1 étant positionné en haut à gauche. Percez le film en aluminium pour obtenir la combinaison d'index souhaitée à l'aide d'un embout de pipette.
- Remarque : Utilisez un embout de pipette différent pour chaque puits à percer.
- Remarque : Lors du perçage des puits, faites attention à ne pas perturber la solution d'index.
- Placez une nouvelle plaque PCR sur de la glace (si vous utilisez la TruSeq Index Plate Fixture, conservez-la sur de la glace). Ajoutez 8 μ l de mélanges d'index double i7 et i5 prémélangés à partir de la plaque de 96 indices à la plaque pour PCR fraîche sur glace à l'aide d'une seule pipette P10-P20 ou d'une pipette P10-P20 multicanal.
Remarque : Les puits sont préremplis et bénéficient d'un excédent suffisant pour permettre un pipettage à l'aveugle. Prenez soin de toucher le fond du puits et d'aspirer la totalité du volume. Confirmez visuellement.
Remarque : Pour réduire les risques de contamination du séquençage d'une analyse à l'autre, il est recommandé d'alterner les combinaisons d'amorces i5 et i7 et les puits attribués entre les analyses. D'autre part, il est recommandé d'effectuer un lavage de séquençage post-analyse sur le MiSeq avec de l'eau de Javel après chaque analyse (consultez les instructions du fabricant).
- Ajoutez 16 μ l de l'ADN préparé dans chaque puits d'échantillon de la plaque PCR.
- Retirez l'enzyme pour PCR du stockage à -20 °C, retournez le flacon et agitez-la en la conservant sur la glace. Préparez un Master Mix dans un tube Eppendorf de 1,5 ml pour le nombre d'échantillons « N » approprié, à l'aide du tableau suivant :

Réactif	Volume, 1 puits (μ l)	Volume pour « N » échantillons plus 12 % d'excédent recommandé (μ l)
AlloSeq HCT PCR Mix	13.0	$(13,0)*1,12*N$
AlloSeq HCT PCR Enzyme	0.8	$(0,8)*1,12*N$
AlloSeq HCT SNP Primer Pool	2.2	$(2,2)*1,12*N$
Volume total	16.0	$(16)*1,12*N$

TABLEAU 3. MELANGE DE REFERENCE POUR AMPLIFICATION MULTIPLEXEE EN UNE ETAPE

- Agitez le mélange de référence au vortex pendant 5 secondes, puis passez brièvement à la centrifugeuse.

9. Ajoutez 16 µl du mélange de référence à chaque puits d'échantillon contenant les amorces d'index et les échantillons d'ADN. Changez les embouts après avoir pipeté dans chaque puits.
10. Appliquez le film d'opercule pour plaque PCR Microseal « B » et passez immédiatement la plaque au vortex pendant 5 secondes pour mélanger.
11. Centrifugez immédiatement la plaque à 1 000 x g pendant 30 secondes.
12. Placez immédiatement la plaque dans le thermocycleur, dans une zone post-amplification et exécutez le protocole de cyclage PCR. Le protocole de cyclage PCR prend environ 1 heure.
REMARQUE : Il s'agit d'un point d'arrêt sans risque. Il est possible de laisser la plaque sur le thermocycleur jusqu'à 48 heures à l'étape d'attente à 10 °C, si nécessaire. Ensuite, passez à la procédure de lavage ci-dessous.

2.3. Lavage de la banque et détermination de la concentration

Avant de commencer

1. Vérifiez le contenu du kit, que la température de stockage est appropriée et vérifiez que les consommables et l'équipement nécessaires sont disponibles.
2. Lisez et suivez le manuel d'instruction du fabricant au sujet des instruments et méthodes recommandés ci-dessous dans ce workflow :
 - a) Aimant DynaMag-2
 - b) Kit de dosage Qubit dsDNA HS
 - c) Fluorimètre Qubit
3. Réactifs nécessaires pour cette étape :
 - a) Plaque PCR de l'étape précédente
 - b) Billes de purification AlloSeq HCT, boîte 3, à conserver entre 2 et 8 °C
 - c) Tampon de resuspension AlloSeq HCT, boîte 3, à conserver entre 2 et 8 °C
 - d) Alcool éthylique pour biologie moléculaire – non fourni
 - e) Eau de qualité PCR – non fournie
4. Sortez les Billes de purification du stockage à 2–8 °C et laissez-les revenir à température ambiante pendant au moins 30 minutes.
5. Sortez le Tampon de resuspension et la plaque pour PCR du stockage et conservez-les à température ambiante. Centrifugez la plaque pour PCR à 1 000 x g pendant 30 secondes.
6. Préparez une solution fraîche de 3 ml d'alcool éthylique (EtOH) à 80 %, ce qui est suffisant pour laver un pool de banque avec 50 % d'excédent.

Procédure

1. Déterminez le volume égal de chaque échantillon à regrouper dans un seul tube Eppendorf de 1,5 ml pour préparer une banque avec un volume final de 120 µl. Référez-vous au tableau 4.

Nombre total d'échantillons dans la banque	Volume à regrouper à partir de chaque échantillon (µl)
16	7.5
24	5
32	3.75
40	3
48	2.5

TABEAU 4. VOLUME A REGROUPER A PARTIR DE CHAQUE ECHANTILLON, POUR PREPARER LA BANQUE ALLOSEQ HCT POUR LE LAVAGE.

2. Passez les Billes de purification AlloSeq HCT au vortex jusqu'à obtenir une suspension complète. Vérifiez visuellement qu'il ne reste aucun granulé et mélangez à la pipette, si nécessaire. Centrifugez brièvement pour placer les billes de suspension au fond du tube. Ajoutez 100 µl des billes au tube de banque de 120 µl.
3. Placez le tube au vortex pendant 5 secondes à pleine vitesse et incubez pendant 5 minutes à température ambiante.
4. Centrifugez très brièvement, puis placez le tube sur l'aimant DynaMag-2 et laissez les billes se regrouper en granulés pendant 5 minutes.
5. Laissez le tube sur l'aimant et retirez la totalité du surnageant avec une pipette P200. Utilisez une pipette P20 pour retirer tout surnageant restant, si nécessaire.
6. Ajoutez 65 µl de Tampon de resuspension AlloSeq HCT.
7. Placez le tube au vortex pendant 5 secondes à pleine vitesse et incubez le tube pendant 5 minutes à température ambiante.
8. Centrifugez très brièvement, puis placez le tube sur l'aimant et laissez les billes se regrouper en granulés pendant 5 minutes.
9. Laissez le tube sur l'aimant, et sans toucher ou perturber les billes, transférez 60 µl de surnageant vers un tube Eppendorf de 1,5 ml.
10. Vérifiez que les Billes de purification AlloSeq HCT sont complètement de nouveau en suspension (voir l'étape 2). Ajoutez 50 µl des billes au surnageant de la banque de 60 µl.
11. Placez le tube au vortex pendant 5 secondes à pleine vitesse et incubez pendant 5 minutes à température ambiante.
12. Centrifugez très brièvement, puis placez le tube sur l'aimant et laissez les billes se regrouper en granulés pendant 5 minutes.
13. Laissez le tube sur l'aimant et retirez la totalité du surnageant avec une pipette P200.
14. Laissez le tube sur l'aimant et ajoutez 1 ml d'EtOH à 80 % sans perturber les billes, puis patientez 30 secondes.
15. Laissez le tube sur l'aimant et, sans toucher ou perturber les billes, utilisez la pipette P1000 et retirez et jetez le surnageant.
16. Répétez les étapes 14 et 15 pour un second lavage à l'EtOH. Après le deuxième lavage, utilisez une pipette P20 pour éliminer tout EtOH restant.
17. Laissez le tube ouvert et séchez les granulés de billes à l'air pendant 5 à 10 minutes, ou jusqu'à l'élimination d'EtOH.
18. Ajoutez 35 µl de Tampon de resuspension AlloSeq HCT.
19. Placez le tube au vortex pendant 5 secondes à pleine vitesse et incubez pendant 5 minutes à température ambiante.

20. Centrifugez très brièvement, puis placez le tube sur l'aimant et laissez les billes se regrouper en granulés pendant 5 minutes.
21. Laissez le tube sur l'aimant, et sans toucher ou perturber les billes, transférez 32 µl de surnageant vers un tube Eppendorf de 1,5 ml.
REMARQUE : Il s'agit d'un point d'arrêt sans risque. Conservez la banque lavée entre -15 et -25 °C pendant 7 jours au maximum.
22. Déterminez la concentration du pool de banque final à l'aide d'une méthode fluorométrique ; le kit de dosage Qubit™ dsDNA HS (Thermo Fisher PNQ32851) est recommandé.
REMARQUE : La méthode recommandée pour la quantification bénéficie d'une plage comprise entre 10 pg/µl et 100 ng/µl. Cela couvre les concentrations de banques AlloSeq HCT qui peuvent être aussi faibles que 0,1 ng/µl. Si une autre méthode est utilisée, il faut vérifier qu'elle permet d'obtenir une quantification précise à la plage appropriée.
23. **Facultatif**, Évaluation du contrôle de qualité de la banque sur Tape-Station :

Taille du produit (PS)	Taille du produit non spécifique(NSPS)
250–300 bps	< 200 bps

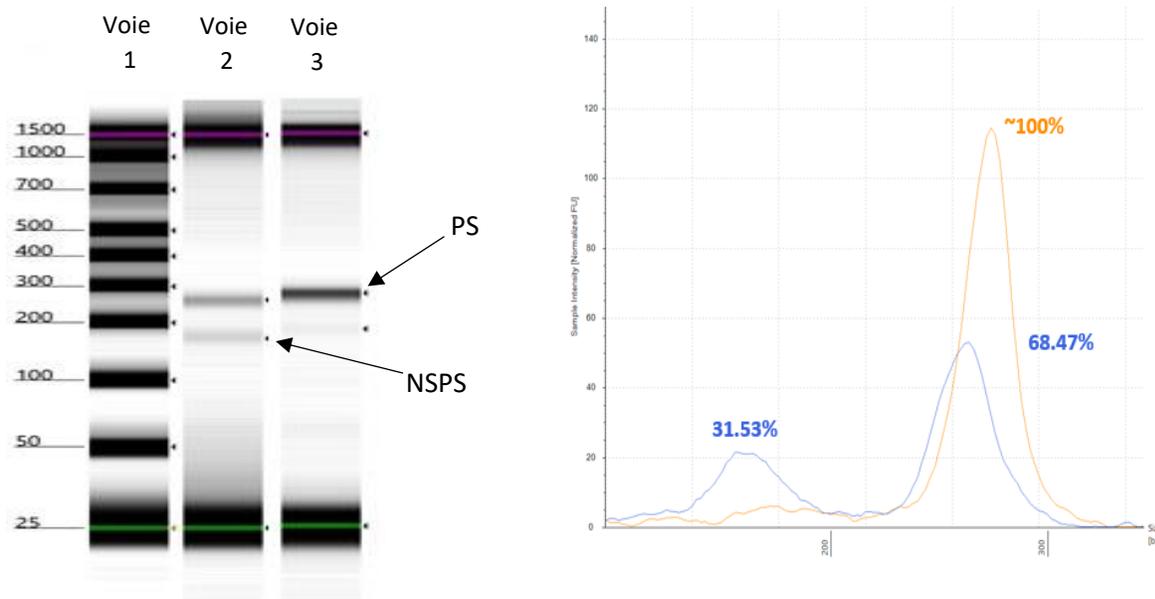


FIGURE 3. PROFILS DE TAPE-STATION. GEL : PISTE 1 : ECHELLE DE TAILLES, PISTE 2 ET COURBE BLEUE : AVANT LE DEUXIEME LAVAGE, PISTE 3 ET COURBE JAUNE : APRES LE DEUXIEME LAVAGE. LA PRESENCE DE PRODUITS NON SPECIFIQUES N'A PAS FORCEMENT D'INFLUENCE SUR LA SESSION DE SEQUENÇAGE, CAR LES PRODUITS SONT PLUS NOMBREUX QUE LES PRODUITS NON SPECIFIQUES.

3. Workflow de séquençage

Cette section décrit les étapes requises pour préparer la banque finale au chargement dans l'instrument MiSeq. Consultez le manuel d'instruction d'Illumina MiSeq pour obtenir des informations exhaustives sur le workflow et le fonctionnement de l'instrument pour commencer une session de séquençage.

3.1. Dénaturation et dilution de la banque pour le séquençage

Dans cette étape du workflow, l'utilisateur doit décider s'il faut inclure le contrôle de séquençage Illumina PhiX v3 à la concentration finale de 1 % dans la banque HCT. Suivez la procédure appropriée répertoriée ci-dessous (avec ou sans contrôle PhiX) pour préparer la banque au chargement dans la cartouche de réactif Illumina.

Avant de commencer

1. Suivez le manuel d'instruction du fabricant concernant l'instrument Illumina MiSeq.
2. Réactifs nécessaires pour cette étape :
 - a) Banque de séquençage final de l'étape précédente
 - b) AlloSeq HCT 2N NaOH, boîte 1, à conserver entre -15 et -25 °C
 - c) Eau de qualité PCR – non fournie
 - d) Kit pour 150 cycles Illumina MiSeq v3 – non fourni
 - e) [Facultatif] contrôle de séquençage Illumina PhiX v3 – non fourni
3. Décongelez le 2N NaOH à température ambiante, puis placez-le sur de la glace.
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.
4. Décongelez et préparez les réactifs du séquençage Illumina, conformément aux spécifications du fabricant.
5. Générez une feuille d'échantillon à l'aide du logiciel AlloSeq HCT conformément à son mode d'emploi.

Procédure (sans contrôle PhiX)

1. Préparez une dilution de la banque finale à 1,33 nM dans le AlloSeq HCT Resuspension Buffer. Si nécessaire, utilisez l'équation suivante pour convertir la concentration de ng/μl en nM :

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

2. Si une concentration de pool de banque est <0,16 ng/μl, n'ajoutez pas de tampon de resuspension supplémentaire.
3. Préparez du NaOH 0,2N fraîchement dilué à utiliser pour la dénaturation de la banque à 1,33 nM. Combinez 4 μl de NaOH 2N à 36 μl d'eau de qualité PCR et mélangez soigneusement. La solution de NaOH 0,2N doit être mise au rebut dans les 12 heures suivant sa préparation.
4. Dans un nouveau tube Eppendorf de 1,5 ml, ajoutez 9 μl de la banque de 1,33 nM et 3 μl de NaOH 0,2N. Si une concentration de pool de banque était < 0,16 ng/μl, ajustez le volume de façon appropriée pour conserver un rapport banque/NaOH de 3:1, pour obtenir une dénaturation adaptée.
5. Agitez au vortex, centrifugez brièvement et incubez à température ambiante pendant 5 minutes.
6. Ajoutez 588 μl de HT1 réfrigéré pour amener la concentration de la banque à 20 pM.
7. Passez brièvement au vortex et centrifugez. Conservez sur de la glace.
8. Chargez 600 μl de la banque dénaturée à 20 pM dans la cartouche de séquençage Illumina MiSeq précédemment décongelée et préparée conformément aux recommandations du fabricant.
9. Procédez conformément aux instructions du manuel de l'utilisateur de l'Illumina MiSeq pour charger la cuve de mesure, la cartouche de réactif et l'Incorporation Buffer dans l'instrument pour commencer la session de séquençage. Utilisez une feuille d'échantillon préparée à l'aide du logiciel AlloSeq HCT conformément aux instructions du mode d'emploi du logiciel AlloSeq HCT.

Procédure (avec contrôle PhiX)

1. Préparez une dilution de la banque finale à 1,33 nM dans le AlloSeq HCT Resuspension Buffer. Si nécessaire, utilisez l'équation suivante pour convertir la concentration de ng/μl en nM :

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

2. Si une concentration de pool de banque est <0,16 ng/μl, n'ajoutez pas de tampon de resuspension supplémentaire.

3. Préparez du NaOH 0,2N fraîchement dilué à utiliser pour la dénaturation de la banque à 1,33 nM. Combinez 4 µl de NaOH 2N à 36 µl d'eau de qualité PCR et mélangez soigneusement. La solution de NaOH 0,2N doit être mise au rebut dans les 12 heures suivant sa préparation.
4. Dans un nouveau tube Eppendorf de 1,5 ml, ajoutez 9 µl de la banque de 1,33 nM et 3 µl de NaOH 0,2N. Si une concentration de pool de banque était de < 0,16 ng/µl, ajustez le volume de façon appropriée pour conserver un rapport banque/NaOH de 3:1, pour obtenir une dénaturation adaptée.
5. Dans un nouveau tube Eppendorf de 1,5 ml, mélangez 2 µl de PhiX à 10 nM et 2 µl de NaOH 0,2N.
6. Agitez les deux tubes au vortex, centrifugez brièvement et incubez à température ambiante pendant 5 minutes.
7. Ajoutez 582 µl de HT1 réfrigéré au tube de banque pour amener la concentration à 20 pM.
8. Ajoutez 996 µl de HT1 réfrigéré au tube PhiX pour amener la concentration à 20 pM.
9. Passez brièvement au vortex et centrifugez la banque et les tubes de PhiX. Conservez sur de la glace.
10. Ajoutez 6 µl de solution PhiX 20 pM au tube de banque de 20 pM. Passez brièvement au vortex et centrifugez. Conservez sur de la glace.
REMARQUE : La concentration finale du PhiX dans la banque est d'environ 1 %.
11. Chargez 600 µl de la banque à 20 pM dans la cartouche de séquençage Illumina MiSeq précédemment décongelée et préparée conformément aux recommandations du fabricant.
12. Procédez conformément aux instructions du manuel de l'utilisateur de l'Illumina MiSeq pour charger la cuve de mesure, la cartouche de réactif et l'Incorporation Buffer dans l'instrument pour commencer la session de séquençage. Utilisez une feuille d'échantillon préparée à l'aide du logiciel AlloSeq HCT conformément au mode d'emploi du logiciel AlloSeq HCT.

Instrument	Densité moyenne du cluster (K/mm ²)	Filtre de passage	Lectures mappées
MiSeq	800–1800	> 85 %	> 75 %

Remarque sur la mesure du séquençage : Valeurs typiques observées lors de l'analyse post-session

4. Informations supplémentaires

Le protocole décrit dans ce guide présuppose que vous avez consulté cette section, confirmé le contenu du kit, que les conditions de stockage sont correctes, et que vous avez obtenu tous les consommables et équipements nécessaires.

4.1. Contenu du kit AlloSeq HCT et conditions de stockage

En respectant les conditions de température de stockage ci-dessous, les composants du kit peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage externe des kits (durée de conservation de 24 mois). Après utilisation, les kits et les composants doivent être immédiatement replacés dans leurs conditions de stockage. Ces kits ont fait l'objet de tests de stabilité en conditions d'utilisation qui ont démontré que les réactifs congelés peuvent supporter jusqu'à 12 cycles de congélation/décongélation.

Ces kits NE DOIVENT PAS être utilisés au-delà de leur date de péremption.

Réactif	Quantité	Type de tube
AlloSeq HCT PCR Mix	1	2 ml
AlloSeq HCT PCR Enzyme	1	0,5 ml
AlloSeq HCT SNP Primer Pool	1	0,5 ml
AlloSeq HCT 2N NaOH	1	0,5 ml

TABEAU 5. ALLOSEQ HCT REAGENT BOX 1, A CONSERVER ENTRE -15 ET -25 °C

Réactif	Quantité	Volume du puits	Film de la plaque
Plaque d'index AlloSeq HCT	1	200 µl	Film pouvant être percé

TABEAU 6. ALLOSEQ HCT REAGENT BOX 2, A CONSERVER ENTRE -15 ET -25 °C

Réactif	Quantité	Type de tube
AlloSeq HCT Purification Beads	2	2 ml
AlloSeq HCT Resuspension Buffer	2	2 ml

TABEAU 7. ALLOSEQ HCT REAGENT BOX 3, A CONSERVER ENTRE 2 ET 8 °C

4.2. Sécurité associée à AlloSeq HCT

Suivez les bonnes pratiques de laboratoire (sécurité et prévention de la contamination) lors de la réalisation de 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, dont les cahiers de travail fournis, afin d'éviter des situations d'utilisation dangereuses.

Veuillez consulter la fiche de données de sécurité et respecter toutes les précautions de manipulation et de mise au rebut. Pour obtenir des informations supplémentaires sur tous les matériaux dangereux contenus dans le kit AlloSeq HCT, veuillez consulter la fiche de données de sécurité de TEC513_AlloSeq HCT sur <http://www.caredx.com>.

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. H318 – Provoque des lésions oculaires graves.</p> <p>Mises en garde – Réglementation UE, É.-U. et AU 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.</p>

COMPOSANT DU KIT	SYMBOLE/PICTOGRAMME	AVERTISSEMENT DE SÉCURITÉ
		<p>P301 + P330 + P331 – EN CAS D'INGESTION : rincer la bouche. NE PAS faire vomir.</p> <p>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.</p> <p>P363 – Laver les vêtements contaminés avant réutilisation.</p> <p>P310 – Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON/un médecin.</p> <p>P304 + P340 – EN CAS D'INHALATION : transporter la personne à l'extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer.</p> <p>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. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON/un médecin.</p> <p>P405 – Garder sous clef.</p> <p>P501 – Éliminer le contenu/récipient dans le respect des réglementations locales, régionales, nationales et internationales en vigueur.</p>
<p>AlloSeq HCT 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 – Réglementation UE, É.-U. et AU 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.</p> <p>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. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON/un médecin.</p>

4.3. Consommables et équipements requis supplémentaires

Les consommables et l'équipement répertoriés ci-dessous sont requis pour le workflow de préparation de la banque, mais ne font pas partie du kit AlloSeq HCT.

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	Fabricant/fournisseur	Numéro de référence	Quantité
Tubes de microcentrifugeuse 1,5 ml	Fournisseur de laboratoire général	NA	50
Bouchons filetés externes FluidX	Brooks Life Sciences	68-53100-Z6N (orange) 68-53100-Z1N (blanc)	960 bouchons ea

Consommables	Fabricant/fournisseur	Numéro de référence	Quantité
Embouts de pipettes avec barrière 20 µl, 200 µl, 1 000 µl	Rainin ou équivalent	Multiple	2 boîtes de 96
Tubes coniques pour centrifugeuse (15 ml)	Fournisseur de laboratoire général	NA	1
Alcool éthylique, 200 proof, pour biologie moléculaire	Sigma-Aldrich	E7023-500 ml	1
Plaque pour PCR à 96 puits	Fournisseur de laboratoire général	NA	1 plaque
Films adhésifs Microseal « B »	Bio-Rad	MSB1001	1 pack de 96
Eau de qualité PCR, 10 ml	Fournisseur de laboratoire général	NA	1
Qubit™ dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher	Q32851	1
MiSeq Reagent kit v3 (150 cycles)	Illumina	MS-102-3001	1
[Facultatif] Contrôle de séquençage PhiX v3	Illumina	FC-110-3001	1

TABLEAU 8. CONSOMMABLES REQUIS NON FOURNIS DANS LE KIT ALLOSEQ HCT.

Équipement/Instrument	Fabricant
Pipettes de 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Rainin ou équivalent
Pipettes multicanaux de 20 µl, 200 µl	Rainin ou équivalent
Système MiSeq	Illumina
TruSeq Index Plate Fixture Kit (2 fixations)	Illumina, FC-130-1005
Aimant DynaMag-2	Thermo Fisher, réf. 12321D
Minicentrifugeuse	Fournisseur de laboratoire général
Microplaque pour centrifugeuse	Fournisseur de laboratoire général
Vortex	Fournisseur de laboratoire général
L'un des cycleurs thermiques à 96 puits suivants : <ul style="list-style-type: none"> - GeneAmp PCR System 9700 - Veriti Thermal Cycler - SimpliAmp Thermal Cycler - Mastercycler® Nexus gradient (bloc d'aluminium) 	Applied Biosystems (production arrêtée) Thermo Fisher, réf. 4375786 Thermo Fisher, réf. A24811 Eppendorf, réf. 6331000025
Fluorimètre Qubit	Thermo Fisher

TABLEAU 9. ÉQUIPEMENT ET INSTRUMENTS RECOMMANDÉS POUR LA PRÉPARATION DE LA BANQUE DE SÉQUENÇAGE ALLOSEQ HCT.

4.4. Références pertinentes

La liste ci-dessous répertorie les manuels d'instruction référencés dans le workflow de préparation de la banque AlloSeq HCT. Lisez-les attentivement avant de commencer la procédure afin d'utiliser correctement l'équipement/l'instrument. Vérifiez en ligne s'il existe une version mise à jour des documents indiqués.

GeneAmp PCR System 9700, manuel de l'utilisateur du module de base, Thermo Fisher

Guide de l'utilisateur du thermocycleur Applied Biosystems Veriti, Thermo Fisher

Guide de l'utilisateur du thermocycleur Applied Biosystems SimpliAmp, Thermo Fisher

Mode d'emploi du Mastercycler Nexus, Eppendorf

Guide du système MiSeq, Illumina

Dénaturer et diluer les banques pour le système MiSeq, Illumina

5. Coordonnées

Fabricant légal :

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 :

Asia Pacific (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, Sweden.
Tél. : +46-8-508 939 00
Télécopie : +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, États-Unis
Tél. : +1-877-653-7871
Télécopie : +1-610-344-7989
E-mail : orders-us@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 Assistance technique et signalement d'incidents graves :

E-mail : techsupport-global@caredx.com

Tout incident grave survenu en association 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 réside.

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

Produits associés :

Logiciel AlloSeq HCT

6. Références

1. Blouin AG and Askar M. Chimerism analysis for clinicians: a review of the worldwide practices. Bone Marrow Transplant 57: 347-359. 2022.
2. Blouin AG, Ye F, Williams J, Askar M. A practical guide to chimerism analysis: Review of the literature and testing practices worldwide. Hum Immunol 82(11): 838-849. 2021.
3. Kitcharoen K, Witt CS, Romphruk AV, Christiansen FT, Leelayuwat C. MICA, MICB, and MHC Beta Block Matching in Bone Marrow Transplantation Outcome. Hum Immunol 67: 238-246. 2006.
4. Vynck M, Nollet F, Sibbens L, Lievens B, Denys A, Cauwelier B, Devos H. Performance Assessment of the Devyser High-Throughput Sequencing-Based Assay for Chimerism Monitoring in Patients after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. J Mol Diagn 23: 1116-1126. 2021.
5. Saliba RM, Veltri L, Rondon G, Chen J, Al-Atrash G, Alousi A, Martinez C, Augustine L, Hosing CM, Oran B, Rezvani K, Shpall EJ, Kebriaei P, Khouri IF, Popat U, Champlin RE, Ciurea SO. Impact of graft composition on outcomes of haploidentical bone marrow stem cell transplantation. Haematologica 106(1): 269-274.

Historique de la méthode

Version	Date	Modification (IFU100-FR v1.0 est traduit du document principal en anglais IFU100_AlloSeq HCT CE IVD v6.1)
IFU100 v1.0	01Apr22	Première version du logiciel AlloSeq HCT 96 – CE IVD.
IFU100 v2.0	02May22	Mise à jour des informations de rep. EC, Mise à jour de la section 1.7 avec les techniques pour chimérisme utilisées. Ajout de la section 6 : Références : Réédité le 04 mai 22 (DCR 2022-253)
IFU100 v3.0	11May22	Mise à jour de la section 1.1 pour refléter les résultats des études de vérification CE. Consultez le document CR 2021-035. Republié 12 mai 2022
IFU100 v4.0	16Aug22	Mise à jour de la section 1.5 ; 230/260 correction de 260/230 pour corriger la valeur de 2. Suppression de la biotine. Section 3.1 définition du protocole ; avec ou sans contrôle PhiX. Section 2.2 clarification des blocs d'aluminium Eppendorf Nexus (ZD-2233). Section 10 : Ajout des exigences de signalement dans le cadre de la vigilance. Republié le 21 sept. 2022.
IFU100 v5.0	16Nov22	Ajout d'instructions à la section 2.3 (Procédure), étapes 4, 8, 12 et 20 pour agiter brièvement le contenu du tube avant de le placer sur l'aimant. Cela permet de clarifier que l'utilisateur ne doit pas agiter le tube après l'avoir passé au vortex, ce qui est une procédure standard. Il doit être incubé pendant 5 minutes, et doit être agité immédiatement avant la mise en place sur l'aimant. Cela fait correspondre le mode d'emploi au cahier de travail IFU100_AlloSeq HCT Workbook – CE IVD.
IFU100 v6.0	03Nov23	Ajout d'un mandataire suisse.
IFU100 v6.1	01Mar24	Correction de l'unité de mesure de concentration mentionnée à l'article 3.
IFU100-FR v1.0	19Mar24	La première traduction en français.