

Indlægsseddel til VeriSeq NIPT Solution v2

KUN TIL IN VITRO-DIAGNOSTIK

Tilsigtet brug

VeriSeq NIPT Solution v2 er en *in vitro*-diagnostisk test, der anvendes som en screeningstest med henblik på detektering af genomdækkende føtale genetiske anomalier i perifere helblodsprøver fra moderen under dennes graviditet efter 10. gestationsuge. VeriSeq NIPT Solution v2 anvendes til at detektere partielle duplikationer og deletioner for alle autosomer og aneuploidistatus for alle kromosomer ved hjælp af helgenomsekventering. Testen giver også mulighed for rapportering af kønskromosomal aneuploidi (SCA). Dette produkt må ikke anvendes som eneste grundlag for diagnosticering eller beslutningstagen om det videre graviditetsforløb.

VeriSeq NIPT Solution v2 omfatter: VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 til VeriSeq NIPT Microlab STAR, VeriSeq NIPT Sample Prep Kits og VeriSeq Onsite Server v2 med VeriSeq NIPT Assay Software v2. VeriSeq NIPT Solution v2 skal anvendes sammen med et next-generation-sekventeringsinstrument.

Resumé og forklaring af analysen

Føtale kromosomabnormiteter, specielt aneuploidi, som er et abnormt antal af kromosomer, er en almindelig årsag til reproduktionssvigt, medfødte abnormiteter, forsinket udvikling og mentale handicap. Aneuploidi rammer cirka 1 ud af 300 levendefødsler og er forbundet med mange flere spontane aborter og dødsfødsler.^{1,2} Indtil for nylig har der været to typer af prænatale test for disse forstyrrelser: diagnostisk testning eller screening. Diagnostisk testning involverer invasive indgreb, såsom udtagning af fostervandsprøve eller moderkageprøve. Disse testmetoder vurderes at være den gyldne standard til detektion af føtal aneuploidi. De er imidlertid forbundet med en risiko for spontan abort mellem 0,11 % og 0,22 %.³ Konventionelle screeninger for diverse markører indebærer ingen risiko for spontan abort, da de er ikke-invasive, men de er mindre præcise end diagnostiske test. Detektionsraterne for trisomi 21 med disse screeninger varierer mellem 69-96 % og afhænger især af den pågældende screening, moderens alder og gestationsalderen på tidspunktet for screeningen.⁴ Vigtigst af alt er de forbundet med falsk-positiv-rater på cirka 5 %, hvilket kan føre til brug af en invasiv diagnostisk test med henblik på bekræftelse og dermed en risiko for procedurerelateret spontan abort.⁴ Ultralydsscanninger kan også detektere kromosomafvigelseser, men de er forbundet med endnu større usikkerhed end disse andre metoder.

Føtal aneuploidi på kromosom 21, 18, 13, X og Y kan detekteres med en høj præcisionsgrad med en ikke-invasiv prænatal test (NIPT - noninvasive prenatal testing) ved hjælp af helgenomsekventering af cellefrit DNA (cfDNA) indhentet fra maternelt plasma efter 10. gestationsuge. I en nylig metaanalyse af flere kliniske studier blev der rapporteret om følgende vægtede samlede detektionsrater og specificiteter for trisomi 21 og trisomi 18 ved enkeltbarnsgraviditeter: trisomi 21 hhv. 99,7 % og 99,96 % og trisomi 18 hhv. 97,9 % og 99,96 %.⁵ Et studie tyder på, at brug af NIPT som primær screening i forbindelse med alle graviditeter kunne resultere i en reduktion på 89 % i antallet af invasive procedurer med henblik på bekræftelse.⁶

Med udgangspunkt i den betydelige reduktion af falsk-positiv-rater ved brug af NIPT i forhold til konventionel screening for diverse markører, er der adskillige lægefaglige organisationer, der har tilkendegivet, at de støtter flere indikationer for brug af NIPT.

Helt specifik støtter følgende organisationer op om at tilbyde NIPT til alle gravide kvinder: International Society for Prenatal Diagnosis, American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) /Society for Maternal Fetal Medicine (SMFM), American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) og European Society of Human Genetics/American Society of Human Genetics.^{7,8,9} Rådgivning inden testen, informeret samtykke og diagnostisk test med henblik på bekræftelse af et positivt cfDNA-screeningsresultat er anbefalet.⁴

VeriSeq NIPT Solution v2 er en ikke-invasiv in vitro-diagnostisk (IVD) test, der anvender helgenomsekventering af cfDNA-fragmenter, der er udledt af maternelle perifere helblodprøver fra gravide kvinder efter 10. gestationsuge. Testen kan anvendes til to typer af screening: basisscreening og genomdækkende screening. Basisscreeningen giver kun oplysninger om aneuploidistatus for kromosom 21, 18, 13, X og Y. Den genomdækkende screening giver oplysninger om partielle duplikationer og deletioner for alle autosomer og aneuploidistatus for alle kromosomer. Begge screeningstyper giver mulighed for rapportering af kønskromosomal aneuploidi (SCA) med eller uden rapportering af fosterets køn. Funktionen til rapportering af SCA kan deaktiveres. Hvis funktionen til rapportering af SCA er deaktiveret, bliver fosterets køn heller ikke rapporteret. Se yderligere oplysninger om indstillingerne for kønsrapportering i *VeriSeq NIPT Solution v2 Software Guide* (Softwarevejledning til VeriSeq NIPT Solution v2) (dokumentnr. 100000067940).

Procedureprincipper

VeriSeq NIPT Solution v2 er en automatiseret løsning til NIPT-testning på laboratorier, der består af automatiseret prøveklargøring og sekventeringsdataanalyse. VeriSeq NIPT Sample Prep Kits indeholder specialreagenser til engangsbrug, der anvendes sammen med VeriSeq NIPT Microlab STAR til klargøring af batches med 24, 48 eller 96 prøver til next-generation-sekventering. Helgenomiske paired end-sekventeringsdata bliver analyseret ved hjælp af specialsoftwaren VeriSeq NIPT Assay Software v2, og der bliver genereret en rapport med kvalitative resultater.

Arbejdsgangen består af følgende procedurer: prøveindsamling, plasmaisolering, cfDNA-ekstraktion, biblioteksklargøring, bibliotekskvantificering, oprettelse af bibliotekspuljer, sekventering og analyse, som beskrevet nærmere nedenfor:

- ▶ **Prøveindsamling** – Der indsamles 7-10 ml maternelt perifert helblod i Streck cell-free DNA Blood Collection Tube (BCT), der forhindrer cellelysis og genomisk kontaminering og stabiliserer helblodet.
- ▶ **Plasmaisolering** – Inden for 5 dage efter indsamlingen isoleres plasmaet fra det maternelle perifere helblod ved hjælp af almene centrifugeringsteknikker. VeriSeq NIPT Microlab STAR opsuger og fordeler plasma i en dybbrøndsplade med 96 brønde med henblik på efterfølgende behandling. Hvis omtestning er nødvendig, kan prøverne lukkes til igen efter behandling og opbevares ved 4 °C i yderligere 5 dage (op til 10 dage i alt efter indhentning af blod).



FORSIGTIG

Overskridelse af ovenfor nævnte opbevaringstider kan påvirke fejlraterne for individuelle prøver negativt.

- ▶ **cfDNA-ekstraktion** – Oprensning af cfDNA fra plasma opnås via adsorption på en bindingsplade, afvaskning af bindingspladen for at fjerne kontaminerende stoffer og eluering.
- ▶ **Biblioteksklargøring** – De oprensede cfDNA-fragmenter gennemgår en end repair-proces for at konvertere 5'- og 3'-overhæng til stumpe ender. Demæst tilføjes der et deoxyadenosinnukleotid til 3'-endeme for at skabe et enkeltbase-overhæng. Indeksede adaptere indeholdende et enkeltbase-3' deoxythymidin-overhæng bliver så ligeret til de behandlede cfDNA-fragmenter. Det ligerede DNA bliver oprenset ved brug af fast fase-perler til revers immobilisering. Hver prøve i et sæt med 24, 48 eller 96 prøver får en unikt indeksert adapter. Adapterne tjener 2 formål:
 - ▶ Indeks muliggør prøveidentifikation i forbindelse med efterfølgende sekventering.
 - ▶ Indeksadaptere indeholder sekvenser, der muliggør fastholdelse af biblioteket på den faste overflade af en sekventeringsflowcelle med henblik på clustergenerering og efterfølgende sekventering.
- ▶ **Kvantificering** – Biblioteksproduktet bliver kvantificeret ved brug af et fluorescerende farvestof med koncentrationsbestemmelse ved sammenligning med en DNA-standardkurve.
- ▶ **Oprettelse af bibliotekspuljer og sekventering** – Prøvebibliotekerne bliver samlet i puljer med 24 eller 48 prøver i tilpassede mængder for at minimere variation i dækningen. Hver pulje bliver så sekventeret ved brug af et next-generation-sekventeringsinstrument.
- ▶ VeriSeq NIPT Solution v2 inkluderer ikke sekventeringsudstyr og brugsartikler.

- ▶ **Analyse** – Analysen af den enkelte prøve omfatter:
 - ▶ Identifikation af biblioteksfragmenter efter indekssekvens og sammenligning af paired end-læsningerne med et humant referencegenom.
 - ▶ Estimation af den føtale fraktion i biblioteket ved at kombinere oplysninger fra fordelingen af biblioteksfragmenternes længder og genomiske koordinater.
 - ▶ Efter hensyntagen til kendt bias detekterer en statistisk model genområder, der er under- eller overrepræsenteret i biblioteket på en måde, der er forenelig med en anomali ved det estimerede føtale fraktionsniveau.
 - ▶ NIPT-rapporten indeholder en resultatoversigt for den valgte testmenu, hvor der er anført ANOMALY DETECTED (ANOMALI DETEKTERET) eller NO ANOMALY DETECTED (INGEN ANOMALI DETEKTERET) og et føtalt fraktionsestimat ud for de prøver, der har opnået vellykket QC.
 - ▶ Den supplerende rapport indeholder kvantitative målinger, der karakteriserer hver af de detekterede anomalier.

Procedurens begrænsninger

- ▶ VeriSeq NIPT Solution v2 er en screeningstest og bør betragtes i sammenhold med andre kliniske fund og testresultater. Der bør ikke drages konklusioner om fosterets tilstand eller træffes beslutninger om det videre graviditetsforløb alene på baggrund af resultaterne af NIPT-screeningen.⁷
- ▶ VeriSeq NIPT Solution v2 rapporterer om følgende:
 - ▶ Basisscreeningen tester for overrepræsentation af kromosom 13, 18 og 21.
 - ▶ Den genomdækkende screening tester for over- og underrepræsentation af alle autosomer, herunder partielle deletioner og duplikationer på mindst 7 Mb.
 - ▶ Følgende kønskromosomale anomalier for enkeltbarnsgraviditeter, hvor der er valgt Yes (Ja) eller SCA under indstillingerne for kønsrapportering: XO, XXX, XXY og XYY.
 - ▶ Hvis der for enkeltbarnsgraviditeter er valgt Yes (Ja) under indstillingerne for kønsrapportering, bliver fosterets køn rapporteret.
 - ▶ Forekomst af et Y-kromosom for tvillingegraviditeter.
- ▶ Evidensen, der understøtter testens sensitivitet og specificitet, dækker enkeltbarns- og tvillingegraviditeter. Denne brugervejledning indeholder ikke sensitivitets- og specificitetsdata for graviditeter med trillinger eller flere fostre.
- ▶ VeriSeq NIPT Solution v2 er ikke beregnet til detektion af polyploidi, såsom triploidi.
- ▶ VeriSeq NIPT Solution v2 er ikke beregnet til detektion af balancerede kromosomale translokationer.
- ▶ Analysen kræver materielle perifere helblodprøver fra gravide kvinder efter 10. gestationsuge.
- ▶ Basisscreeningen med VeriSeq NIPT Solution v2 leder efter specifikke kromosomale abnormiteter. Resultatet NO ANOMALY DETECTED (INGEN ANOMALI DETEKTERET) udelukker ikke muligheden for kromosomale abnormiteter i de testede kromosomer. Et negativt resultat udelukker ikke muligheden for, at graviditeten er forbundet med andre kromosomale abnormiteter, genetiske sygdomme eller fosterskader (f.eks. neuralrørsdefekter).
- ▶ Med den genomdækkende screening kan store deletioner og duplikationer, som udgør mindre end 75 % af kromosomets størrelse, være tegn på aneuploidi af hele kromosomet.
- ▶ Visse områder bliver udelukket fra analysen i forbindelse med genomdækkende screeninger. Se en liste over disse sortlistede områder på webstedet Illumina Support. Der udføres kun genomisk anomali-detektering på de områder, der ikke er udelukket.
- ▶ Funktionen til rapportering af fosterets køn er ikke tilgængelig i alle lande på grund af nationale forordninger for kønsrapportering.
- ▶ Testresultaterne kan være påvirket af visse materielle og føtale faktorer, inklusive men ikke begrænset til:
 - ▶ Nylig materiel blodtransfusion
 - ▶ Materiel organtransplantation

- ▶ Maternelt kirurgisk indgreb
- ▶ Maternel immunbehandling eller stamcellebehandling
- ▶ Maternel malignitet
- ▶ Maternel mosaicisme
- ▶ Føtoplacental mosaicisme
- ▶ Fosterdød
- ▶ Ulevedygtig tvilling

Produktkomponenter

VeriSeq NIPT Solution v2 (delnr. 20030577) består af følgende prøveklargøringskit:

- ▶ VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (24 prøver) (delnr. 20025895)
- ▶ VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (48 prøver) (delnr. 15066801)
- ▶ VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (96 prøver) (delnr. 15066802)

VeriSeq NIPT Solution v2 (delnr. 20030577) består af følgende softwarekomponenter:

- ▶ VeriSeq NIPT Assay Software v2 (delnr. 20047024), forudinstalleret på VeriSeq Onsite Server v2
 - ▶ VeriSeq Onsite Server v2 (delnr. 20028403 eller 20047000) eller en eksisterende VeriSeq Onsite Server (delnr. 15076164 eller delnr. 20016240), der er opgraderet til v2
- ▶ VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 (delnr. 20044988), forudinstalleret på VeriSeq NIPT Microlab STAR
 - ▶ VeriSeq NIPT Microlab STAR (delnr. Hamilton Company Reno: 95475-01 (115V) & 95475-02 (230V), Hamilton Company Bonaduz: 806288)
- ▶ Local Run Manager VeriSeq NIPT-modul (delnr. 20044989)

Reagenser

Medfølgende reagenser

Illumina leverer følgende reagenser: VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (24 prøver) (delnr. 20025895), VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (48 prøver) (delnr. 15066801) og VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (96 prøver) (delnr. 15066802). VeriSeq NIPT Sample Prep Kits er konfigureret til brug sammen med ML STAR (delnr. 95475-01, 95475-02 eller 806288), der leveres af Hamilton Company.

VeriSeq NIPT Sample Prep, Extraction Box

Tabel 1 VeriSeq NIPT Extraction Box (24) og (48), delnr. 20025869 og 15066803

Reagensnavn på mærkat	Antal beholdere i kit	Aktive stoffer	Opbevaring
Lysis Buffer	1	Guanidinhydrochlorid i vandig bufferopløsning	15 °C til 30 °C
Wash Buffer I	1	Guanidinhydrochlorid og 2-propanol i vandig bufferopløsning	15 °C til 30 °C
Wash Buffer II	1	Vandig bufferopløsning indeholdende salte	15 °C til 30 °C
Elution Buffer	1	Vandig bufferopløsning	15 °C til 30 °C
Proteinase Buffer	1	Glycerol i vandig bufferopløsning	15 °C til 30 °C
Proteinase K	3	Lyofiliseret Proteinase K	15 °C til 30 °C

Tabel 2 VeriSeq NIPT Extraction Box (96), delnr. 15066807

Reagensnavn på mærkat	Antal beholdere i kit	Aktive stoffer	Opbevaring
Lysis Buffer	1	Guanidinhydrochlorid i vandig bufferopløsning	15 °C til 30 °C
Wash Buffer I	1	Guanidinhydrochlorid og 2-propanol i vandig bufferopløsning	15 °C til 30 °C
Wash Buffer II	2	Vandig bufferopløsning indeholdende salte	15 °C til 30 °C
Elution Buffer	1	Vandig bufferopløsning	15 °C til 30 °C
Proteinase Buffer	1	Glycerol i vandig bufferopløsning	15 °C til 30 °C
Proteinase K	4	Lyofiliseret Proteinase K	15 °C til 30 °C

VeriSeq NIPT Sample Prep, Library Prep Box

Tabel 3 VeriSeq NIPT Library Prep Box (24) og (48), delnr. 20026030 og 15066809

Reagensnavn på mærkat	Antal beholdere i kit	Aktive stoffer	Opbevaring
End Repair Mix	1	DNA-polymerase og dNTP'er i vandig bufferopløsning	-25 °C til -15 °C
A-Tailing Mix	1	DNA-polymerase og dATP i vandig bufferopløsning	-25 °C til -15 °C
Ligation Mix	1	DNA-ligase i vandig bufferopløsning	-25 °C til -15 °C
Hybridization Buffer	1	Vandig bufferopløsning	-25 °C til -15 °C
VeriSeq NIPT DNA Adapter Plate	1	Oligonukleotider i vandig bufferopløsning	-25 °C til -15 °C

Tabel 4 VeriSeq NIPT Library Prep Box (96), delnr. 15066810

Reagensnavn på mærkat	Antal beholdere i kit	Aktive stoffer	Opbevaring
End Repair Mix	1	DNA-polymerase og dNTP'er i vandig bufferopløsning	-25 °C til -15 °C
A-Tailing Mix	2	DNA-polymerase og dATP i vandig bufferopløsning	-25 °C til -15 °C
Ligation Mix	2	DNA-ligase i vandig bufferopløsning	-25 °C til -15 °C
Hybridization Buffer	1	Vandig bufferopløsning	-25 °C til -15 °C
VeriSeq NIPT DNA Adapter Plate	1	Oligonukleotider i vandig bufferopløsning	-25 °C til -15 °C

VeriSeq NIPT Sample Prep, Accessory Box

Tabel 5 VeriSeq NIPT Accessory Box, delnr. 15066811

Reagensnavn på mærkat	Antal beholdere i kit	Aktive stoffer	Opbevaring
DNA Binding Plate	1	Mikroplade i propylen med membran i modificeret silikone	2 °C til 8 °C
Resuspension Buffer	1	Vandig bufferopløsning	2 °C til 8 °C
Sample Purification Beads	1	Paramagnetiske fastfase-perler i vandig bufferopløsning	2 °C til 8 °C
DNA Quantification Reagent	1	DNA-interkalerende farvestof i DMSO	2 °C til 8 °C
DNA Quantification Standard	1	dsDNA-standard i vandig bufferopløsning	2 °C til 8 °C

VeriSeq NIPT Sample Prep, Workflow Tubes and Labels

Tabel 6 Workflow Tubes and Labels, delnr. 15071543

Artikelnavn på mærkat	Antal artikler i kit	Opbevaring
Label (LBL)–Plate Barcode (Mærkat (LBL) – strekkode til plade)	9	15 °C til 30 °C
Label (LBL)–Deep-well Plate Barcode (Mærkat (LBL) – strekkode til dybbrøndsplade)	12	15 °C til 30 °C
Tube (TB)–Empty Pooling Tube (Rør (TB) – tomt puljerør)	5	15 °C til 30 °C

Reagenser, medfølger ikke

Nødvendige reagenser, medfølger ikke

- ▶ Nødvendige sekventeringsreagenser og brugsartikler til next-generation-sekventeringssystemet (NGS-systemet)
- ▶ DNase-/RNase-frit vand
- ▶ Ethanol, 100 % (200 proof) til molekylærbiologi



BEMÆRK!

Ethanol, der ikke er godkendt til molekylærbiologi, kan potentielt have negativ indvirkning på analysens ydeevne.

Valgfri reagenser, medfølger ikke

- ▶ Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) for no template control (NTC)

Opbevaring og håndtering

- 1 Rumtemperatur er defineret som 15 °C til 30 °C.
- 2 Alle reagenser er kun til engangsbrug. Når reagenserne er klargjort til brug, skal de anvendes med det samme.
- 3 Kontakt Illuminas kundeservice, hvis emballagen eller indholdet i VeriSeq NIPT Solution-komponenterne er beskadiget eller brudt.
- 4 Reagenserne er stabile ved de anførte opbevaringsbetingelser indtil den udløbsdato, der fremgår af mærkningen på sætterne. Se opbevaringsbetingelserne i kolonnen Opbevaring i tabellerne i *Medfølgende reagenser på side 4*. Reagenserne må ikke anvendes efter udløbsdatoen.
- 5 Ændringer i reagensernes udseende kan være tegn på nedbrydning af materiale. Reagenserne må ikke anvendes, hvis de ændrer udseende (f.eks. markant farveændring eller uklarhed, der kan tyde på mikrobiel kontaminering).
- 6 Overhold nedenstående best practice ved håndtering af Sample Purification Beads
 - ▶ Nedfrys aldrig perle.
 - ▶ Lad perle nå rumtemperatur inden brug.
 - ▶ Bland perle i vortexblander umiddelbart inden brug, indtil de er godt opslæmmet, og farven er homogen.
- 7 Lysis Buffer, Wash Buffer I, Wash Buffer II, Elution Buffer og Proteinase Buffer kan danne synlige bundfald eller krystaller. Bland dem godt på vortex-blander inden brug, og gennemse dem så for at sikre, at der ikke er bundfald.
- 8 Helblod må aldrig nedfryses efter indhentning.
- 9 Sekventer biblioteker så hurtigt som muligt efter puljeoprettelsen. Puljebiblioteker er stabile i op til 7 dage ved -25 °C til -15 °C. Yderligere denaturering er ikke nødvendig, hvis de bliver opbevaret i denne tidsperiode under disse forhold.

Udstyr og materialer

Nødvendigt udstyr og nødvendige materialer, medfølger ikke

Nødvendigt udstyr, medfølger ikke

Udstyr	Leverandør
Enkeltkanalspipetter, 20 µl	Almen laboratorieleverandør
Enkeltkanalspipetter, 200 µl	Almen laboratorieleverandør
Enkeltkanalspipetter, 1.000 µl	Almen laboratorieleverandør
Pipettehjælper	Almen laboratorieleverandør
Køleskab, 2 °C til 8 °C	Almen laboratorieleverandør
Fryser, -25 °C til -15 °C	Almen laboratorieleverandør
Mikrocentrifuge	Almen laboratorieleverandør
Vortexblander	Almen laboratorieleverandør
Centrifuge og rotoenhed til blodprøverør	
<p>Anbefalet:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Allegra X12R Series Centrifuge, 1600 g • Allegra Centrifuge GH-3.8 Rotor with buckets (centrifugerotor med spande) • Allegra Centrifuge Bucket Covers, set of two (låg til spande, sæt med to) • Allegra Centrifuge Adapter Assembly, 16 mm, set of four (adapterenhed, 16 mm, sæt med fire) 	<p>Beckman Coulter, artikelnr. 392304 (120 V eller 230 V)</p> <p>Beckman Coulter, artikelnr. 369704</p> <p>Beckman Coulter, artikelnr. 392805</p> <p>Beckman Coulter, artikelnr. 359150</p>
<p>Tilsvarende:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Kølet centrifuge med kapacitet til 1600 x g med indstillingsmuligheden "ingen bremse" • Svingende spand-rotor med spande • Spand-indsatser, kapacitet til 24, 48, eller 96 rør, minimumsdybde 76 mm • Indsatsadaptere til understøttelse af 16 x 100 mm-blodprøverør 	Almen laboratorieleverandør
Centrifuge og rotoenhed til mikroplader	
<p>Anbefalet:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sorvall Legend XTR Centrifuge • HIGHPlate 6000 Microplate Rotor (mikropladerotor) • To af en af følgende supportbaser til mikroplader: <ul style="list-style-type: none"> • MicroAmp 96-Well Support Base (supportbase til 96 brønde) • 96-Well PCR Plate Carrier (holder til PCR-plade med 96 brønde) 	<p>Thermo Fisher Scientific, katalognr. 75004521 (120 V) eller katalognr. 75004520 (230 V)</p> <p>Thermo Fisher Scientific, katalognr. 75003606</p> <p>Thermo Fisher Scientific, katalognr. 4379590</p> <p>Thermo Fisher Scientific, katalognr. AB-0563/1000</p>
<p>Tilsvarende:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Centrifuge med kapacitet til 5600 x g • Svingende pladerotor med holdere til plader med 96 brønde, minimumsdybde 76,5 mm • Supportbase til mikroplader 	Almen laboratorieleverandør
<p>En af følgende mikropladelæsere (fluorometer) med SoftMax Pro v6.2.2 eller højere:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gemini XPS • SpectraMax M2 	<p>Molecular Devices, delnr. XPS</p> <p>Molecular Devices, delnr. M2</p>

Udstyr	Leverandør
SpectraMax High-Speed USB, Serial Adapter (serieadapter)	Molecular Devices, delnr. 9000-0938
Termocykler med følgende specifikationer: <ul style="list-style-type: none"> • Opvarmet låg • Temperaturinterval: 4 °C til 98 °C • Temperaturpræcision: ± 2 °C • Minimal temperaturændringshastighed: 2 °C pr. sekund • Kompatibel med Twin.tec PCR Plate 96-well, full skirt (Twin.rec PCR-plade, 96 brønde, fuldt skørt) 	Almen laboratorieleverandør
VeriSeq NIPT Microlab STAR	Hamilton, delnr. 95475-01 (115 V), delnr. 95475-02 (230 V) eller delnr. 806288 (for Hamilton Company Bonaduz)
Et next-generation-sekventeringssystem (NGS-system) med følgende egenskaber: <ul style="list-style-type: none"> • 2 x 36 bp paired end-sekventering • Kompatibel med dobbeltindeksadapterne i VeriSeq NIPT Sample Prep • Automatisk oprettelse af .BCL-filer • Kemi baseret på to kanaler • 400 millioner paired end-læsninger pr. kørsel • Kompatibel med VeriSeq NIPT Assay Software v2 eller et NextSeq 550Dx-sekventeringssystem.	Instrumentleverandør eller Illumina, delnr. 20005715
Hvis der anvendes et NextSeq 550Dx-sekventeringssystem: <ul style="list-style-type: none"> • NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5, 75 cyklusser 	Illumina, delnr. 20028870
VeriSeq Onsite Server v2 eller en opgraderet VeriSeq Onsite Server	Illumina, delnr. 20028403 eller 20047000 (v2) eller delnr.15076164 eller delnr. 20016240 (opgraderet)

Ekstraudstyr, medfølger ikke

Udstyr	Leverandør
Pluggo Decapper System	LGP Consulting, delnr. 4600 4450
SpectraMax SpectraTest FL1 fluorescence validation plate (fluorescensvalideringsplade)	Molecular Devices, delnr. 0200-5060
Tube Revolver/Rotator, 15 ml tubes, 40 rpm, 100-240 V (rør-revolver/-rotator, 15 ml rør, 40 o/m, 100-240 V)	Thermo Scientific, katalognr. 88881001 (US) eller katalognr. 88881002 (EU)

Nødvendige materialer, medfølger ikke

Materiale	Leverandør
1000 µl Conductive Non-Sterile Filter Tips (Konduktive ikke-sterile filterspidser, 1000 µl)	Hamilton, delnr. 235905
300 µl Conductive Non-Sterile Filter Tips (Konduktive ikke-sterile filterspidser, 300 µl)	Hamilton, delnr. 235903
50 µl Conductive Non-Sterile Filter Tips (Konduktive ikke-sterile filterspidser, 50 µl)	Hamilton, delnr. 235948

Materiale	Leverandør
<p>Dybbrøndsreservoir med følgende specifikationer:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mikroplade i format SLAS 1-2004 med 96 brønde med pyramide- eller kegleformet bund og en kapacitet på minimum 240 ml. • Polypropylen med lav DNA-binding på alle overflader, som prøverne har kontakt med. • Indvendige dimensioner (væskeniveau), der er kompatible med de automatiske aspirations- og påfyldningstrin på VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Højdedimensioner, der er kompatible med de automatiske bevægelser på VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	<p>Almen laboratorieleverandør</p> <p>Kompatible reservoirer:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Corning Axygen, produktnr. RES-SW96-HP-SI • Agilent, produktnr. 201246-100
<p>Reagenskar med følgende specifikationer:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Kar, der sidder sikkert fast i holderen på VeriSeq NIPT Microlab STAR og har kegleformet bund og en kapacitet på minimum 20 ml. • RNase-/DNase-fri polypropylen. • Indvendige dimensioner (væskeniveau), der er kompatible med de automatiske aspirations- og påfyldningstrin på VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Højdedimensioner, der er kompatible med de automatiske bevægelser på VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	<p>Almen laboratorieleverandør</p> <p>Kompatible kar:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Roche, produktnr. 03004058001
<p>Dybbrøndsplader med følgende specifikationer:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mikroplade i format SLAS 1-2004, 3-2004 eller 4-2004 med 96 brønde med pyramide- eller kegleformet bund og en brøndkapacitet på minimum 2 ml. • Polypropylen med lav DNA-binding på alle overflader, som prøverne har kontakt med og torsionsbestandig ramme. • Brønddimensioner (væskeniveau), der er kompatible med de automatiske aspirations- og påfyldningstrin på VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Pladehøjdedimensioner, der er kompatible med de automatiske bevægelser på VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	<p>Almen laboratorieleverandør</p> <p>Kompatible plader:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, delnr. 0030505301 • Eppendorf, delnr. 30502302 • USA Scientific, delnr. 1896-2000
<p>Plade med 384 brønde med følgende specifikationer:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mikroplade med 384 brønde, der er optimal til lave volumener og har en brøndkapacitet på minimum 50 µl. • Polystyren med lysblokering og lav DNA-binding på alle overflader, som prøverne har kontakt med. • Brønddimensioner (væskeniveau), der er kompatible med de automatiske aspirations- og påfyldningstrin på VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Pladehøjdedimensioner, der er kompatible med de automatiske bevægelser på VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	<p>Almen laboratorieleverandør</p> <p>Kompatible plader:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Corning, produktnr. 3820
<p>Plade med 96 brønde med følgende specifikationer:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mikroplade med torsionsbestandig ramme og 96 brønde med kegleformede bunde, forhøjede kanter og en brøndkapacitet på minimum 150 µl. • RNase-/DNase-fri polypropylen med lav DNA-binding på alle overflader, som prøverne har kontakt med. • Brønddimensioner (væskeniveau), der er kompatible med de automatiske aspirations- og påfyldningstrin på VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Pladehøjdedimensioner, der er kompatible med de automatiske bevægelser på VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	<p>Almen laboratorieleverandør</p> <p>Kompatible plader:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, delnr. 0030129512 • Eppendorf, delnr. 30129580 • Eppendorf, delnr. 30129598 • Eppendorf, delnr. 30129660 • Eppendorf, delnr. 30129679 • BioRad, delnr. HSP9601

Materiale	Leverandør
En af følgende forseglingsfolier: • Microseal 'F' Foil • Foil seals	Bio-Rad, katalognr. MSF1001 Beckman Coulter, artikelnr. 538619
Cell-Free DNA BCT CE	Streck, katalognr. 218997
Push Caps (Trykhætter)	Sarstedt, bestillingsnr. 65.802
2 ml-rør med skruehætte	Almen laboratorieleverandør
20 µl filterspidser til 20 µl pipettor	Almen laboratorieleverandør
200 µl filterspidser til 200 µl pipettor	Almen laboratorieleverandør
1000 µl filterspidser til 1000 µl pipettor	Almen laboratorieleverandør
Serologiske pipetter, 25 ml	Almen laboratorieleverandør
Serologiske pipetter, 10 ml	Almen laboratorieleverandør
Anbefalet: Deconex® SOLARSEPT Deconex® 61 DR	Borer Chemie AG
Tilsvarende: En alkoholbaseret, hurtigtvirkende desinfektionsspray En opløsning med desinficerende rensmiddel	Almen laboratorieleverandør

Valgfri materialer, medfølger ikke

Materiale	Leverandør
Rør, skruehætte, 10 ml (kun til kontrolprøver)	Sarstedt, bestillingsnr. 60.551
Rør, skruehætte, 50 ml	Almen laboratorieleverandør

Indhentning, transport og opbevaring af prøver



FORSIGTIG

Alle prøver skal håndteres som potentielt infektiøse stoffer.

- 1 Helblodsprøver à 7-10 ml skal indsamles i Streck Cell-Free DNA BCT.
- 2 Helblod skal transporteres i overensstemmelse med alle gældende forordninger vedrørende transport af ætiologiske stoffer. Det anbefales at anvende ekspresforsendelse/-transport.
- 3 Skal opbevares ved temperaturer mellem 4 °C og 30 °C under transport. Efter modtagelsen skal prøverne opbevares ved 2 °C til 8 °C, indtil de skal anvendes. Tidsperioden mellem indhentning af blod og initial plasmaisolering bør ikke overstige 5 dage.
- 4 Hvis omtestning er nødvendig, kan prøverne lukkes til igen efter behandling og opbevares ved 4 °C i yderligere 5 dage (op til 10 dage i alt efter indhentning af blod).



FORSIGTIG

Overskridelse af ovenfor nævnte opbevaringstider kan påvirke fejlraterne for individuelle prøver negativt.

Advarsler og forsigtighedsregler

- ▶ Denne analyse indeholder proteinase K. Inhalation, indtagelse, hudkontakt og øjenkontakt kan resultere i personskader. Anvend den i et område med god ventilation iført beskyttende beklædning, og undgå indånding af støv. Alle beholdere og ikke anvendt indhold skal bortskaffes i henhold til gældende nationale sikkerhedsstandarder

- ▶ Denne analyse indeholder guanidiniumchlorid. Inhalation, indtagelse, hudkontakt og øjenkontakt kan resultere i personskader. Anvend den i et område med god ventilation iført beskyttende beklædning. Alle beholdere og ikke anvendt indhold skal bortskaffes i henhold til gældende nationale sikkerhedsstandarder
- ▶ Denne analyse indeholder 2-propanol, som er et brandfarligt kemikalie. Må ikke opbevares i nærheden af varme og åben ild. Inhalation, indtagelse, hudkontakt og øjenkontakt kan resultere i personskader. Anvend den i et område med god ventilation iført beskyttende beklædning. Alle beholdere og ikke anvendt indhold skal bortskaffes i henhold til gældende nationale sikkerhedsstandarder
- ▶ Denne analyse indeholder dimethylsulfoxid, som er en ætsende og brandfarlig væske. Inhalation, indtagelse, hudkontakt og øjenkontakt kan resultere i personskader. Anvend den i et område med god ventilation iført beskyttende beklædning. Alle beholdere og ikke anvendt indhold skal bortskaffes i henhold til gældende nationale sikkerhedsstandarder
- ▶ For at forhindre dannelse af skadelige gasser må affald fra cfDNA-ekstraktion (indeholder guanidinthiocyanat) ikke bortskaffes sammen med affald indeholdende blegemiddel (natriumhypochlorit).
- ▶ Alle prøver skal håndteres som potentielt infektiøse stoffer.
- ▶ Overhold laboratoriets rutinemæssige forholdsregler. Må ikke pipetteres med munden. Der må ikke indtages mad og drikke eller ryges i arbejdsområderne. Anvend engangshandsker og laboratoriekittel i forbindelse med håndtering af prøver og analysereagenser. Vask hænderne grundigt efter håndtering af prøver og analysereagenser.
- ▶ Brug ikke analysekomponenterne efter den udløbsdato, der er angivet på analyseæskens etiket. Byt ikke om på analysekomponenter fra forskellige analysepartier. Analysepartiet (lot-/batchnummer) er angivet på analyseæskens etiket Opbevar analysekomponenterne ved de anviste temperaturer.
- ▶ For at forhindre nedbrydning af prøver eller reagenser skal det tilsikres, at alle natriumhypochloritdampe som følge af rengøring er fuldstændigt forsvundet, inden protokollen påbegyndes.
- ▶ Manglende overholdelse af de beskrevne fremgangsmåder kan resultere i fejlagtige resultater eller betydeligt nedsat prøve kvalitet.
- ▶ Alle alvorlige hændelser, der er relateret til dette produkt, skal omgående indberettes til Illumina og til de kompetente myndigheder i brugerens og patientens opholdsland.
- ▶ Se yderligere miljø-, sundheds- og sikkerhedsrelaterede oplysninger i sikkerhedsdatabladene (SDS) på support.illumina.com/sds.html.

Noter til fremgangsmåde

Forebyggelse af kontaminering

- ▶ Anvend nye spidser og nye engangslaboratorieartikler.
- ▶ Anvend aerosolbestandige spidser for at reducere risikoen for overførselskontaminering og krydskontaminering fra prøve til prøve.
- ▶ På grund af risikoen for kontaminering skal der udvises ekstrem forsigtighed for at sikre, at brøndindholdet bliver helt nede i brønden. Undgå at plaske med indholdet. Centrifuger efter vortex-blanding.
- ▶ Følg gældende forordninger vedrørende korrekt laboratoriepraksis og -hygiejne i forbindelse med håndtering af blod og blodderivater.
- ▶ Anvend ikke blegemidler i spraydåse i forbindelse med biblioteksklargøring. Kontaminering med spormængder af blegemiddel kan medføre analysefejl.

Rengøring af dækket på VeriSeq NIPT Microlab STAR

- ▶ Kontrollér, at dækket er rent, inden brug. Den ugentlige vedligeholdelse skal gennemføres mindst én gang om ugen. Følg nedenstående rengøringsvejledning.

- ▶ Fjern alle udtagelige holdere, og rengør dem med en alkoholbaseret, hurtigtvirkende desinfektionspray (Deconex® SOLARSEPT eller tilsvarende), og lad dem tørre. Hvis de er meget snavsede, skal de efterfølgende lægges i blød i en opløsning med desinficerende rensmiddel (Deconex® 61 DR rensvæske eller tilsvarende), skylles med den alkoholbaserede desinfektionsmiddel og efterlades til tørring.
- ▶ Åbn skærmen på forsiden, og tør dækket over med en klud, der er vædet i Deconex® SOLARSEPT (eller tilsvarende). Det er særligt vigtigt at kontrollere, at glideklodserne er rene.
- ▶ Fjern CVS-manifolden, og rengør manifolden, tætningen og de indvendige kamre i CVS med en klud.
- ▶ Tøm spidsaffaldet fra CORE 96-hovedet og den uafhængige kanal.
- ▶ Fjern spidsudskubningspladen på spidsaffaldsstationen tilknyttet den uafhængige kanal, og rengør den: Spray Deconex® SOLARSEPT (eller tilsvarende) direkte på overfladen, og tør den over. Træk en ny plastikpose over rammen, og sæt den på plads igen. Sæt den rene spidsudskubningsplade på plads igen.
- ▶ Spray Deconex® SOLARSEPT (eller tilsvarende) direkte på overfladen af affaldsboksen og -skakten tilknyttet CORE 96-hovedet og rengør med en klud.
 - ▶ Hvis det er vanskeligt at fjerne aflejringer fra spidsaffald, kan der gnides med en klud vædet i DNase-/RNase-frit vand, indtil aflejringerne er væk. Bortskaf kluden korrekt. Fortsæt til sterilisering med det alkoholbaserede desinfektionsmiddel.
- ▶ Væd en fnugfri klud eller vatpind med 70 % ethanol. Tør laserscannervinduet på strekkodelæseren over. Rengør alle brøndene på CPAC-pladeadapteren med den samme klud eller vatpind. Hvis der bruges en klud, skal den trykkes ned i hver brønd på adapteren med bagenden af en kuglepen for at sikre, at brøndens inderside bliver rengjort korrekt.
- ▶ Rengør de uafhængige kanaler:
 - ▶ Rengør spidsudskubningsmuffen (den ydre del af pipettekanalerne) på de uafhængige kanaler med en fnugfri klud, der er gennemvædet med Deconex® SOLARSEPT (eller tilsvarende). (Se *Hamilton Microlab STAR Reference Guide #15070074*).
 - ▶ Rengør stopdisken og O-ringene på pipettehovedet (ydre del af pipettekanalerne) med en fnugfri klud, der er gennemvædet med Deconex® SOLARSEPT (eller tilsvarende).
- ▶ Rengør CORE 96-hovedet:
 - ▶ Rengør kabinettet på 96-hovedet og bunden af stopdiskene med den samme fnugfri klud gennemvædet med Deconex® SOLARSEPT (eller tilsvarende).
 - ▶ Ved hjælp af samme klud eller en afrevet strimmel af en klud gennemvædet med Deconex® SOLARSEPT (eller tilsvarende) skal der rengøres rundt om sidene på pipettekanalerne på 96-hovedet, på samme måde som med tandtråd, så O-ringene bliver rengjort. Gentag denne procedure på alle pipettekanalerne på 96-hovedet.
- ▶ Spray for- og sideskærmen med Deconex® SOLARSEPT (eller tilsvarende), og tør efter.
- ▶ Rengør Autoload-beskyttelsesbåndet med en klud, der er gennemvædet med Deconex® SOLARSEPT (eller tilsvarende), og tør efter uden at bruge unødigt kraft.
- ▶ Når dækket og komponenterne er helt tørre, sættes holderne på plads igen.

**BEMÆRK!**

Ukorrekt rengøring og vedligeholdelse af ML STAR kan resultere i krydskontaminering og forringet analytisk ydeevne

Kvalitetskontrol

Det er muligt at evaluere kontrolmateriale med kendte ydelsesegenskaber for at detektere forskelle i behandlingen og tekniske procedurer på laboratoriet.

**BEMÆRK!**

Kørsel af en kontrolprøve eller NTC (ingen skabelonkontrol) reducerer det totale antal af ukendte materielle prøver, der kan behandles med det enkelte prøveklargøringsæt.

Overskrid ikke to NTC-prøver pr. batch med 24 eller 48 prøver eller fire NTC-prøver pr. batch med 96 prøver.

Brugervejledning

Tips og teknikker

Fortsæt straks til næste trin, medmindre der er et sikkert stoptidspunkt i protokollen.

Påsætning af strekkoder på plader

- Strekkoder til plader med fuldt skørt starter med PL.
- Strekkoder til dybbøndsplader starter med DW.
- Sæt strekkodeme på siden af plademe med fuldt skørt og dybbøndsplademe ved siden af kolonne 12.
- Anbring plademe med strekkodeme mod højre for at muliggøre den automatiserede scanning.

Påføring og fjernelse af forsegling på pladen


- ▶ Forsegl altid pladen med 96 brønde inden følgende trin i protokollen:
 - ▶ Centrifugeringstrin
 - ▶ Termocyklertrin
- ▶ Pladen forsegles ved at påføre det selvklæbende overtræk og lukke det til
- ▶ Inden fjernelse af forseglingen:
 - ▶ Centrifuger kortvarigt pladen med 96 brønde ved 1000 x g i 20 sekunder.
 - ▶ Placer pladen på en jævn overflade, inden forseglingen fjernes forsigtigt.

VeriSeq NIPT Microlab STAR

- ▶ Udfør og dokumentér den påkrævede vedligeholdelse i henhold til producentens vejledning inden brug.
- ▶ Overvåg ML STAR på de automatiserede trin. Hold øje med beskeder og operatørinstruktioner på softwaregrænsefladen VeriSeq NIPT Workflow Manager v2.
- ▶ Lad skærmen på forsiden være på plads under driften.
- ▶ Hold dækket ryddet for alle genstande under driften.
- ▶ Hjælp manuelt med at danne forseglingen mellem pladen og vakuummanifolden, hvis det bliver nævnt som en del af trinene med pladevakuum via VeriSeq NIPT Workflow Manager v2.
- ▶ Lad systemet fjerne spidseme fra adapteren automatisk. Fjern ikke spidseme manuelt, medmindre softwaren beder dig om det.
- ▶ Fjern brugte reagenser og brugsartikler, når det nævnes via Workflow Manager.
- ▶ Tøm dagligt vakuumaffaldsbeholdeme. Den første beholder må aldrig være mere end halvt fyldt. Hvis vakuumaffaldet løber over, kan det beskadige vakuumpumpen og reducere systemets vakuumeffekt.

Behandling af prøver

Fremgangsmåde

- 1 Gennemfør følgende trin for hver portion:
 - a Centrifuger prøverne med påsatte stregkoder ved 1600 × g i 10 minutter ved 4 °C med deaktiveret bremse.
 - b Når centrifugen er stoppet helt, tages prøverørene op. Påbegynd plasmaisolering senest 15 minutter efter centrifugering. Hvis der går mere end 15 minutter, skal de centrifugeres igen.
 - 2 Kontrollér, at prøverne i alle rør er velegnede, herunder kontrol af følgende:
 - ▶ Prøvevolumen er som forventet.
 - ▶ Prøven er separeret korrekt under centrifugering.
 - ▶ Plasmaniveauet er mindst 1,5 ml over buffy coat-laget.
 - ▶ Prøven er ikke kraftigt hæmolysert (dvs. plasmaen har ikke en dybrød farve).
 - ▶ Prøven er ikke lipæmisk (plasmaen er f.eks. ikke hvid og uklar eller mælkeagtig).
 - ▶ Der er ingen koagler i prøven.
-  **FORSIGTIG**
Prøver, der ikke er blevet opbevaret eller håndteret korrekt, kan være uegnede. Hvis der bliver anvendt uegnede prøver til arbejdsgangen, kan de tilstoppe bindingspladen i løbet af ekstraktionen, så prøverne flyder over i tilstødende brønde.
- 3 Tag hætteene af rørene, og sæt dem i rørholdeme. Overfør alle prøver og eventuelle plasmakontroller for batchen.

Plasmaisolering

Klargøring

- 1 Mærk 1 dybbrøndsplade Intermediær Plasma og påfør en stregkode.
- 2 Mærk 1 dybbrøndsplade Final Plasma, og påfør en stregkode.



FORSIGTIG

Sørg for at bruge den korrekte pladetype til pladerne Intermediær Plasma og Final Plasma. Brug af et dybbrøndsreservoir i stedet for en dybbrøndsplade medfører prøvesammenblanding og kan medføre ukorrekte resultater.

Fremgangsmåde

- 1 Åbn AppLauncher, og vælg så **VeriSeq NIPT Method**.
 - 2 Indtast batch-ID og brugernavn, og vælg så **OK**.
Batch-ID'et må højst indeholde 26 tegn. Anvend kun tal, bogstaver, understregningstegn (_) og bindestreger (-).
For eksempel: 2025-10-16_Batch3.
 - 3 Vælg **New Batch** (Ny batch).
 - 4 Afvent initiering, og vælg så **OK** for at begynde plasmaisoleringen.
 - 5 Gennemfør ét af følgende trin:
 - Hvis du vil overføre et eksisterende prøveark, som du har oprettet tidligere, skal du vælge det prøveark, der er knyttet til batchen, og herefter vælge **OK**.
 - Vælg **No Sample Sheet** (Ingen prøveark), hvis du vill fortsætte uden at et prøveark.
- Se yderligere oplysninger om oprettelse af prøveark eller konfiguration af standardværdier i *VeriSeq NIPT Solution v2 Software Guide (Softwarevejledning til NIPT Solution v2) (dokumentnr. 100000067940)*.

**BEMÆRK!**

Prøvetype, enkeltbarn eller tvillinger skal være registreret præcist for hver prøve for at sikre korrekt dataanalyse.

Sørg for, at der er konfigureret standardprøveværdier i Workflow Manager Service Tools, hvis No Sample Sheet (Ingen prøveark) vælges.

- 6 Vælg batchstørrelsen, og vælg så **OK**.
- 7 Vælg antallet af NTC'er (No Template Controls), og vælg så **OK**.

**BEMÆRK!**

NTC-placeringer er altid de sidste placeringer, der vælges. Eksempel: Hvis der er to NTC'er i en kørsel med 24 prøver, er position 23 og 24 NTC'er.

- 8 Kontrollér, at alle stregkoder er korrekt påsat, og overfør så prøverne, spidserne og plademe (med stregkoden mod højre) til holderen. Vælg **OK** efter hver meddelelse om overførsel.

Prøvebatchstørrelse	Holder-type	Spor	Artikel	Placeringssted
24, 48, 96	Spids	7-12	1.000 µl-spids	5
			1000 µl-spids (kun batchstørrelse 96)	4, 5
	Rør	15	Klargjorte blodprøverør 1-24 (alle batchstørrelser)	1-24
	Rør	16	Klargjorte blodprøverør 25-48 (kun batchstørrelse 48 og 96)	25-48
	Rør	17	Klargjorte blodprøverør 49-72 (kun batchstørrelse 96)	49-72
	Rør	18	Klargjorte blodprøverør 73-96 (kun batchstørrelse 96)	73-96
	Multiflex	19-24	Tom dybbrøndsplade, Final Plasma – med påsat stregkode	4
	Multiflex	19-24	Tom dybbrøndsplade, Intermediær Plasma – med påsat stregkode	5
	Reagens	47	[Valgfrit] DPBS for no template control	5

- 9 Kontrollér, at holdeme, laboratorieartikler og reagenser er korrekt overført, og vælg så **OK** på skærmen Pre-Spin Deck Verification (Dækverifikation inden centrifugering).
- 10 Overvåg ML STAR, mens den udfører de automatiserede trin.
- 11 Kontrollér, at der ikke er nogen forhindringer på overførselsdækket på ML STAR, så ML STAR kan rydde holdeme ved besked derom via Workflow Manager.
- 12 Vælg **Unload** (Ryd) for at rydde dækket.
- 13 Fjern dybbrøndspladen Intermediær Plasma
 - a Kontrollér, at der er konsistente voluminer (ingen pipettefejl) i hver brønd på pladen. Den forventede volumen er 1000 µl.
 - b Notér eventuelle uoverensstemmelser, og registrer dem ved afslutningen af plasmaisoleringen.
 - c Forsegel pladen, overfør den med balance, og centrifuger den ved 5600 x g i 10 minutter med bremsen deaktiveret eller på laveste indstilling.
- 14 Vælg **Yes** (Ja) for at fortsætte til final plasmaklargøring.
- 15 Fjern pladeforseglingen, og overfør pladen til holderen igen.

Prøvebatchstørrelse	Holder-type	Spor	Artikel	Placeringssted
24, 48, 96	Multiflex	19-24	Dybbrøndspladen Intermediær Plasma	5

- 16 Vælg afkrydsningsfeltet **Intermediate Plasma plate has been spun** (Pladen Intermediær Plasma er blevet centrifugeret), og vælg så **OK**.
- 17 Overvåg ML STAR, mens den udfører de automatiserede trin.
- 18 Kontrollér, at der ikke er nogen forhindringer på overførselsdækket på ML STAR, så ML STAR kan rydde holderne ved besked derom via Workflow Manager.
- 19 Vælg **Unload** (Ryd) for at rydde dækket.
- 20 Tøm holderne og dækket ved besked derom via Workflow Manager.
- 21 Fjern dybbrøndspladen Final Plasma.
- 22 Kontrollér pladen for:
 - ▶ Konsistente voluminer i hver brønd. Den forventede volumen er 900 µl.
 - ▶ Synlige cellepellets.
 - ▶ Markant hæmolyse.

Hvis der bemærkes en abnorm, synlig cellepellet eller markant hæmolyse, skal den berørte prøve ugyldiggøres ved afslutningen af plasmaisoleringen eller via Batch Manager. Se yderligere oplysninger om Batch Manager i *VeriSeq NIPT Solution v2 Software Guide (Softwarevejledning til VeriSeq NIPT Solution v2) (dokumentnr. 1000000067940)*.
- 23 Vælg **OK**, når du bliver bedt om det via Workflow Manager.
- 24 Indtast kommentarer om de berørte brønde, og vælg så **OK**.
- 25 Foretag en af følgende handlinger:
 - Vælg **Yes** (Ja), hvis du vill fortsætte til cfDNA-ekstraktion.
 - Vælg **Exit** (Afslut) for at stoppe.

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

Forsegl pladen Final Plasma, og opbevar den ved 2 °C til 8 °C i op til 7 dage, hvis der stoppes.

cfDNA-ekstraktion

Klargøring

- 1 Kontrollér udløbsdatoen på Extraction Box og Accessory Box.
- 2 Klargør følgende reagenser. Mærk reservoirkarrene og dybbrøndsreservoirene med reagensnavnet

Artikel	Opbevaring	Instruktioner
Dybbrøndspladen Final Plasma	2 °C til 8 °C	Lad den stå i 30 minutter, hvis den har været på køl, så den når rumtemperatur. Centrifuger ved 1000 x g i 20 sekunder. Tag forseglingen af dybbrøndspladen Final Plasma inden brug.

- 3 Tilsæt langsomt 3,75 ml Proteinase Buffer til hvert reagenshætteglas med Proteinase K.
 - ▶ Klargør 3 hætteglas til 24 og 48 prøver.
 - ▶ Klargør 4 hætteglas til 96 prøver.
- 4 Sæt hætter på hætteglassene med Proteinase K, og bland dem på vortexblander indtil fuldstændig genopslæmning.



FORSIGTIG

Undgå kontaminering af gummiproppen. Hvis der kommer andre substanser på gummiproppen, kan det kontaminere fremtidig prøver.

- 5 Overfør det klargjorte Proteinase K fra alle hætteglassene til et reagenskar, og mærk det Proteinase K.
- 6 Tilsæt 100 ml 100 % EtOH til hver reagensflaske med Wash Buffer II.
 - ▶ Klargør 1 flaske til 24 og 48 prøver.
 - ▶ Klargør 2 flasker til 96 prøver.
- 7 Vend op og ned på flaskerne med Wash Buffer II for at blande indholdet.
- 8 Sæt kryds i afkrydsningsfelterne på flaskerne med Wash Buffer II.

- 9 Mærk 1 ny plade med fuldt skørt Intermediær, og sæt en pladestregkode på den.
- 10 Mærk 1 ny plade med fuldt skørt cfDNA-eluering, og sæt en pladestregkode på den.
- 11 Mærk 1 ny dybbrøndsplade Intermediær ekstraktion, og sæt en dybbrøndspladestregkode på den.
- 12 Sæt en pladestregkode på DNA-bindingspladen.
- 13 Klargør en 70 % EtOH-rengøringsopløsning (70 % EtOH, 30 % DNase-/RNase-frit vand) til rengøring af vakuumsystemet.
- 14 Klargør vakuumsystemet.
 - a Tag vakuummanifolden af, og rengør den med 70 % EtOH.
 - b Tøm vakuumaffaldsbeholderen.
 - c Kontrollér, at vakuumsystemet på ML STAR er tændt.

Rengør ikke tætningen med EtOH, da det kan ødelægge materialet.

Fremgangsmåde

- 1 Vælg **OK** for at starte cfDNA-ekstraktion.
- 2 Hvis VeriSeq NIPT Method ikke allerede er åben:
 - a Åbn AppLauncher, og vælg **VeriSeq NIPT Method**.
 - b Indtast batch-ID og brugernavn, og vælg så **OK**.
- 3 Overfør spidseme til spidsholderne, som anført nedenfor, og vælg så på **OK**.

Prøvebatchstørrelse	Holder-type	Spor	Artikel	Placeringssted
24	Spids	1-6	1.000 µl-spids	1
		7-12	300 µl-spids	1
48	Spids	1-6	1.000 µl-spids	1, 2
		7-12	300 µl-spids	1
96	Spids	1-6	1.000 µl-spids	1, 2, 3, 4
		7-12	300 µl-spids	1

- 4 Overfør optalte spidser til spidsholderne som følger.

Prøvebatchstørrelse	Holder-type	Spor	Artikel	Placeringssted
24, 48, 96	Spids	49-54	1.000 µl-spids	1
			300 µl-spids	2
			50 µl-spids	3

- 5 Indtast placeringen af den første og den sidste spids på hvert spidsstativ, og vælg så **OK**.

- 6 Scan strekkodeme på Extraction Box.
- 7 Indtast brugernavn eller initialer på den person, der har klargjort reagenser, og vælg så **OK**.
- 8 Scan strekkodeme på Accessory Box.
- 9 Indtast brugernavn eller initialer på den person, der har klargjort reagenser, og vælg så **OK**.
- 10 Kontrollér, at strekkodeme er sat på.
- 11 Tag forseglingen af dybbørndspladen Final Plasma, og overfør plademe (med strekkoden mod højre) til pladeholderen, som følger, og vælg så **OK**.

Prøvebatchstørrelse	Holder-type	Spor	Artikel	Placeringssted
24, 48, 96	Multiflex	19-24	Ny plade med fuldt skørt, Intermediær – med påsat strekkode	1
			Ny plade med fuldt skørt, cfDNA-eluering – med påsat strekkode	2
			Ny dybbørndsplade, Intermediær ekstraktion – med påsat strekkode	4
			Dybbørndspladen Final Plasma – med påsat strekkode	5

- 12 Kontrollér, at der er påsat en strekkode på pladen DNA-binding, vælg så **OK**.
- 13 Ved batches, der ikke fylder hele pladen, dækkes de ubrugte brønde med en tilklippet pladeforsegling (kolonne 4-12 for batches med 24 prøver og kolonne 7-12 for batches med 48 prøver).
- 14 Overfør DNA-bindingspladen til vakuummanifolden med strekkoden vendende mod højre.
- 15 Markér afkrydsningsfeltet **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (Er kolonneme på DNA-bindingspladen forsejlet?), og vælg så **OK**.
- 16 Overfør reagenskarrene til reagensholderen, som anført nedenfor, og vælg så **OK**.

Prøvebatchstørrelse	Holder-type	Spor	Artikel	Placeringssted
24, 48	Reagens	47	16 ml Elution Buffer	1
			11 ml Proteinase K	2
96	Reagens	47	16 ml Elution Buffer	1
			15 ml Proteinase K	2

- 17 Overfør de anviste reagenser til dybbørndsreservoireme, og overfør så reservoireme til dybbørndsholdeme, som følger.
- 18 Vælg **OK**.

Prøvebatchstørrelse	Holder-type	Spor	Artikel	Placeringssted
24, 48	Dybbørnd	39-44	125 ml Wash Buffer II	1
			125 ml Wash Buffer I	2
			60 ml 100 % EtOH	3
			100 ml Lysis Buffer	4
			60 ml DNase-/RNase-frit vand	5
96	Dybbørnd	39-44	200 ml Wash Buffer II	1
			125 ml Wash Buffer I	2
			100 ml 100 % EtOH	3
			100 ml Lysis Buffer	4
			100 ml DNase-/RNase-frit vand	5

- 19 Vent, til den automatiserede reagensvolumenkontrol er gennemført.

- 20 Kontrollér, at vakuumaffaldsbeholderen ikke er mere end halvt fyldt (tømning anbefales), og vælg så **OK**.
- 21 Kontrollér placeringen af alle holdere, laboratorieartikler og reagenser, og vælg så **OK** på skærmen Extraction Deck Verification (Verifikation af ekstraktionsdæk).
- 22 Overvåg ML STAR på de automatiserede trin.

**FORSIGTIG**

Du skal manuelt ugyldiggøre prøveoverløb, som ikke bliver detekteret af systemet inden kontaminering af nærliggende brønde.

- 23 Efter det sidste vakuumtrin: Fjern DNA-bindingspladen, og rengør bundens overflade med 70 % EtOH.
- 24 Forsegl eventuelle utildækkede brønde på DNA-bindingspladen, og placer den på den tomme dybbrøndsplade Final Plasma.
- 25 Centrifuger samlingen af plademe DNA-binding/Final Plasma ved 5600 × g i 10 minutter med aktiveret bremse.
- 26 Vælg **OK**.
- 27 Gennemfør vakuumrengøringen under centrifugeringen af DNA-bindingspladen:
 - a Fjern vakuummanifolden, og vælg så **OK**.
 - b Vent på, at den automatiserede affaldstømning bliver gennemført.
 - c Rengør vakuummanifolden og indersiden af vakuumsystemet med 70 % EtOH, og sæt så vakuummanifolden på plads igen.
 - d Vælg afkrydsningsfeltet **Manifold is on Vacuum** (Manifold er på vakuum) for at starte overførslen af elueringspladen på vakuummanifolden, og vælg så **OK**.
- 28 Efter centrifugering: Fjern forseglingen fra de brønde, der indeholder prøver, på DNA-bindingspladen, og placer den oven på cfDNA-elueringspladen.
cfDNA-elueringspladen er på vakuummanifolden.
- 29 Overfør DNA-bindingspladen med strekkoden vendende mod højre, og vælg så **OK**.
- 30 Overvåg ML STAR på de automatiserede trin.
- 31 Efter inkubation: Markér afkrydsningsfeltet **Plates are assembled as indicated** (Plader er samlet som anvist) for at bekræfte, at samlingen af DNA-bindings-/cfDNA-elueringsplademe befinder sig på en supportbase (hvis centrifugen kræver det).
- 32 Forsegl de utildækkede brønde på DNA-bindingspladen.
- 33 Centrifuger ved 5600 × g i 2 minutter med aktiveret bremse, og vælg så **OK**.
- 34 Kontrollér, at cfDNA-elueringspladen har konsistente volumener i hver brønd.
Den forventede volumen er cirka 55 µl.
- 35 Forsegl og gem cfDNA-elueringspladen med henblik på biblioteksklargøring.
- 36 Ved besked derom via Workflow Manager skal det kontrolleres, at der ikke er nogen forhindringer på overførselsdækket på ML STAR, så ML STAR kan rydde holderne.
- 37 Vælg **Unload** (Ryd) for at rydde dækket.
- 38 Tag alle holderne ud, og rengør ML STAR-dækket, og vælg så **OK**.
- 39 Indtast kommentarer om de berørte brønde, og vælg så **OK**.
- 40 Gennemfør ét af følgende trin:
 - Vælg **Yes** (Ja) for at fortsætte til klargøring af biblioteker.
 - Vælg **Exit** (Afslut) for at stoppe.

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

cfDNA-elueringspladen skal forsegles og opbevares ved -25 °C til -15 °C i op til 7 dage, hvis der stoppes.

Klargøring af biblioteker

Klargøring

- 1 Kontrollér udløbsdatoen på kasserne Library Prep (Biblioteksklargøring) og Accessory (Tilbehør)
- 2 Klargør følgende reagenser. Mærk reservoirkarrene og dybrøndsreservoirene med reagensnavnene

Artikel	Opbevaring	Instruktioner
End Repair Mix	-25 °C til -15 °C	Optø ved rumtemperatur. Bland på vortexblander.
A-Tailing Mix	-25 °C til -15 °C	Optø ved rumtemperatur. Bland på vortexblander, og centrifuger så kortvarigt.
Ligation Mix	-25 °C til -15 °C	Optø ved rumtemperatur. Bland på vortexblander, og centrifuger så kortvarigt.
Resuspension Buffer	2 °C til 8 °C	Bland på vortexblander. Sæt til køleopbevaring igen efter brug.
Hybridization Buffer	-25 °C til -15 °C	Optø ved rumtemperatur. Bland på vortexblander. Sæt til køleopbevaring igen efter brug.
VeriSeq NIPT DNA Adapter Plate	-25 °C til -15 °C	Optø ved rumtemperatur. Bland på vortexblander. Centrifuger ved 1000 × g i 20 sekunder. Påfør en pladestregkode
Sample Purification Beads	2 °C til 8 °C	Lad den stå i 30 minutter, så den opnår rumtemperatur. Bland grundigt på vortexblander inden hver brug. Bland på vortexblander eller ved at vende den op og ned, indtil alle perler er opslæmmet, og blandingen er homogen.
cfDNA-elueringsplade	-25 °C til -15 °C	Kontrollér, om relevant, at pladen ikke har været opbevaret i mere end 7 dage, og optø ved rumtemperatur. Bland på vortexblander ved 1500 o/m i 1 minut. Centrifuger ved 1000 × g i 20 sekunder.

- 3 Klargør 50 ml frisk 80 % EtOH ud af 40 ml 100 % EtOH og 10 ml DNase/RNase-frit vand.
Vend op og ned for at blande EtOH.
- 4 Mærk 1 ny plade med fuldt skørt Biblioteker, og påfør en pladestregkode.
- 5 Kontrollér, at temperaturstyringen på ML STAR er tændt.

Enzymfortynding

- 1 Kom A-Tailing Mix og Resuspension Buffer i et rør med skruehætte. Bland på vortexblander, og centrifuger så kortvarigt.

Prøvebatchstørrelse	A-Tailing Mix	Resuspension Buffer
24, 48	900 µl	1.200 µl
96	1800 µl	2400 µl

- 2 Kom Ligation Mix og Resuspension Buffer i et rør med skruehætte. Bland på vortexblander, og centrifuger så kortvarigt.

Prøvebatchstørrelse	Ligation Mix	Resuspension Buffer
24, 48	230 µl	1713 µl
96	440 µl	3278 µl

Fremgangsmåde

- 1 Vælg **OK** for at starte klargøring af biblioteker. Hvis VeriSeq NIPT Method ikke allerede er åben:
 - a Åbn AppLauncher, og vælg så **VeriSeq NIPT Method**.
 - b Indtast batch-ID og brugernavn, og vælg så **OK**.
- 2 Kontrollér, at følgende forbrugsvarer er klargjort, som angivet på skærmen Reagent Preparation (Klargøring af reagenser):
 - ▶ A-Tailing Mix, Ligation Mix og 80 % EtOH.
 - ▶ Sample Purification Beads, End Repair Mix og VeriSeq NIPT DNA Adapter Plate.
- 3 Markér afkrydsningsfeltene, og vælg så **OK**.
- 4 Scan strekkodemene på Library Prep Box.
- 5 Indtast brugernavn eller initialer på den person, der har klargjort reagenser, og vælg så **OK**.
- 6 Scan strekkodemene på Accessory Box.
- 7 Indtast brugernavn eller initialer på den person, der har klargjort reagenser, og vælg så **OK**.
- 8 Overfør spidseme til spidsholderne, som anført nedenfor, og vælg så **OK** for hver holder.

Prøvebatchstørrelse	Holder-type	Spor	Artikel	Placeringssted
24	Spids	1-6	50 µl-spids	1
		7-12	300 µl-spids	1, 2
48	Spids	1-6	50 µl-spids	1, 2
		7-12	300 µl-spids	1, 2, 3, 4
96	Spids	1-6	50 µl-spids	1, 2, 3, 4
		7-12	300 µl-spids	1, 2, 3, 4, 5

- 9 Hvis protokollen blev stoppet efter cfDNA-ekstraktionen, skal de optalte spids overføres til spidsholderne som følger.

Prøvebatchstørrelse	Holder-type	Spor	Artikel	Placeringssted
24, 48, 96	Spids	49-54	1.000 µl-spids	1
			300 µl-spids	2
			50 µl-spids	3

- 10 Indtast placeringen af den første spids på hvert spidsstativ, og vælg så **OK**.
- 11 Bekræft, at strekkodemene er påsat, og overfør pladene (med strekkoden mod højre) til pladeholderen, som anført nedenfor, og vælg så **OK**.

Prøvebatchstørrelse	Holder-type	Spor	Artikel	Placeringssted
24, 48, 96	Multiflex	19-24	cfDNA-elueringsplade – med påsat strekkode	1
			DNA Adapter Plate – med påsat strekkode	2
			Ny plade med fuldt skørt og 96 brønde, biblioteker – med påsat strekkode	3
			Nye plader med fuldt skørt og 96 brønde	4, 5

- 12 Overfør dybbrøndsholderen, som anvist nedenfor, og vælg så **OK**.

Prøvebatchstørrelse	Holder-type	Spor	Artikel	Placeringssted
24, 48, 96	Dybbrønd	39-44	50 ml 80 % EtOH i et dybbrøndsreservoir	1
			Nye plader med fuldt skørt og 96 brønde	2, 3, 4, 5

- 13 Overfør reagenskarrene til reagensholderen, som anført nedenfor, og vælg så **OK**.

Prøvebatchstørrelse	Holder-type	Spor	Artikel	Placeringssted
24, 48, 96	Reagens	47	2,5 ml End Repair Mix	1
			Klargjort A-Tailing Mix (total volumen)	2
			Klargjort Ligation Mix (total volumen)	3
			10 ml Sample Purification Beads	4
			12 ml Hybridization Buffer	5

- 14 Kontrollér, at holderne, laboratorieartiklerne og reagenserne er overført som anvist, og vælg så **OK** på skærmen Library Deck Verification (Verifikation af biblioteksdæk).
- 15 Vent, til den automatiserede reagensvolumenkontrol er gennemført.
- 16 Overvåg ML STAR på de automatiserede trin.
- 17 Når du får besked derom via Workflow Manager, skal du kontrollere, at der ikke er nogen forhindringer på overførselsdækket på ML STAR, så ML STAR kan rydde holderne. Vælg så **Unload** (Ryd) for at rydde dækket.
- 18 Kontrollér, at pladen Biblioteker har konsistente voluminer i hver brønd.



FORSIGTIG

Hvis brøndvoluminerne er inkonsistente, kan prøverne frembringe ukorrekte resultater.

- 19 Hvis pladen Biblioteker skal sættes til opbevaring, skal den først forsegles.
- 20 Tag holderne ud, rengør dækket, og vælg så **OK**.
- 21 Indtast kommentarer om de berørte brønde, og vælg så **OK**.
- 22 Gennemfør ét af følgende trin:
- ▶ Vælg **Yes** (Ja) for at fortsætte til kvantificering af biblioteker.
 - ▶ Vælg **Exit** (Afslut) for at stoppe.
- 23 Gå straks videre til kvantificering, medmindre der skal stoppes.

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

Forsegl pladen Biblioteker inden opbevaring, hvis der stoppes. Bibliotekspladen er stabil i op til 7 dage efter klargøringsdatoen ved -25 °C til -15 °C.

Kvantificering af biblioteker

Klargøring

1 Klargør følgende reagenser:

Artikel	Opbevaring	Instruktioner
DNA Quantification Reagent	2 °C til 8 °C	Beskyttet mod lys. Optø ved rumtemperatur i 30-150 minutter. (Det anbefales at tage reagens ud ved opstart af biblioteksklargøringen.) Bland på vortexblander, og centrifuger så kortvarigt.
DNA Quantification Standard	2 °C til 8 °C	Bland på vortexblander, og centrifuger så kortvarigt.
Biblioteksplade	-25 °C til -15 °C	Kontrollér, om relevant, at pladen ikke har været opbevaret i mere end 7 dage, og optø ved rumtemperatur. Bland på vortexblander. Centrifuger ved 1000 × g i 20 sekunder.
Resuspension Buffer	2 °C til 8 °C	Bland på vortexblander.

- 2 Tænd fluorometeret 10 minutter inden brug.
- 3 Påfør en plade-stregkode på en ny plade med 384 brønde.
- 4 Påfør en plade-stregkode på en ny plade med fuldt skørt.

Fremgangsmåde

- 1 Vælg **OK** for at starte kvantificering.
- 2 Hvis VeriSeq NIPT Method ikke allerede er åben:
 - a Åbn AppLauncher, og vælg **VeriSeq NIPT Method**.
 - b Indtast batch-ID og brugernavn, og vælg så **OK**.
- 3 Scan stregkodeme på Accessory Box.
- 4 Indtast brugernavn eller initialer på den person, der har klargjort reagenser, og vælg så **OK**.
- 5 Overfør spidseme til spidsholderne, som angivet nedenfor, og vælg så **OK (OK)**.

Prøvebatchstørrelse	Holder-type	Spor	Artikel	Placeringssted
24, 48	Spids	1-6	Stativ til 300 µl-spids	1
			Stativ til 50 µl-spids	2
96	Spids	1-6	Stativ til 300 µl-spids	1
			Stativ til 50 µl-spids	2, 3

- 6 Kontrollér, at stregkodeme er sat på, og fjern så forseglingen på pladen Biblioteker, om nødvendigt.
- 7 Overfør pladerne (med stregkoden mod højre) til Multiflex-holderen, som angivet nedenfor, og vælg så **OK**.

Prøvebatchstørrelse	Holder-type	Spor	Artikel	Placeringssted
24, 48, 96	Multiflex	19-24	Nye plader med fuldt skørt – med påsatte stregkoder	1
			Ny plade med 384 brønde – med påsat stregkode	2
			Pladen Biblioteker – med påsat stregkode	3
			Nye plader med fuldt skørt og 96 brønde	4, 5

- 8 Overfør reagensrørene uden hætter til rørholderen, som anvist nedenfor, og vælg så **OK**.

Prøvebatchstørrelse	Holder-type	Spor	Artikel	Placeringssted
24, 48, 96	Rør	46	DNA Quantification Standard	1
			DNA Quantification Reagent	2

- 9 Overfør reagenskarrene til reagensholderen, som anført nedenfor, og vælg så **OK**.

Prøvebatchstørrelse	Holder-type	Spor	Artikel	Placeringssted
24, 48, 96	Reagens	47	Nyt reagenskar (tomt)	1
			16 ml Resuspension Buffer	2

- 10 Overfør de optalte spidser til spidsholderne som følger, hvis protokollen blev stoppet efter biblioteksklargøringsprocessen.

Prøvebatchstørrelse	Holder-type	Spor	Artikel	Placeringssted
24, 48, 96	Spids	49-54	1.000 µl-spidser	1
			300 µl-spidser	2
			50 µl-spidser	3

- 11 Indtast placeringen af den første og den sidste spids på hvert spidsstativ, og vælg så **OK**.
- 12 Kontrollér, at holderne, laboratorieartiklerne og reagenserne er overført som anvist, og vælg så **OK** på skærmen Quant Deck Verification (Verifikation af kvantifikationsdæk).
- 13 Vent, til den automatiserede reagensvolumenkontrol er gennemført.
- 14 Overvåg ML STAR på de automatiserede trin.
- 15 Kontrollér, at der ikke er nogen forhindringer på overførselsdækket på ML STAR, så ML STAR kan rydde holderne ved besked derom via Workflow Manager.
- 16 Vælg **Unload** (Ryd) for at rydde dækket.
- 17 Tag pladen Biblioteker ud.
- Kontrollér, at pladen har konsistente voluminer i hver brønd.
 - Forsegl pladen Biblioteker, og opbevar den ved rumtemperatur, indtil den fluorometriske dataanalyse er gennemført.
- 18 Tag de resterende plader med 96 brønde ud, og kontrollér, at der er konsistente voluminer i alle brønde. Synlige fejl i voluminerne kan være tegn på problemer på pipetteringstrinnene.
- 19 Tag pladen med 384 brønde ud, og kontrollér, at der er væske i de relevante brønde.
- 20 Forsegl pladen med en folieførsegling.
- 21 Centrifuger ved 1000 × g i 20 sekunder.
- 22 Inkuber ved rumtemperatur i 10 minutter, beskyttet mod lys.
- 23 Tag alle holderne ud, og rengør ML STAR-dækket, og vælg så **OK**.



BEMÆRK!

Bortskaf ikke kvantificeringsreagenserne, før der er indhentet data. Der er stadig brug for reagenserne, hvis det bliver nødvendigt at foretage en ny kvantificering.

- 24 Efter inkubation skal folieførseglingen fjernes, og pladen overføres med 384 brønde til mikropladelæseren. Sørg for, at A1 er i øverste venstre hjørne, når den overføres.
- 25 Dobbeltklik på VeriSeq NIPT-skabelonen for at åbne den i SoftMax Pro.
- 26 Vælg **New Experiment** (Nyt eksperiment) under fanen Home (Startside).
- 27 Vælg **Read** (Læsning).
- 28 Eksportér dataene som XML, som følger.

- a Højreklik på **Plate** (Plade), og vælg så **Rename** (Omdøb).
- b Scan stregkoden på pladen Kvantificering, og vælg så **OK**.
- c Klik på plade-ikonet i øverste venstre hjørne af skærmen, og vælg så **Export** (Eksportér) i menuen.
- d Markér afkrydsningsfeltet **Expt name** (Eksportnavn), angiv pladedatoindstilling raw (rå), angiv outputformat XML, og vælg så **OK**.
- e Angiv stien til output-filen og filnavnet, og vælg så **Save** (Gem).

Hamilton-computeren skal have adgang til filplaceringen. Brug ikke mellemrum i filnavnet eller stinavnet.

Analyse

- 1 Indtast et fluorometer-ID på skærmen Scanner Information (Scanneroplysninger) i Workflow Manager.
- 2 Indtast kommentarer om fluorometerkørslen, og vælg så **OK**.
- 3 Gå til den XML-quantificeringsfil, der indeholder de fluorometriske data, og vælg så **OK**.
- 4 Gennemse analyseresultaterne vedrørende standardkurve og prøvekoncentration, og vælg så **OK**.
- 5 Vælg **Rescan** (Scan igen), hvis pladen skal scannes igen.
Prøver er tids- og lysfølsomme. Hvis det er nødvendigt at scanne igen, skal det gøres med det samme.
- 6 Indtast kommentarer om de berørte brønde, og vælg så **OK**.
- 7 Vurder resultaterne, og fortsæt som følger.
 - Fortsæt til puljebiblioteker, hvis resultaterne lever op til specifikationen. Se specifikationer i tabellen med QC-målinger og -grænser for kvantificering i *VeriSeq NIPT Solution v2 Software Guide* (Softwarevejledning til VeriSeq NIPT Solution v2) (dokumentnr. 1000000067940).
 - Hvis resultaterne ikke lever op til specifikationen, afbryder systemet metoden. Gentag kvantificeringsprocedurerne. Start med *Klargøring på side 23*.
- 8 Gennemfør ét af følgende trin:
 - Vælg **Yes** (Ja) for at fortsætte til oprettelse af bibliotekspuljer.
 - Vælg **Exit** (Afslut) for at stoppe.

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

Forsegl pladen Biblioteker inden opbevaring, hvis der stoppes. Bibliotekspladen er stabil i op til 7 dage i alt ved -25 °C til -15 °C.

Opret bibliotekspuljer

Klargøring

- 1 Klargør følgende reagenser:

Artikel	Opbevaring	Instruktioner
Hybridization Buffer	-25 °C til -15 °C	Optø ved rumtemperatur. Bland på vortexblander. Sæt til køleopbevaring igen efter brug.
Biblioteksplade	-25 °C til -15 °C	Optø ved rumtemperatur i tilfælde af forudgående køleopbevaring. Bland på vortexblander ved 1500 o/m i 1 minut. Centrifuger ved 1000 × g i 20 sekunder.

- 2 Mærk et tomt puljerør Pool A (Pulje A). Mærk endnu et tomt puljerør Pool B (Pulje B), hvis der skal anvendes 96 prøver.

- 3 Gem følgende denatureringsprogram på termocycleren med opvarmet låg.
 - a Vælg funktionen til præopvarmning af låget, og indstil til 102 °C.
 - b Indstil reaktionsvoluminen til 50 µl.
 - c Indstil temperaturændringshastigheden til maksimalt niveau (≥ 2 °C pr. sekund).
 - d Inkuber ved 96 °C i 10 minutter og herefter ved 4 °C i 5 sekunder.
 - e Hold på 4 °C.

Fremgangsmåde

- 1 Placer pladen Biblioteker på den forudprogrammerede termocycler, og køр denatureringsprogrammet.



BEMÆRK!

Denaturer ikke pladen Biblioteker, før der er udført vellykket QC-måling af kvantificeringen, da det kan være nødvendigt at foretage ny kvantificering.

- 2 Centrifuger pladen Biblioteker ved 1000 x g i 20 sekunder.
- 3 Vælg **OK** i Workflow Manager for at starte oprettelsen af bibliotekspuljer.
- 4 Hvis VeriSeq NIPT Method ikke allerede er åben:
 - a Åbn AppLauncher, og vælg **VeriSeq NIPT Method**.
 - b Indtast batch-ID og brugernavn, og vælg så **OK**.
- 5 Vælg puljekoncentrationen, og vælg så **OK**.
Juster om nødvendigt puljekoncentrationen for at opnå den tilstræbte clusterdensitet på 220-260 k/mm².
- 6 Udfør en af følgende handlinger, hvis der bedes om det via Workflow Manager:
 - ▶ Hvis du vil overføre et prøveark, skal du vælge det prøveark, der er knyttet til batchen, og herefter vælge **Load** (Overfør).
 - ▶ Vælg **Use Default** (Anvend standard) for hver indstilling, hvis du vil anvende systemets standardværdier for resterende prøvetyper, kønsrapportering eller screeningstype.
Se yderligere oplysninger om oprettelse af prøveark i *VeriSeq NIPT Solution v2 Software Guide (Softwarevejledning til NIPT Solution v2) (dokumentnr. 1000000067940)*.



FORSIGTIG

Inden indstillingen Use Default (Anvend standard) vælges, er det vigtigt at sørge for, at standardværdier er konfigureret i Workflow Manager Service Tools. Hvis det ikke er gjort, kan det medføre ufuldstændig analyse af prøverne.

- 7 Vælg **Start** for at igangsætte timeren for denatureringspladen.
- 8 Overfør spidseme til spidsholderne, som anvist nedenfor.

Prøvebatchstørrelse	Holder-type	Spor	Artikel	Placeringssted
24, 48, 96	Spids	7-12	50 µl-filterspidser	1

- 9 Overfør pladen Denatureret bibliotek (med stregkoden mod højre) til Multiflex-holderen, som angivet nedenfor, og vælg så **OK**.

Prøvebatchstørrelse	Holder-type	Spor	Artikel	Placeringssted
24, 48, 96	Multiflex	19-24	Pladen Denatureret Bibliotek (med påsat stregkode)	1

- 10 Overfør puljerørerne til rørholderen, som anvist nedenfor, og vælg så **OK**.

Prøvebatchstørrelse	Holder-type	Spor	Artikel	Placeringssted
24, 48	Rør	46	Nyt 2 ml-rør, Pool A (Pulje A)	1
96	Rør	46	Nyt 2 ml-rør, Pool A (Pulje A)	1
			Nyt 2 ml-rør, Pool B (Pulje B)	2

- 11 Overfør reagenskarrene til reagensholderen, som anført nedenfor, og vælg så **OK**.

Prøvebatchstørrelse	Holder-type	Spor	Artikel	Placeringssted
24, 48, 96	Reagens	47	3 ml Hybridization Buffer	1

- 12 Overfør spidseme til spidsholderne, som anvist nedenfor.

Prøvebatchstørrelse	Holder-type	Spor	Artikel	Placeringssted
24, 48, 96	Spids	49-54	1.000 µl-filterspidser	1
			300 µl-filterspidser	2
			50 µl-filterspidser	3

- 13 Indtast placeringen af den første og den sidste spids på hvert spidsstativ, og vælg så **OK**.
- 14 Kontrollér, at holderne, laboratorieartiklerne og reagenserne er overført som anvist, og vælg så **OK** på skærmen Pooling Deck Verification (Verifikation af puljedæk).
- 15 Overvåg ML STAR på de automatiserede trin.
- 16 Indtast kommentarer om de berørte brønde, og vælg så **OK**.
- 17 Kontrollér, at der ikke er nogen forhindringer på overførselsdækket på ML STAR, så ML STAR kan rydde holderne ved besked derom via Workflow Manager.
- 18 Vælg **Unload** (Ryd) for at rydde dækket.
- 19 Tag rørholderen ud.
- 20 Sæt hætter på alle puljerør, bland på vortexblander, og centrifuger så kortvarigt.
- 21 Vælg **OK**.
- 22 Sekventer bibliotekerne så hurtigt som muligt efter puljeoprettelsen. Om nødvendigt kan pladen Biblioteker forsegles og opbevares ved -25 °C til -15 °C i op til 7 dage med henblik på oprettelse af nye puljer.

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

Sæt hætter på puljerørerne, og opbevar dem ved -25 °C til -15 °C i op til 7 dage, hvis der stoppes.

Klargøring af puljebiblioteker til sekventering

Klargøring

- 1 Klargør følgende reagenser:

Artikel	Opbevaring	Instruktioner
Puljerør	-25 °C til -15 °C	Optø ved rumtemperatur i tilfælde af forudgående køleopbevaring. Bland kortvarigt på vortexblander. Centrifuger kortvarigt.

- 2 Klargør next-generation-sekventeringssystemet ved at udfylde følgende felter i Local Run Manager VeriSeq NIPT-modulet:

- Run Name (Kørselsnavn)
- Run Description (Kørselsbeskrivelse) (valgfrit)

c Pool Barcode (Puljestregkode)

Se yderligere oplysninger om brugen af Local Run Manager VeriSeq NIPT-modulet i *VeriSeq NIPT Solution v2 Software Guide* (Softwarevejledning til VeriSeq NIPT Solution v2) (dokumentnr. 100000067940).



FORSIGTIG

Den puljestregkode, der indføres i Local Run Manager-modulet, skal stemme overens med den puljestregkode, der indføres i Workflow Manager. Ukorrekte kørselskonfigurationer bliver afvist af analysesoftwarens og kan kræve omsekventering.

Følgende procedure beskriver korrekt overførsel af puljebiblioteker til et kassettebaseret next-generation-sekventeringsinstrument.

Fremgangsmåde

- 1 Overfør følgende materialer til reagenskassetten, og bland ved pipettering.
 - ▶ 900 µl Hybridization Buffer
 - ▶ 450 µl Pulje A
- 2 Fortsæt til sekventering på et next-generation-sekventeringssystem.
Se sekventeringsinstruksene i oversigtsvejledningen til det pågældende next-generation-sekventeringsinstrument. Hvis det er et NextSeq 550Dx, henvises der til *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide* (Oversigtsvejledning til NextSeq 550DX) (dokumentnr. 100000009513) eller *NextSeq 550Dx Instrument Package Insert* (Indlægsseddel til NextSeq 550Dx) (dokumentnr. 1000000043133).
- 3 Gentag om nødvendigt samme fremgangsmåde for Pulje B
 - ▶ For at opnå en clusterdensitet inden for det tilstræbte område kan bibliotekspladepuljen genoprettes med brug en anden puljekoncentration på Hamilton. Genoprettelse af puljen ugyldiggør den oprindelige pulje.
 - ▶ Alternativt kan forholdet mellem puljen og HT1 (450 + 900 µl) ændres for at opnå en clusterdensitet inden for det tilstræbte område.

Next-generation-sekventering

VeriSeq NIPT Solution v2 kan anvendes sammen med et next-generation-sekventeringsinstrument med følgende specifikationer:

- ▶ kapacitet til 2x36 paired end-læsninger.
- ▶ kompatibilitet med indeksadapterne i VeriSeq NIPT Sample Prep Kit.
- ▶ kemi baseret på to kanaler.
- ▶ automatisk oprettelse af .BCL-filer (rådata fra sekventeringsinstrumentet).
- ▶ 400 millioner paired end-læsninger pr. kørsel.
- ▶ kompatibel med VeriSeq NIPT Assay Software v2

NextSeq 550Dx er kompatibelt med VeriSeq NIPT Solution v2.

Analyse af sekventeringsdata

Når sekventeringen er gennemført, bliver sekventeringsdataene automatisk sendt til VeriSeq NIPT Assay Software v2 med henblik på analyse og generering af en rapport. Rapporten omfatter klassifikationer for hver prøve i batchen samt en vurdering af alle QC-målinger af kørslen. Analyseprocessen fra gennemførelse af sekventeringen til de endelige resultater tager cirka 4 timer for en batch med 48 prøver. Detaljerede oplysninger om dataanalysen og output-filen findes i *VeriSeq NIPT Solution v2 Software Guide (Softwarevejledning til VeriSeq NIPT Solution v2)* (dokumentnr. 100000067940).

Tolkning af resultater

Algoritmen for VeriSeq NIPT Solution v2 gør brug af en sofistikeret statistisk model, der kombinerer flere forskellige typer af oplysninger fra indhentningen af paired end-sekventerede biblioteksfragmenter. Denne model anvendes til at detektere genområder, der er under- eller overrepræsenteret i biblioteket af hver prøve. Vigtigst af alt gør denne model rede for, hvorvidt graden af under- eller overrepræsentation er kvantitativt forenelig med en aneuploid hændelse i det føtale genom ved det føtale fraktionsniveau, der er estimeret for biblioteket.

For alle kromosomer bliver data fra paired end-sekventering sammenlignet med referencegenomet (HG19). Unikke, ikke-dupliserede sidestillede læsninger aggregeres i områder (bins) på 100 kb. De overensstemmende bin-tællinger justeres for CG-bias og i henhold til en forudtabeleret områdespecifik genomdækning. Ved brug af sådanne normaliserede bin-tællinger bliver der udledt statistiske scorer for hvert autosom ved at sammenligne de dækningsområder, som kan være berørt af aneuploidi, med resten af autosomerne. Der bliver beregnet en log-likelihood-ratio (LLR) for hver enkelt prøve under hensyntagen til disse dækningsbaserede scorer og den estimerede føtale fraktion. LLR udgør sandsynligheden for, at en prøve er berørt i betragtning af den observerede dækning og føtale fraktion sammenlignet med sandsynligheden for, at en prøve er uberørt i betragtning af den samme observerede dækning. Beregningen af denne ratio tager også højde for den estimerede usikkerhed af den føtale fraktion. Ved efterfølgende beregninger anvendes den naturlige logaritme af forholdet. Analysesoftwaren vurderer LLR'en for hvert målkromosom og hver prøve for at give en aneuploidibestemmelse.

I forbindelse med batchoprettelsen skal du definere prøvetypen (enkeltbarn eller tvilling), screeningstypen (basis eller genomdækkende) og ønske om kønskromosomal rapportering (ja, nej og SCA) for hver prøve. Disse indstillinger bestemmer, hvilke oplysninger der bliver rapporteret for hver prøve.

Uanset prøvetype er det screeningstypen, der bestemmer, hvilke autosomale anomalier der bliver rapporteret. Med basisscreeningen er det kun helkromosomale trisomi-hændelser, der involverer kromosom 13, 18 og 21, der bliver rapporteret. Med den genomdækkende screening bliver hele eller partielle kromosomale deletioner eller duplikationer af ethvert autosomalt kromosom rapporteret. Partielle kromosomale deletioner eller duplikationer skal have en længde på minimum 7 Mb for at blive rapporteret.

For enkeltbarnsprøver er det muligt at deaktivere kønskromosomal rapportering. Det er også muligt at konfigurere rapporteringen af kønskromosomale aneuploidier med eller uden rapportering af kønnet i euploidprøver.

Tvillingep prøver: Hvis der vælges 'ja' til kønskromosomal rapportering, viser resultatet kun, om der er et Y-kromosom i biblioteket eller ej. Der kan ikke rapporteres kønskromosomal aneuploidi for tvillingep prøver.

Resultatet ANOMALY DETECTED (ANOMALI DETEKTERET) betyder, at prøven er screenet positiv for én eller flere anomalier, der er forenelig med den valgte screeningstype og kønskromosomale rapportering. Hvis der bliver detekteret en anomali, indeholder rapporten en beskrivelse af anomalien i form af cytogenetisk notation.

VeriSeq NIPT Assay Software v2 anvender statistik, der bliver genereret i forbindelse med sekventeringen, til at give et føtalt fraktionsestimat (FFE) for hver prøve. FEE udgør den estimerede føtale cfDNA-komponent, som analysen finder, og bliver rapporteret som en afrundet procentdel for hver prøve. Den gennemsnitlige standardafvigelse for dette estimat på tværs af alle prøver er 1,3 %. FEE må ikke anvendes isoleret til at ekskludere prøver i forbindelse med rapportering af resultater.

For at lave en rapportering vedrørende kromosomrepræsentationen gør VeriSeq NIPT Assay Software v2 brug af iFACT (individualized Fetal Aneuploidy Confidence Test), et dynamisk tærskelmålesystem, som viser, om systemet har genereret tilstrækkelig sekventeringsdækning i betragtning af det føtale fraktionsestimat for den enkelte prøve. Negative bestemmelser bliver kun rapporteret, hvis prøven opfylder iFACT-tærsklen. Hvis en prøve ikke når denne tærskel, vil QC-vurderingen vise FAILED iFACT (MISLYKKET iFACT), og systemet vil ikke generere noget resultat.

Udover iFACT vurderer VeriSeq NIPT Assay Software v2 adskillige andre QC-målepunkter i løbet af analysen. Øvrige målepunkter omfatter vurderinger af dækningsuniformiteten på referencegenomiske områder og fordelingen af cfDNA-fragmentlængder. QC-vurderingen viser enten et QC-emblem eller en QC-fejl for

målepunkter uden for det acceptable område. I tilfælde af mislykket QC genererer systemet ikke noget resultat for prøven. I tilfælde af mislykket QC er det muligt at behandle prøven igen under forudsætning af, at der er tilstrækkeligt plasma i blodprøveret.

VeriSeq NIPT Solution v2 genererer data, der bliver anvendt i en endelig rapport. Der bliver ikke generet nogen endelig rapport til patienten. Laboratoriet er ansvarlig for udformningen og indholdet af den endelige rapport, der skal videregives til patientens læge. Illumina er ikke ansvarlig for nøjagtigheden af ordlyden i laboratoriets endelige rapport.



FORSIGTIG

Kontrollér de estimerede føtale fraktioner for alle prøver. Hvis de estimerede føtale fraktioner er stort set ens for alle prøver i en kørsel, kan der være sket sammenblanding af prøverne, som har påvirket resultaterne. Kontakt Illuminas tekniske support for at få hjælp til fejlfinding.

Ydelsesegenskaber

Nedenstående data i afsnittene Klinisk ydeevne og Analytisk ydeevne er genereret ved hjælp af de protokoller og materialer, der er beskrevet i Brugervejledningen, startende med plasma. Alle sekventeringsdata i dette afsnit er genereret på et NextSeq 500/550-sekventeringssystem eller et NextSeq 550Dx-sekventeringssystem med følgende konfigurationer:

	NextSeq 500/550	NextSeq 550Dx
Software på instrumentet	NextSeq Control Software 4.0	NextSeq Operating Software 1.3
Reagenssæt-version	NextSeq 500/550 High Output v2.5 (75 cycle) Reagent Kit	NextSeq 550Dx High Output v2.5 (75 cycle) Reagent Kit
Sekventeringsmetode	2x36 paired end-sekventeringskørsel med højt output	2x36 paired end-sekventeringskørsel med højt output

Klinisk studie

Den kliniske præcision af VeriSeq NIPT Solution v2 blev dokumenteret ved at evaluere plasmaprøver fra kvinder, der var gravide med et enkelt barn eller med tvillinger. Prøverne blev indhentet fra anonymiserede deponerede plasmaprøver frembragt fra perifere helblodsprøver. Over 45.000 prøver blev taget i betragtning til studiet. Der blev udført prænatal screening for føtale kromosomale aneuploidier og partielle deletioner og duplikationer på 7 Mb eller derover på disse prøver. Alle prøver fra afficerede graviditeter og et undersæt af konsekutive prøver fra ikke-afficerede graviditeter var velegnede til testning, hvis der forelå kliniske udfald, og prøvekriterierne var opfyldt. Analysesættet bestod af 2.335 prøver i alt. Sættet var sammensat af 2.328 prøver fra enkeltbarnsgraviditeter og syv prøver fra tvillingegraviditeter.

Ud af disse prøver opnåede 28 (1,2 %; 28/2335) prøver mislykket analyse-QC i første kørsel under analysen af de færdigbehandlede sekventeringsdata:

- 27 iFACT-fejl (én XO, 26 ikke-afficerede)
- Én fejl på grund af data uden for det forventede område

Demografi og graviditetskarakteristika

Moderens alder, gestationsalder og graviditetstrimester er opsummeret i [Tabel 7](#) for prøverne i den genomdækkende screening, inklusive kendte mosaikprøver.

Der blev foretaget en vurdering af demografien mellem basiskohorten og den genomdækkende kohorte, som ikke viste nogen statistisk forskel. Demografien og graviditetskarakteristikaene var ensartede, uanset om de kendte mosaikker blev inkluderet eller ekskluderet.

Tabel 7 Demografi og graviditetskarakteristika

Oversigt over statistik	Genomdækkende (inklusive kendte mosaikker)
Antal prøver	2307*
Moderens alder – år	
Gennemsnit	35,08
Standardafvigelse	4,04
Median	34,95
25. percentil; 75. percentil	32,31; 37,79
Minimum; maksimum	20,22; 53,02
Gestationsalder ved blodprøvetagning - uger	
Gennemsnit	10,93
Standardafvigelse	1,20
Median	10,57
25. percentil; 75. percentil	10,29; 11,14
Minimum; maksimum	10,00; 27,86
Graviditestrimester – n (%)	
< Første (< 14 uger)	2,252 (98 %)
Andet	54 (2 %)
Tredje (≥ 27 uger)	1 (0 %)

* De sidste prøver indeholdt 7 tvillinger.

Klinisk ydeevne

De resultater, der blev rapporteret af VeriSeq NIPT Solution v2, blev sammenlignet med udfaldene med den kliniske referencestandard. Alle studieprøver havde udfald med en klinisk referencestandard (klinisk sandhed) relateret til føtal kromosomal aneuploidistatus og partielle deletioner og duplikationer på 7 Mb eller derover. Udfaldet med den kliniske referencestandard for de prøver, der blev inkluderet i dette studie, afhæng af resultaterne af en kromosomanalyse eller en nyfødtundersøgelse med en NGS-baseret NIPT-negativ screening. Uddannet studiepersonale udførte klassificering af kliniske referencestandarddata i henhold til dokumentet med medicinske koder fra sponsoren.

Kromosomanalysemetoderne omfattede karyotypebestemmelse, fluorescens-in-situ-hybridisering (FISH) eller kromosomal mikroarray (CMA)-baseret komparativ genomisk hybridisering. Kromosomanalyserne blev udført på perifert blod eller sputum fra nyfødt eller spædbarn, konceptionsproduktprøver (POC), amnionceller, villi chorii, placentavæv eller postnatalet navlestrengsblod.

Mosaicisme er defineret som forekomst af to eller flere cellelinjer med forskellig kromosombesætning hos et individ. Cellelinjerne stammer fra samme zygote. Typen og niveauet af mosaicisme varierer og afhænger af tidspunktet for mosaikhændelser under embryogenesen og fosterudviklingen. Der kan ses forskellige typer af mosaicisme med prænatal diagnostik, afhængigt af fordelingen af abnorme kontra normale cellelinjer i cytotrofoblaster, mesenkym eller foster.¹⁰ Selvom der kan ses mosaicisme med enhver kromosomal anomali, er prævalensen af mosaicisme højere ved sjældne trisomier end ved trisomier i kromosom 21, 18 og 13 (T21, T18 og T13).¹¹ I evalueringen af ydeevnen blev der inkluderet mosaiktilfælde i den genomdækkende analyse, da formålet med denne type screening i forbindelse med denne analyse er at detektere sjældne autosomale aneuploidier (RAAs).

Ydeevne af basisscreening

Inkluderede anomalier i basisscreeningen er T21, T18 og T13. I alt 2.243 enkeltbarns- og tvillingeprøver blev inkluderet i analysen. Alle syv tvillingegraviditeter blev korrekt detekteret som T21 og er ikke inkluderet i nedenstående tabel.

Tabel 8 Sensitivitet og specificitet af VeriSeq NIPT Solution v2 til detektion af trisomi 21, 18 og 13 i en basisscreening af enkeltbarnsgraviditeter (eksklusive kendte mosaikker)

	T21	T18	T13
Sensitivitet	> 99,9 % (130/130)	> 99,9 % (41/41)	> 99,9 % (26/26)
2-sidet 95 % CI	97,1 %, 100 %	91,4 %, 100 %	87,1 %, 100 %
Specificitet	99,90 % (1982/1984)	99,90 % (1995/1997)	99,90 % (2000/2002)
2-sidet 95 % CI	99,63 %; 99,97 %	99,64 %; 99,97 %	99,64 %; 99,97 %

Analysens ydeevne ved basisscreeningen, som er vist i **Tabel 8**, er beregnet under udelukkelse af et undersæt af 64 prøver, der var berørt af RAA'er, autosomale partielle deletioner eller duplikationer eller kendt mosaicisme. Disse 64 prøver inkluderede otte T21-mosaikker og tre T18-mosaikker. Fem ud af disse 11 prøver blev identificeret som værende berørt af anomalien med VeriSeq NIPT Assay Software v2.

Ydeevne af genomdækkende screening

Anomalier med den genomdækkende screening omfatter trisomier, monosomier og partielle deletioner eller duplikationer på 7 Mb eller derover. Prøverne til den genomdækkende screening indeholdt 36 prøver med kendt mosaicisme. I alt 2.307 enkeltbarns- og tvillingeprøver blev testet. Det blev korrekt detekteret i alle syv tvillingegraviditeter, at der var en kromosom 21-anomali. Disse er ikke inkluderet i nedenstående tabeller.

Ydeevne af genomdækkende screening for enhver anomali

Tabel 9 Sensitivitet og specificitet af VeriSeq NIPT Solution v2 til detektion af enhver anomali i den genomdækkende screening (inklusive kendte mosaikker)

	Sensitivitet	Specificitet
Estimat-% (n/N)	95,5 % (318/333)	99,34 % (1954/1967)
2-sidet 95 % CI	92,7 %; 97,3 %	98,87 %; 99,61 %

Ydeevne af genomdækkende screening for sjælden autosomal aneuploidi

Tabel 10 Sensitivitet og specificitet af VeriSeq NIPT Solution v2 for sjælden autosomal aneuploidi (RAA) i den genomdækkende screening (inklusive kendte mosaikker)

	Sensitivitet	Specificitet
Estimat-% (n/N)	96,4 % (27/28)	99,80 % (2001/2005)
2-sidet 95 % CI	82,3 %; 99,4 %	99,49 %; 99,92 %

Ydeevne af genomdækkende screening for partielle deletioner og duplikationer

Tabel 11 Sensitivitet og specificitet af VeriSeq NIPT Solution v2 for partielle deletioner og duplikationer på 7 Mb eller derover i den genomdækkende screening (inklusive kendte mosaikker)

	Sensitivitet	Specificitet
Estimat-% (n/N)	74,1 % (20/27)	99,80 % (2000/2004)
2-sidet 95 % CI	55,3 %; 86,8 %	99,49 %; 99,92 %

Forskelle i ydeevnen mellem basisscreeningen og den genomdækkende screening

Metoden til klassifikation af almindelige trisomier og kønskromosomale aneuploidier er den samme med både basisscreeningen og den genomdækkende screening. Ved basisscreeningen bliver algoritmen kun anvendt på T21, T18 og T13. Ved den genomdækkende screening bliver metoden imidlertid anvendt til at vurdere for alle trisomier og RAA'er og partielle duplikationer og deletioner.

Der er to forskelle mellem den beskrevne ydeevnerapportering for basisscreeningen og den genomdækkende screening. For det første blev prøver med kendt mosaicisme for både almindelige trisomier og RAA'er og partielle deletioner og duplikationer inkluderet i den genomdækkende screening med henblik på ydeevnemålinger. For det andet kan den genomdækkende screening rapportere påvisningen af en partiel duplikation eller deletion præferentielt frem for en fuld trisomi. Tilstedeværelsen af en fuld trisomi i tillæg til en partiel duplikation eller deletion kan ses ud fra LLR-scoren i den supplerende rapport.

Inklusion af mosaikker i den genomdækkende screening

Mosaicisme udgør en begrænsning for denne analyse. Ved tilstedeværelse af mosaicisme er det føtale anomalisignal reduceret og kan derfor være mere udfordrende at påvise uden at kompromittere analysens overordnede specificitet. Eftersom mosaicisme er mere relevant for udvidet indhold blev der imidlertid inkluderet prøver med mosaicisme i den genomdækkende screening.

Ud af de 64 prøver, der blev inkluderet i den genomdækkende screening, men ikke i basisscreeningen, blev 36 prøver identificeret som havende mosaicisme iht. den kliniske referencestandard. Ud af disse 36 prøver var 23 resultater overensstemmende med den kliniske referencestandard.

Detektion af partiel deletion eller duplikation kontra aneuploidi af hele kromosomet

VeriSeq NIPT Solution v2 har to menuindstillinger: en basisscreening og en genomdækkende screening. I basisscreeningen bliver resultatet ANOMALY DETECTED (ANOMALI DETEKTERET) kun rapporteret, hvis der detekteres en fuld aneuploidi på kromosom 21, 18 eller 13, og hvis alle kvalitetskontrolmålinger er opfyldt. I den genomdækkende screening detekterer systemet aneuploidi på tværs af alle autosomer og partielle deletioner og duplikationer på mindst 7 Mb.

Ved brug af den genomdækkende screening rapporterer systemet en partiel deletion eller duplikation frem for en helkromosomal hændelse, hvis størrelsen på den partielle deletion eller duplikation dækker mindre end eller lig med 75 % af det kromosom, hvorpå hændelsen bliver detekteret. Hvis det detekterede partielle deletions- eller duplikationsområde udgør mere end 75 % af kromosomets størrelse, bliver hændelsen rapporteret som fuld trisomi eller monosomi af hele kromosomet. Derfor kan substantielt store deletioner og duplikationer, som udgør mindre end 75 % af kromosomets størrelse, være tegn på aneuploidi af hele kromosomet.

LLR-scoren for den helkromosomale klassifikation kan findes i den supplerende rapport for alle prøver. LLR-scoren bør gennemgås med hensyn til den specificerede grænseværdi i [Figur 2 på side 41](#) inden tolkning af resultatet. LLR-scoring på kromosomniveau, der overstiger grænseværdien, understøtter en tolkning, der er forenelig med en aneuploidi af hele kromosomet.

I det kliniske studie var der to prøver fra enkeltbarnsgraviteter med substantielt store duplikationer (én på kromosom 21 og én på kromosom 18), som udgjorde mindre end 75 % af den relative kromosomstørrelse (se [Tabel 12](#)). Begge hændelser blev rapporteret som partielle duplikationer frem for fuld trisomi af det pågældende kromosom. LLR-scoringerne for disse hændelser lå over den grænseværdi, der er forenelig med fuld trisomi. Ved rapportering af en partiel duplikation eller fuld trisomi består opfølgningen på et positivt NIPT-resultat i at tilbyde patienten bekræftende testning ved hjælp af prænatal diagnostik.

Tabel 12 Eksempler på store duplikationer, der blev identificeret i den genomdækkende screening

	Klinisk sandhed	Genomdækkende systemoutput	Anomaliens størrelse (Mb)	% af kromosom	LLR-scoringer
Prøve 1	Trisomi 21-enkeltbarn	Partiel duplikation på 21	22,50	48,9 %	19,43
Prøve 2	Trisomi 18-enkeltbarn	Partiel duplikation på 18	47,00	60,2	12,99

Se *VeriSeq NIPT Solution v2 Software Guide (Softwarevejledning til VeriSeq NIPT Solution v2) (dokumentnr. 100000067940)* for yderligere oplysninger om de kvalitetskontrolmålinger, der anvendes til rapportering af aneuploidiresultater.

Kønnskromosomer

Der er blevet foretaget en sammenligning af de kønskromosomale resultater med VeriSeq NIPT Solution v2 og udfaldene med den kliniske referencestandard. Sammenligningen er opsummeret i tabellen nedenfor. Den procentvise konkordans blev beregnet for hvert kønskromosom inden for hvert udfald med den kliniske referencestandard. Den procentvise konkordans blev beregnet som antallet af prøver, for hvilke det kønskromosomale resultat med VeriSeq NIPT Solution v2 stemte overens med klassifikationen med den kliniske referencestandard, divideret med det totale antal prøver med den samme klassifikation med den kliniske referencestandard.

Tabel 13 Procentvis konkordans vedrørende føtal kønsskikning*

Føtal kønsskikning		Fænotype fra nyfødtundersøgelsen		Cytogenetiske resultater							
Detekteret	Karyotype	Hunkøn	Hankøn	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY	Andet**	Manglende
Anomali ikke detekteret	XX	997	0	21	0	2	0	0	0	0	0
Anomali ikke detekteret	XY	0	966	0	15	0	0	0	0	0	1
Anomali detekteret	XO	0	0	0	0	19	0	0	1	0	0
Anomali detekteret	XXX	0	0	0	0	0	17	0	0	1	0
Anomali detekteret	XXY	0	0	0	0	0	0	23	0	1	0
Anomali detekteret	XYY	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0
I alt		997	966	21	15	21	17	23	12	2	1
Procentvis konkordans		100	100	100	100	90,5	100	100	91,7	Ikke relevant	Ikke relevant

* Fem tvillingegraviditeter blev korrekt klassificeret som Y-positive. To graviditeter blev korrekt klassificeret som Y-negative.

** Andre cytotogenetiske resultater var XXXXX og XYY.

Positiv prædiktiv værdi og negativ prædiktiv værdi med VeriSeq NIPT Solution v2

Testens positive prædiktive værdi (PPV) og negative prædiktive værdi (NPV) giver oplysninger om testens evne til at tjene som grundlag for kliniske beslutninger på baggrund af testens sensitivitet og specificitet og sandsynligheden inden testen for, at et foster er afficeret med trisomi (prævalens). Da PPV og NPV afhænger af prævalensen, og prævalensen af disse aneuploidier kan variere mellem forskellige populationer, blev PPV og NPV beregnet for en række plausible prævalensværdier på baggrund af den sensitivitet og specificitet, der blev observeret i basisscreeningen (uden kendte mosaikker) i studiet af den klinisk præcision. **Tabel 17** er baseret på den genomdækkende screening (med kendte mosaikker).

Tabel 14 Prævalens af trisomi 21, PPV og NPV i basisscreening (eksklusive kendte mosaikker)

Prævalens (%)	PPV (%)	NPV (%)
0,05	33,17	> 99,99
0,10	49,82	> 99,99
0,20	66,53	> 99,99
0,50	83,29	> 99,99
1,00	90,93	> 99,99
1,50	93,79	> 99,99
2,00	95,29	> 99,99

Tabel 15 Prævalens af trisomi 18, PPV og NPV i basisscreening (eksklusive kendte mosaikker)

Prævalens (%)	PPV (%)	NPV (%)
0,03	23,06	> 99,99
0,05	33,31	> 99,99
0,10	49,99	> 99,99
0,20	66,68	> 99,99
0,30	75,03	> 99,99
0,40	80,04	> 99,99
0,50	83,38	> 99,99

Tabel 16 Prævalens af trisomi 13, PPV og NPV i basisscreening (eksklusive kendte mosaikker)

Prævalens (%)	PPV (%)	NPV (%)
0,01	9,10	> 99,99
0,02	16,68	> 99,99
0,05	33,37	> 99,99
0,10	50,05	> 99,99
0,20	66,73	> 99,99

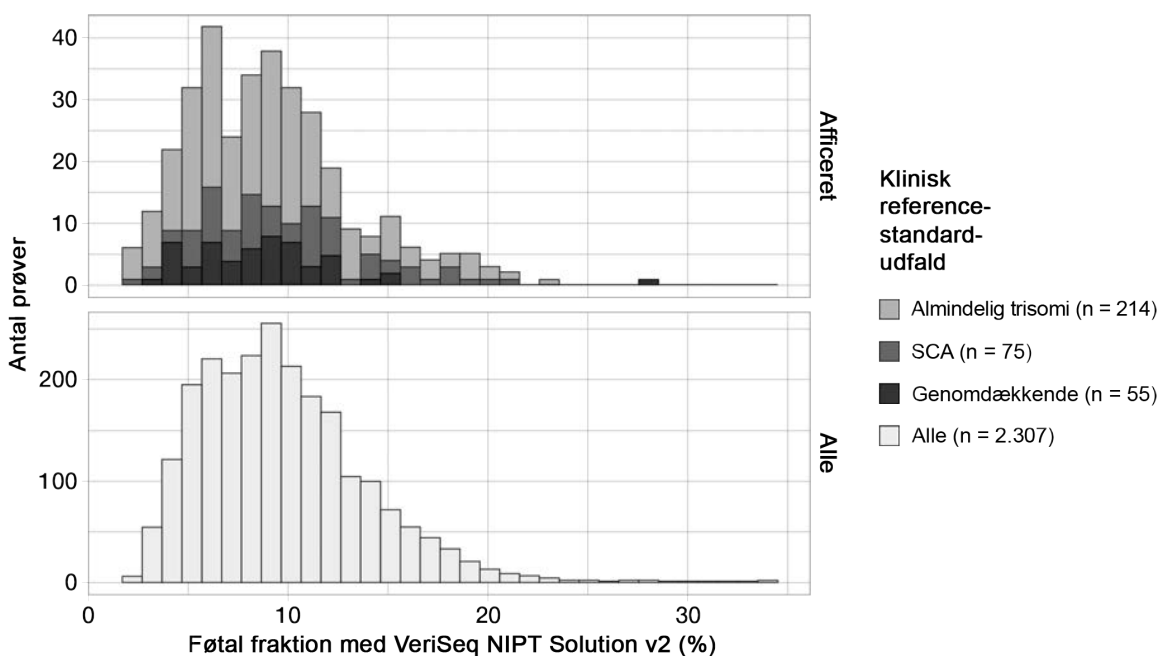
Tabel 17 Prævalens af enhver anomali, PPV og NPV i genomdækkende screening (inklusive kendte mosaikker)

Prævalens (%)	PPV (%)	NPV (%)
0,01	1,42	> 99,99
0,02	2,81	> 99,99
0,05	6,74	> 99,99
0,10	12,64	> 99,99
0,20	22,45	99,99
0,50	42,07	99,98
1,00	59,34	99,95
1,50	68,75	99,93
2,00	74,68	99,91

Fordeling af føtal fraktion

Fordelingen af estimater af føtal fraktion (FF) med VeriSeq NIPT Solution v2 fra den genomdækkende screening med mosaikker er vist efter udfaldskategori med klinisk referencestandard i [Figur 1](#).

Figur 1 Fordeling af føtal fraktion



5 prøver havde anomalier på tværs af flere kategorier.

Almindelig trisomi inkluderer prøver med trisomi 21, 18 og/eller 13.

Genomdækkende inkluderer prøver med RAA eller partielle deletioner og/eller duplikationer.

FF-estimerne varierede fra 2 % til 34 % samlet set med en median på 9 % og en interkvartilbredde (IQ) på 6 % til 12 %. Medianværdien af FF-estimatet for almindelige trisomier og hændelser, der blev detekteret med den genomdækkende screening, er 8 %, og for SCA'er er den 9 %. Bredden i FF-estimer var konsistent for alle udfaldene. Der er ingen åbenbar forskydning i fordelingen af FF mellem almindelige trisomier, SCA'er, hændelser detekteret af den genomdækkende screening eller alle prøver i den genomdækkende analyse.

Ydeevne ved tvillingegegraviditeter

Estimation af ydeevnen med hensyn til trisomi 13, 18 og 21 og kromosom Y i tvillingegegraviditeter

På grund af den lave prævalens af trisomi 21, 18 og 13 i tvillingegegraviditeter forelå der kun et meget lille antal berørte tvillingeprøver til det kliniske studie. For at estimere ydeevnen af VeriSeq NIPT Solution v2 i forbindelse med tvillingegegraviditeter blev der anvendt *computersimulerede* modeller baseret på observationer fra kliniske prøver til at simulere populationer med tvillingegegraviditeter. Denne simulation var overensstemmende med den tilsigtede brugspopulation. Fordelingen af føtal fraktion blev fastlagt ud fra ca. 4.500 tvillingeprøver og sammenlignet med fordelingen fra ca. 120.000 enkeltbarnsprøver. Fordelingen af føtal fraktion betinget af aneuploidstatus blev fastlagt ud fra putative tildelinger for enkeltbarnsgraviditeter (1,044 trisomi 21, 307 trisomi 18 og 192 trisomi 13). Kombination af de to tilladte fordelinger for inferens ved detektering af aneuploidi hos tvillinger. Sæt med dizygote og monozygote tvillinger blev simuleret, og der blev udregnet et vægtet gennemsnit, som repræsenterede deres prævalens i den tilsigtede brugspopulation (2 dizygote: 1 monozygot) for at estimere sensitiviteten. Sæt af ikke-berørte tvillinger blev simuleret af hensyn til specificiteten.

Fraktionen af hver simuleret prøve, der var berørt af trisomien (dvs. den berørte fraktion), blev udregnet forskelligt for hver prøvekategori:

- For monozygote tvillinger blev den berørte fraktion af hver prøve indstillet til 1,0, fordi trisomien i denne situation berører begge tvillinger.

- ▶ For dizygote tvillinger formodedes det, at kun den ene tvilling var berørt (tilfælde, hvor begge dizygote tvillinger er berørte, er ekstremt sjældne). Værdierne for den berørte fraktion blev simuleret ved hjælp af den kendte fordeling af den føtale fraktion fastlagt ud fra kønsafhængige kliniske tvillingeprov. Der blev anvendt en konservativ tilgang, hvorved det formodedes, at den berørte tvilling altid havde den laveste føtale fraktion af de to tvillinger. Der blev anvendt en korrektionsfaktor for føtale fraktioner, som gennemsnitligt var lavere ved graviditeter med trisomi 13 og 18.

- ▶ For ikke-berørte tvillinger blev den berørte fraktion for hver prøve angivet som nul.

For tvillinger berørt af enten trisomi 18 eller 13 var den føtale fraktion, svarende til den berørte fraktion af prøven, reduceret. Reduktionen var proportionel med den gennemsnitlige reduktion i føtal fraktion, der blev observeret i kliniske data vedrørende trisomi 18 eller 13 hos enkeltbørn versus euploide enkeltbørn.

Såvel den samlede føtale fraktion som den berørte fraktion for hver simuleret prøve blev derefter anvendt til at beregne en aneuploidi-score ved hjælp af standardalgoritmen for VeriSeq NIPT Solution v2. Sensitiviteten blev beregnet ved at fastlægge, hvor ofte antallet af tilfælde af aneuploidi blandt de simulerede berørte tvillinger var over den tilsvarende grænseværdi for aneuploidi. På tilsvarende vis blev specificiteten beregnet ved at fastlægge, hvor ofte antallet af tilfælde af aneuploidi blandt de simulerede berørte tvillinger var under den tilsvarende grænseværdi for aneuploidi (Tabel 18). 95 % konfidensintervaller blev estimeret ud fra antallet af ægte kliniske tvillingeprov i det oprindelige datasæt, der blev klassificeret som enten berørt eller ikke berørt af den pågældende trisomi.

For at estimere kromosom Y-sensitiviteten i tvillingeprov blev der simuleret nogle sæt med XY/XY- og XX/XY-tvillinger. Der blev anvendt et vægtet gennemsnit, der repræsenterede prævalensen i den tilsligede brugspopulation (1 XY/XY: 1 XX/XY). For at estimere kromosom Y-specificiteten hos tvillinger blev der simuleret et sæt med XX/XX-tvillinger. De samlede føtale fraktionsværdier blev simuleret i henhold til den kendte fordeling af føtal fraktion i kliniske tvillingeprov.

For XY/XY- og XX/XY-tvillinger blev de tilsvarende kromosom Y-scorer estimeret ved brug af den kendte sammenhæng mellem føtal fraktion og kromosom Y-scorer i kliniske enkeltbørnsprøv klassificeret som hankøn. For XX/XY-tvillinger alene blev de berørte (dvs. hankøn) føtale fraktionsværdier simuleret ved hjælp af den kendte ratio for fordeling af den føtale fraktion mellem tvillinger fra samme graviditet, der er fastlagt ud fra kønsuoverensstemmende kliniske tvillingeprov. Der blev anvendt en konservativ tilgang, hvor den valgte berørte fraktion svarede til den mindste af de to tvillinger. Hvor hver simuleret XX/XY-prøve blev kromosom Y-scoren ganget med den berørte fraktion.

For XX/XX-tvillinger blev kromosom Y-scorer taget fra de scorer, der ses i kliniske enkeltbørnsprøv klassificeret som hunkøn. Kromosom Y-scoren og den samlede føtale fraktion blev så anvendt til at klassificere hver simuleret prøve som kromosom Y-positiv (tilstedeværelse af kromosom Y) eller kromosom Y-negativ (ingen tilstedeværelse af kromosom Y) ved brug af standardalgoritmen for VeriSeq NIPT Solution v2.

Sensitiviteten blev beregnet ved at fastlægge, hvor ofte de simulerede XY/XY- eller XX/XY-tvillinger blev korrekt klassificeret som kromosom Y-positive. Specificiteten blev beregnet ved at fastlægge, hvor ofte de simulerede XX/XX-tvillinger blev korrekt klassificeret som kromosom Y-negative. 95 % konfidensintervaller blev estimeret ud fra antallet af ægte kliniske tvillingeprov i det oprindelige datasæt, der blev klassificeret som enten kromosom Y-positive eller kromosom Y-negative.

Tabel 18 Estimerer for trisomi 21, 18 og 13 i simuleret population af tvillingegraviditeter

	Trisomi 21	Trisomi 18	Trisomi 13	Tilstedeværelse af Y
Sensitivitet	96,4 %	95,7 %	93,6 %	> 99,9 %
2-sidet 95 % CI	(86,4 %; 98,9 %)	(68,3 %; 99,4 %)	(64,1 %; 98,9 %)	(99,9 %; > 99,9 %)
Specificitet	99,9 %	> 99,9 %	> 99,9 %	> 99,9 %
2-sidet 95 % CI	(99,8 %; > 99,9 %)	(99,9 %; > 99,9 %)	(99,9 %; > 99,9 %)	(99,7 %; > 99,9 %)

Tabel 18 indeholder punktestimater og estimerede 95 % konfidensintervaller for sensitiviteten og specificiteten af VeriSeq NIPT Solution v2 til detektion af trisomi 21, 18 og 13 og tilstedeværelse af Y i en simuleret population af tvillingegegraviditeter i overensstemmelse med den tilsigtede brugspopulation. Konfidensintervallerne blev estimeret ud fra antallet af QC-bestående kliniske tvillingeprøver klassificeret som enten berørte eller ikke-berørte af den relevante trisomi. Ved beregningen af sensitivitet formodes det, at to tredjedele af de berørte tvillingegegraviditeter er dizygote med en tvilling berørt, mens en tredjedel af de berørte tvillingegegraviditeter er monozygote med begge tvillinger berørte.

Estimaterne angivet i **Tabel 18** vedrører udelukkende tvillingegegraviditeter. På grund af endnu lavere prævalens var der utilstrækkelige data fra graviditeter med flere fostre (trillinger eller mere) til at udarbejde passende statistiske modeller til estimation af præcisionen af aneuploididetektion.

Analytisk ydeevne

Præcision

For at vurdere og kvantificere analysepræcisionen blev dataene fra to tidligere studier med VeriSeq NIPT Solution analyseret igen ved brug af VeriSeq NIPT Solution v2-analysepipelinesoftware:

- ▶ Interlaboratorielt reproducerbarhedsstudie, der omfattede tre kørsler, der blev udført af tre operatører på tre laboratorier ved brug af et enkelt reagensparti, dvs. ni kørsler i alt.
- ▶ Et intralaboratorielt præcisionsstudie, der blev udført på et enkelt laboratorium, og som omfattede 12 kørsler ved brug af to ML STAR-instrumenter, to sekventeringsinstrumentsystemer og tre sekventeringsreagenspartier.

Formålet med præcisionsstudiet var at kvantificere analysens præcision med hensyn til trisomi 21 (T21) og kromosom Y og at estimere variabiliteten mellem forskellige instrumenter, biblioteksklargøringsæt og sekventeringsreagenspartier.

Der blev oprettet en T21-pulje med en føtal fraktion på 5 % ved at kombinere cfDNA ekstraheret fra maternelt plasma fra gravide kvinder (med et foster berørt af T21) og cfDNA ekstraheret fra plasma fra kvinder, der ikke var gravide. Der blev også oprettet en pulje med cfDNA fra moder-hankøn (XY-foster) med en føtal fraktion på 10 %. Prøvepanelet til hver kørsel i hvert studie omfattede 4 replikater af den T21-berørte prøvepulje med en føtal fraktion på 5 % og 20 replikater af cfDNA-puljen fra moder-hankøn med en føtal fraktion på 10 %. Testningen blev udført over 10 dage i form af 21 kørsler i alt i begge studier tilsammen.

Der blev valgt T21 og forekomst af kromosom Y til evalueringen på baggrund af de kliniske tilstandes repræsentativitet og anomalidetektionens kompleksitet. Kromosom 21 er det mindste humane autosom, og dets størrelse har en direkte indvirkning på T21-detektionsfølsomheden, især ved lave føtale fraktionsværdier, såsom de værdier, der blev anvendt i dette studie. Kromosom Y i maternelt plasma er udelukkende af føtal oprindelse og derfor lettere for analysen at detektere.

De observerede middel- og standardafvigelse for LLR-scoren for kromosom 21 og de kromosom Y-normaliserede kromosomale værdier (NCV) viste, at replikat-standardafvigelse (SD) var den største kilde til variabilitet. Variation mellem laboratorier, instrumenter og reagenspartier medførte ubetydelig variabilitet, hvilket kan ses ud fra forskellen mellem total-SD og replikat-SD i **Tabel 19** og **Tabel 20**.

Tabel 19 Oversigt over interlaboratorielle standardafvigelser (SD) for sekventeringsrespons (reproducerbarhed)

Respons	N	Gennemsnit	Replikat-SD	Total reproducerbarhed-SD*
LLR-score for kromosom 21	36	34,43	11,36	11,36
Kromosom Y-NCV	180	190,56	7,96	10,20

* Total inkluderer variabilitet på grund af laboratorie, operatør, kørsel, dag og replikat.

Tabel 20 Oversigt over intralaboratoriel sekventeringsresponspræcision

Respons	N	Gennemsnit	Replikat-SD	Total intralaboratoriel SD*
LLR-score for kromosom 21	48	36,01	9,07	10,25
Kromosom Y-NCV	240	198,68	7,63	7,82

* Total inkluderer variabilitet på grund af sekventeringsinstrument, reagensparti, operatør, kørsel, dag og replikat.

Der blev udført et yderligere studie for at sammenligne sekventeringspræcisionen (total standardafvigelse) med VeriSeq NIPT Solution v2 ved brug af en flowcelle i version 2.0 over for version 2.5. Studiet omfattede to typer flowceller (v2.0 og v2.5), tre partier sekventeringskit, fire instrumentsystemer og to sekventeringskørsler pr. kombination, dvs. 48 kørsler i alt på et enkelt laboratorium. En sekventeringspulje blev klargjort fra manuelt klargjorte cfDNA-plader. Prøvepanelet omfattede 4 replikater af den T21-berørte prøvepulje med en føtal fraktion på 5 % og 20 replikater af cfDNA-puljen fra moder-hankøn (XY-foster) med en føtal fraktion på 10 %. Studieresultaterne er vist i **Tabel 21** og understøtter, at der ikke er nogen forskel i sekventeringspræcisionen med flowcelle v2.0 kontra flowcelle v2.5.

Tabel 21 Oversigt over sekventeringsresponspræcision med flowcelle v2.0 kontra flowcelle v2.5

Respons	Antal observationer pr. version	Total-SD for v2.0*	Total-SD for v2.5*	Statistisk resultat**
LLR-score for kromosom 21	96	9,56	8,44	Statistisk ækvivalent (p-værdi = 0,25)
Kromosom Y-NCV	480	7,74	7,38	Statistisk ækvivalent (p-værdi = 0,38)

* Total inkluderer variabilitet på grund af sekventeringsinstrument, reagensparti, kørsel, dag og replikat.

**Baseret på F-test for varianslighed (kvadrerede standardafvigelser)

Krydskontaminering

Krydskontaminering blev vurderet under arbejdsgangen for prøveklargøring med VeriSeq NIPT Solution. Plasmapuljer fra ikke-gravide kvinder (XX) og voksne mænd (XY) blev testet i et skakbrætmønster i pladeformatet med 96 brønde på tværs af 4 plader. N = 48 for hhv. kvindelige og mandlige prøver pr. plade; i alt 192 kvindelige og 192 mandlige prøver. Ingen af de kvindelige prøver udviste kromosom Y-dækning, som var statistisk højere end den estimerede baggrund, hvilket viser, at der ikke var nogen krydskontaminering fra mandlige prøver i samme plade. Der blev ikke set nogen detekterbar krydskontaminering i VeriSeq NIPT Solution.

Potentielt interfererende stoffer

Indvirkningen af potentielt interfererende stoffer på VeriSeq NIPT Solution er blevet vurderet ved at evaluere analysens ydeevne under tilstedeværelse af sådanne stoffer.

Der blev tilført albumin, bilirubin, hæmoglobin og triglycerider (endogene) til maternelle plasmapuljer fra graviditeter med ikke-berørte hunkøn (XX-fostre). De blev testet ved to koncentrationer af hvert teststof (n = 16 for hver). Der blev ikke observeret nogen interferens på analysens ydeevne.

Tabel 22 Potentielt interfererende stoffer (endogene)

Teststof	Lav testkoncentration (mg/ml)	Høj testkoncentration (mg/ml)
Albumin	35	50
Bilirubin	0,01	0,15
Hæmoglobin	100	200
Triglycerid	1,5	5

Naturligt forekommende maternelt genomisk DNA (gDNA) i plasma kan potentielt også interferere med analysens ydeevne, da det kan blive ekstraheret sammen med det føtale cfDNA. Der blev føjet genomisk DNA i niveauer på 1,6, 3,3, og 4,9 ng pr. prøve (svarende til 1, 2 og 3 standardafvigelser over den gennemsnitlige forventede gDNA-koncentration efter 7 dages opbevaring af helblod¹²) til cfDNA, der var ekstraheret fra maternelt plasma fra graviditeter med ikke-berørte hunkøn (XX-fostre). Prøverne blev så testet i VeriSeq NIPT Solution (n=16 for hver koncentration). Der blev ikke observeret nogen interferens på analysens ydeevne ved forekomst af forhøjede niveauer af gDNA.

Tyve lægemiddelbaserede og potentielt interfererende stoffer (eksogene), som ofte bliver anvendt eller ordineret under graviditeten, blev testet pr. EP7-A2 (Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline-Second Edition). De 20 potentielt interfererende stoffer blev kombineret i fire puljer, overført til maternelt plasma fra graviditeter med ikke-berørte hunkøn (XX-fostre) og testet i VeriSeq NIPT Solution (N=16 for hver pulje). Der blev ikke observeret nogen interferens på analysens ydeevne ved forekomst af disse eksogene stoffer.

Tabel 23 Potentielt interfererende stoffer (eksogene)

Pulje 1	Pulje 2	Pulje 3	Pulje 4
Acetaminophen	Diphenhydramin	Albuterol	Cetirizin
Acetylcystein	Erythromycin	Bupropion	Dextromethorphan
Bisoprolol	Guaifenesin	Caffein	L-ascorbinsyre
Citalopram	Heparin	Sertralin	Metoprolol
Desloratadin	Lidocain	Natriumfluorid	Nadolol

Detektionsgrænse

Detektionsgrænsen (LOD) er defineret som det niveau af føtal fraktion, der svarer til 95 % sandsynlighed for at detektere en tilstand af interesse, såsom T21. Der er gennemført studier og statistiske analyser for at vurdere LOD af VeriSeq NIPT Solution v2 for diverse almindelige tilstande.

Sandsynligheden for at detektere en tilstand af interesse i en berørt prøve, der bliver behandlet af VeriSeq NIPT Solution v2, afhænger primært af tre faktorer:

- ▶ den føtale fraktion
- ▶ sekventeringsdybden
- ▶ størrelsen og kompleksiteten af det genomiske interesseområde.

Under antagelse af en konstant sekventeringsdybde er det lettere at detektere en given aberration i en prøve med en høj føtal fraktionsprocent end i en prøve med en lav føtal fraktionsprocent. Omvendt er det, under antagelse af en konstant føtal fraktion, lettere at detektere en given aberration i en prøve med en høj sekventeringsdybde end i en prøve med en lav sekventeringsdybde. Slutteligt er det, under antagelse af en konstant føtal fraktion og sekventeringsdybde, sværere at detektere aberrationer i små eller komplekse genomiske områder end i store eller mindre komplekse genomiske områder.

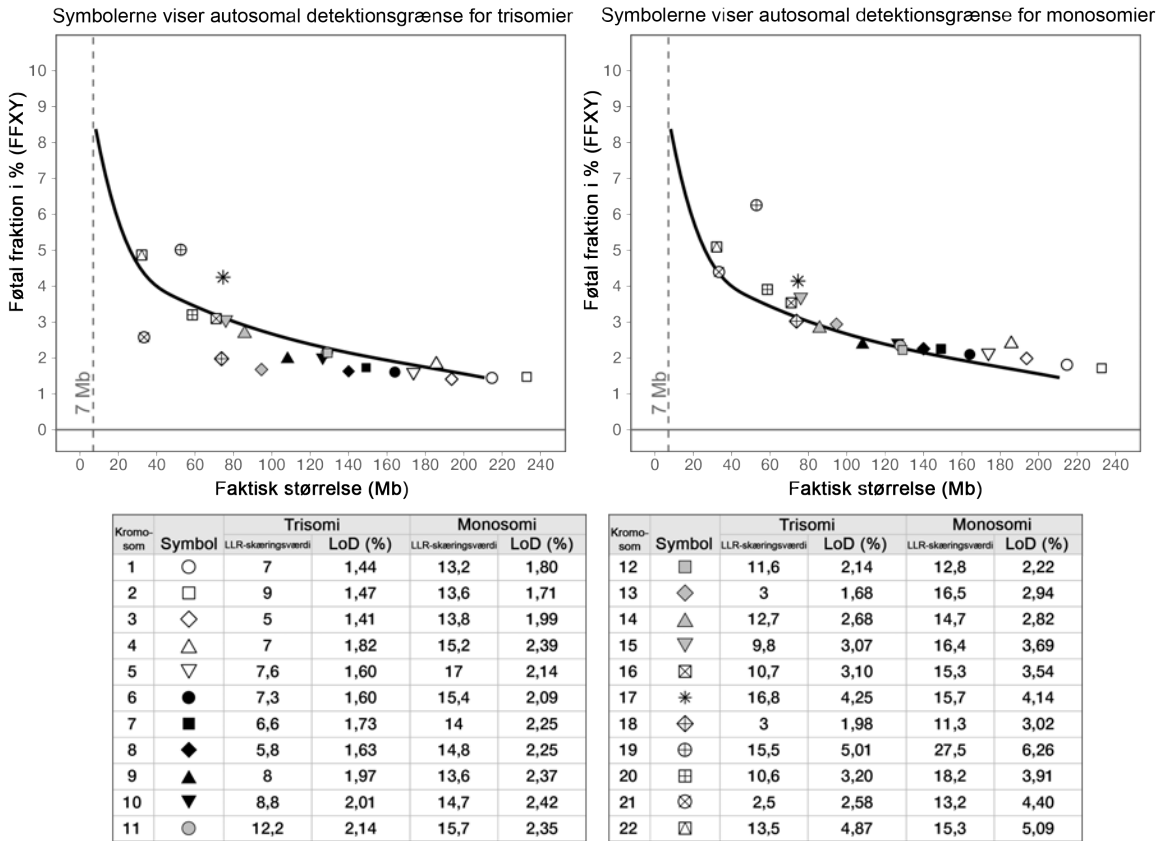
For at bestemme LOD'en for detektion af T21 blev der analyseret prøver, der bestod af blandinger af puljede T21-prøver og puljede uberørte prøver. De to analyttypen blev blandet over en titreringsserie for at oprette et sæt med syv føtale fraktionsniveauer (0, 2, 3, 4, 5, 6 og 10 %). Hvert niveau blev repræsenteret med i alt 10 replikater.

For at øge opløsningen af det føtale fraktionsgitter yderligere til LOD-analysen blev dataene fra dette studie suppleret med data fra en computersimuleret fortynding. Effekterne af eksperimentel fortynding og titrering blev simuleret ved hjælp af kontrolleret blanding af sekventeringsdata. Dataene fra denne computersimulerede titrering dækkede et sæt med 14 føtale fraktionsniveauer (1,25; 1,50; 1,75; 2,00; 2,25; 2,50; 2,75; 3,00; 3,25; 3,50; 3,75; 4,00; 4,25 og 4,50 %) med 32 replikater pr. niveau. Der blev anvendt en probit-analyse på de fremkomne data for at bestemme LOD for T21.

Uafhængigt heraf blev der udviklet en statistisk model med føtal fraktion, sekventeringsdybde og genomisk størrelse/kompleksitet for at forudsige sandsynligheden for detektion af en hvilken som helst aberration i en hvilken som helst prøve. Denne model blev lavet på baggrund af data svarende til et sæt med 1.405 XY-prøver. Den forudsagte LOD for T21 med denne model stemte overens med ovenfor nævnte probit-baserede estimat. Denne statistiske model blev anvendt til at estimere LOD-værdier for aneuploidier på alle autosomer og for partielle deletioner og duplikationer.

Figur 2 viser 95 %-detektionssandsynligheden for gennemsnitlige områder efter størrelse og de autosomale detektionsgrænser for alle trisomier og alle monosomier.

Figur 2 95 %-detektionssandsynlighed for gennemsnitlige områder efter størrelse med VeriSeq NIPT Solution v2



Fejlfinding

Fejlfinding på VeriSeq NIPT Solution v2

Fejltilstand	Muligt resultat	Fortolkning	Anbefalet handling	Kommentarer
Utilstrækkeligt input-plasma	Mislykket QC af prøve	Utilstrækkelig plasmavolumen	Udtræk igen	Baseret på visuel inspektion af plasmavolumen.
Mislykket blodrør	Ingen separation af blod i lag	Prøven er ikke blevet centrifugeret	Kontrollér, at centrifugen startede, og røret blev centrifugeret ved korrekt kraft. Udtræk prøve igen.	
		Ukorrekt opbevaring eller transport af prøve (prøvehæmolyse)	Udtræk prøve igen.	Frosne prøver vil ikke blive separeret. Ukorrekte transport- eller opbevaringsforhold kan medføre prøvehæmolyse.

Fejltilstand	Muligt resultat	Fortolkning	Anbefalet handling	Kommentarer
Prøvetilstopning/ langsomt flow	Plasmakontaminering	Individuelle prøver kan tilstoppe bindingspladen, hvis der er signifikant kontaminering i plasmaprøven	Kontrollér prøven. Hvis resterende plasma i røret er rødt eller mælkeagtigt, skal prøven annulleres, og der skal anmodes om en ny udtrækning. Test igen, hvis prøven ser normal ud.	
	Prøveoverløb	Utilstrækkelig visuel kontrol af alle rørenes velegnethed til prøven	Ugyldiggør prøver i nærliggende brønde, der bliver ramt af overløbet.	Kan være tegn på ukorrekt transport eller opbevaring af prøven inden behandlingen. Udeluk uegnede prøver fra behandlingen.
	Hardwarefejl	Utilstrækkelig optagelse af materiale i forbindelse med ekstraktion	Test prøven igen. Kontakt Illuminas tekniske support, hvis problemet i brøndplaceringen fortsætter med andre prøver.	
Mislykket QC af kvantificering	Mislykket kvantificeringskørsel – Batchmedian under minimum	Utilstrækkeligt procesudbytte	Gentag kvantificering. Kontakt Illuminas tekniske support, hvis den gentagne kvantificering også mislykkes.	Vellykkede standardkurvemålinger tyder på problemer med biblioteksklargøringen.
	Mislykket kvantificeringskørsel	Standardkurvefejl	Gentag kvantificering. Kontakt Illuminas tekniske support, hvis den gentagne kvantificering også mislykkes.	Almindelige årsager til standardkurvefejl omfatter utilstrækkeligt optøede kvantificeringsreagenser, inkonsistente volumener i brønde på grund af spild og nedbrydning af DNA-kvantificeringsreagens (for eksempel på grund af udsættelse for lys).
Mislykket puljeoprettelse	Puljeoprettelsen kunne ikke gennemføres	Puljeoprettelsesanalysen kan ikke beregne korrekte puljevolumener	Revurder puljens målkonzentration, og kør puljeanalysen igen.	Kan forekomme, hvis alle prøver i et batch har lave kvantificeringsværdier, og puljekonzentrationen er indstillet til at være høj (som regel over 3 til 5 pm).

Fejltilstand	Muligt resultat	Fortolkning	Anbefalet handling	Kommentarer
Mislykket QC af individuel prøveanalyse	Mislykket QC af sekventering	Utilstrækkeligt genetisk input ELLER forkert overførsel i forbindelse med prøvehåndtering ELLER sekventeringsreaktions-fejl	Se prøvekommentarer. Se, om der har været lignende resultater i forbindelse med tidligere prøver i den pågældende pladeposition. Test prøven igen.	Er enten tegn på dårligt prøveinput eller forkert overførsel på ML STAR. Utilstrækkeligt genetisk materiale kan skyldes utilstrækkeligt cellefrit DNA i plasma eller cellebaseret DNA, hvilket resulterer i overfortynding af sekventeringsprøven.
	Lav FF eller NES-tælling (Non-Excluded Sites)	Der er ikke genereret tilstrækkelige data til at lave en præcis rapportering	Test igen fra plasma.	

Fejlfinding på VeriSeq NIPT Microlab STAR

Procestrin	Fejlkode	Fejlbesked	Beskrivelse	Brugerløsning
Batchoprettelse	EM0044	The Batch ID entered contains forbidden characters. (Det indtastede batch-ID indeholder forbudte tegn).	VeriSeq NIP Solution v2 tillader kun tal, bogstaver, understregningstegn og bindestreger i alle datafelter.	Omdøb batchen til et navn, der ikke indeholder nogen specialtegn.
Batchoprettelse	EM0051	The Batch ID is greater than 26 characters in length. (Batch-ID'et indeholder mere end 26 tegn).	VeriSeq NIPT Solution v2 begrænser længden af batchnavne til 26 tegn eller derunder.	Omdøb batchen til et navn, der indeholder færre end 26 tegn.
Batchoprettelse	EM0076	Unable to connect to VeriSeq Onsite Server v2 (Der kunne ikke oprettes forbindelse til VeriSeq Onsite Server v2)	VeriSeq Onsite Server v2 responderer ikke på dataanmodninger fra Workflow Manager.	Kontrollér, at: 1. ML STAR er forbundet til netværket. 2. VeriSeq Onsite Server v2 er tændt. 3. ML STAR kan forbinde til VeriSeq Onsite Server v2 (via ping-anmodning). 4. Send en e-mail til Illuminas tekniske support, hvis ovennævnte trin ikke løser problemet. 5. Kontrollér, om vakuumaffaldsbeholderen er mere end halvt fyldt. I så fald skal den tømmes.
Batchoprettelse	EM0118	This batch has been failed and cannot be further processed. (Batchen er blevet ugyldiggjort og kan ikke viderebehandles).	Den angivne batch er allerede blevet ugyldiggjort og kan ikke viderebehandles.	Batchregistret på VeriSeq Onsite Server v2 viser, at den valgte batch er blevet ugyldiggjort. Viderebehandling er ikke tilladt. Opret en anden batch med de ønskede prøver.

Procestrin	Fejlkode	Fejlbesked	Beskrivelse	Brugerløsning
Batchoprettelse	I/T	This batch has already completed processing. Would you like to repool? (Denne batch er allerede færdigbehandlet. Skal der oprettes en ny pool?)	Den angivne batch er blevet bearbejdet på puljeoprettelsestrinnet. Den eneste tilladte behandling er oprettelse af en ny pulje.	Vælg Re-Pool (Opret ny pulje) for at oprette en ny pulje. ELLER Afbryd metoden, og dobbelttjek batchnavnet.
Plasmaisolering	WP0087	Duplicate sample barcodes loaded. (Der er overført prøver med allerede anvendte strekkoder.)	Der er overført prøver med identiske strekkoder til systemet.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Følg beskederne i Workflow Manager for at identificere hvilke prøver, der har strekkoder, der allerede er blevet anvendt. 2. Fjern disse prøver, og giv dem nye strekkoder eller erstat dem. 3. Overfør prøverne påny.
Plasmaisolering	EP0102	Samples specified in the Sample Sheet were not loaded. (Manglende overførsel af prøver på prøvearket).	Der er prøver på prøvearket, som ikke er inkluderet i de overførte strekkoder.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Følg beskederne i Workflow Manager for at identificere de manglende prøver. 2. Tilføj de manglende prøver til batchen, og overfør prøverne igen ELLER Afbryd metoden, rediger prøvearket efter behov, genstart metoden.
Pladeoverførsel	I/T	Venus Barcode Mask Error (Venus-strekkodemaskfejl)	Workflow Manager gennemtvinger korrekt plade-til-batch-association ved brug af Venus-strekkodemasker.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Kontrollér pladens placering for at sikre, at plade-layoutet er korrekt. 2. Kontrollér, at den overførte plade er den korrekte plade til den angivne batch.
cfDNA-ekstraktion	WE0150	Pressure in the vacuum chamber is too low. (Trykket i vakuumkammeret er for lavt.)	Workflow Manager fortsætter ikke, hvis det hvilende tryk i vakuumledningen er < 400 torr.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Kontrollér vakuumledningen for bøjninger eller anden blokering. 2. Åbn affaldsledningens frigøringsclips, så trykket frigøres, luk frigøringsclipsen helt til. 3. Kontrollér, at vakuumkontrolenheden og pumpen er tændt. 4. Kontakt Illuminas tekniske support, hvis problemet fortsætter.
	WE0153	Pressure in the vacuum chamber is too high. (Trykket i vakuumkammeret er for højt)	Hvis det målte vakuumtryk er for højt, inden trykkontrollen starter, kan systemet være fejlbehæftet.	Kontrollér, at alle vakuumforbindelser og ledninger er på plads på bagsiden af kontrolenheden.

Procestrin	Fejlkode	Fejlbesked	Beskrivelse	Brugerløsning
cfDNA-ekstraktion	WE0996	Vacuum failed to seal. (Vakuumforsegling mislykkedes).	Systemet skaber ikke vakuumforsegling på bindingspladen.	<p>BENMÆRK! Vælg ikke OK, før forseglingsfejlen er helt rettet.</p> <ol style="list-style-type: none"> Kontrollér, at bindingspladen er ret mod vakuum-fordelingsstykket. Tryk kraftigt ned på bindingspladen med en handskeklædt hånd. Vælg OK for at fortsætte med cfDNA-ekstraktion. Send en e-mail til Illuminas tekniske support, hvis denne fejlbesked bliver vist mere end tre gange i løbet af en kørsel.
	WM0219	If Vacuum is on, manually rest the pump. (Deaktiver pumpen manuelt, hvis vakuum er tændt).	Vakuummet kan fortsætte med at være tændt efter en metodeafbrydelse i løbet af ekstraktionen.	<ol style="list-style-type: none"> Tryk på tænd-/slukknappen på vakuum-kontrolenheden for at slukke vakuummet. Vent 10 sekunder, og tryk så på tænd-/slukknappen igen for at tænde for vakuummet.
	EE0477	An error has occurred while moving a plate. (iSWAP error) (Der opstod en fejl i forbindelse med flytning af en plade (iSWAP-fejl))	Hvis der opstår en iSWAP-fejl (tab af plade, manglende opsamling osv.) giver systemet brugeren besked om, at færdiggøre flytningen af pladen manuelt.	<p>Kontrollér, at pladen kan anvendes igen (intet materialespild).</p> <ul style="list-style-type: none"> – I modsat fald skal kørslen afbrydes. – I så fald skal de anviste vejledninger følges for at færdiggøre overførslen af pladen.
	EE0519	Scanned barcode does not match binding plate barcode on record. (Den scannede strekkode stemmer ikke overens med bindingspladens strekkode i registret.)	Den overførte bindingsplade stemmer ikke overens med strekkoden på den fjernede plade.	Kontrollér, at den plade, der overføres, stemmer overens med den registrerede strekkode (se den forventede strekkode i sporingslogfilen).

Procestrin	Fejlkode	Fejlbesked	Beskrivelse	Brugerløsning
API	EA0372	Unable to connect to the data server. (Der kunne ikke oprettes forbindelse til dataserveren.)	VeriSeq Onsite Server v2 responderer ikke på dataanmodninger fra Workflow Manager.	Kontrollér, at: 1. ML STAR er forbundet til netværket. 2. ML STAR kan forbinde til VeriSeq Onsite Server v2 (via ping-anmodning). 3. VeriSeq Onsite Server v2 er tændt.
	EA0774	Connection Error The API server connection failed to validate. (Forbindelsesfejl. Forbindelsen til API-serveren kunne ikke bekræftes.)	VeriSeq Onsite Server v2 er stoppet med at respondere på dataanmodninger fra Workflow Manager.	Kontrollér, at: 1. ML STAR er forbundet til netværket. 2. ML STAR kan forbinde til VeriSeq Onsite Server v2 (via ping-anmodning). 3. VeriSeq Onsite Server v2 er tændt.
	EA0780	403: Invalid Request The current transaction is not valid. (403: Ugyldig anmodning Den aktuelle transaktion er ikke gyldig.)	De sendte data overholder ikke systemets arbejdsproceslogik.	Se yderligere information i fejloplysningerne. Årsagen er ofte, at inputtet er for langt eller ikke overholder de gyldige tegn.

Referencer

- 1 Nagaoka S, Hassold T, Hunt P. Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nat Rev Genet.* 2012;13(7):493-504. doi:10.1038/nrg3245.
- 2 Garnder RJ, Sutherland GR, Schaffer LG. *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling.* 4th edition. New York (NY): Oxford University Press; 2012.
- 3 Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, Ogilvie C, D'Antonio F. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015 Jan;45(1):16-26. doi: 10.1002/uog.14636.
- 4 American College of Obstetricians and Gynecologists. Screening for fetal aneuploidy. Practice Bulletin No. 163. *Obstet Gynecol.* 2016; 127(5):e123-137.
- 5 Gil MM, Accurti V, Santacruz B, Plana MN, Nicolaidis KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2017 Apr 11. doi: 10.1002/uog.17484.
- 6 Bianchi D, Parker R, Wentworth J et al. DNA Sequencing versus Standard Prenatal Aneuploidy Screening. *N Engl J Med.* 2014;370(9):799-808. doi:10.1056/nejmoa1311037.
- 7 Benn P, Borrell A, Chiu RW, et al. "Position statement from the Chromosome Abnormality Screening Committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis." *Prenat Diagn* 35 (2015): 725-34.
- 8 Gregg AR, Skotko BG, Benkendorf JL, et al. Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med.* 2016; doi:10.1038/gim.2016.97.
- 9 Dondorp W, de Wert G, Bombard Y, et al. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy and beyond: challenges of responsible innovation in prenatal screening. *Eur J Hum Genet.* 2015 Nov;23(11):1438-50.
- 10 Grati, et al. "Fetoplacental mosaicism: potential implications for false-positive and false-negative noninvasive prenatal screening results." *Genetics in Medicine* 16 (2014): 620-624.
- 11 Wellesley, et al. "Rare chromosome abnormalities, prevalence and prenatal diagnosis rates from population-based congenital anomaly registers in Europe." *European Journal of Human Genetics* 20 (2012): 521-526.
- 12 Norton S, Lechner J, Williams T, Fernando M et al. A Stabilizing Reagent Prevents Cell-free DNA Contamination by Cellular DNA in Plasma During Blood Sample Storage and Shipping as Determined by Digital PCR. *Clin. Biochem.* 2013;46: 1561-1565. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2013.06.002.
- 13 Bianchi D W, et al. "Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing." *Obstet Gynecol* 119 (2012): 890-901.
- 14 Ehrich M, et al. "Genome-wide cfDNA screening: clinical laboratory experience with the first 10,000 cases." *Genet Med* 19 (2017): 1332-1337.
- 15 Fiorentino F, et al. "The clinical utility of genome-wide cfDNA screening." *Prenat Diagn* 37 (2017): 593-601.
- 16 Pertile, MD, et al. "Rare autosomal trisomies, revealed by maternal plasma DNA sequencing, suggest increased risk of feto-placental disease." *Sci Transl Med* 9 (2017): eaan1240.

Revisionshistorik

Dokument	Dato	Beskrivelse af ændring
Dokumentnr. 100000078751 v06	August 2021	Opdateret adresse for EU-godkendt repræsentant.
Dokumentnr. 100000078751 v05	December 2020	<ul style="list-style-type: none"> • Opdatering af afsnittene Procedureprincipper, Advarsler og forsigtighedsregler og Produktmærkning i form af yderligere præciseringer med henblik på overholdelse af myndighedskrav. • Mindre opdateringer af indholdet i protokollen for at tilpasse det til Illuminas aktuelle stil og organisation. • Rettelse af beskrivelsen af kromosom 21 fra "næstmindste humane autosom" til "mindste humane autosom" i underafsnittet Præcision under Analytisk Ydeevne. • Tilføjelse af forsigtighedsanvisninger for at adressere ukorrekt brug af reservoirer og risikoen for prøvesammenblanding i underafsnittet Klargøring under Plasmaisolering og i afsnittet Tolkning af resultater. • Tilføjelse af nye server- og softwareidentifikationsnumre i forbindelse med udgivelse af ny servermodel og ajourføring af softwareidentifikationsnumre. • Tilføjelse af forsigtighedsregler i protokollen og i fejlfindingsafsnittet for at adressere og undgå prøveoverløb. • Opdatering af aktive stoffer i reagenset DNA Quantification Standard i Accessory Box i henhold til sikkerhedsdatabladet. • Opdatering af navngivningskonventionen for Local Run Manager VeriSeq NIPT-modulet med henblik på konsistens i forhold til øvrig dokumentation. • Tilføjelse af revisionshistorik.
Dokumentnr. 100000078751 v04	Oktober 2020	<ul style="list-style-type: none"> • Mindre rettelser.
Dokumentnr. 100000078751 v03	September 2020	<ul style="list-style-type: none"> • Opdatering af materialeliste i form af specifikationer for labware og kompatibelt ekstraudstyr.
Dokumentnr. 100000078751 v02	Februar 2020	<ul style="list-style-type: none"> • Opdatering af opstillingen af oplysninger i afsnittet Klinisk ydeevne med henblik på at tydeliggøre forskellene mellem basisscreening og genomdækkende screening. • Tilføjelse af et nyt afsnit med titlen Forskelle i ydeevnen mellem basisscreeningen og den genomdækkende screening. • Sletning af modstridende oplysninger om frivilligheden af den supplerende rapport i afsnittet Procedureprincipper. • Opdatering af navngivningskonventionen for softwaren VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 igennem hele dokumentet med henblik på stilistisk konsistens. • Opdatering af adresseoplysninger for Australien og Illumina Netherlands for at afspejle nylige ændringer.
Dokumentnr. 100000078751 v01	August 2019	Sletning af gentagelse af trin under cfDNA-ekstraktion som følge af publiceringssoftwarefejlf.
Dokumentnr. 100000078751 v00	Maj 2019	Oprindelig udgivelse.

Patenter og varemærker

Dette dokument og dets indhold er ophavsretligt beskyttet af Illumina, Inc. og dets datterselskaber ("Illumina") og er udelukkende beregnet til kundens kontraktmæssige brug i forbindelse med anvendelsen af det produkt eller de produkter, som er beskrevet heri, og til intet andet formål. Dette dokument og dets indhold må ikke bruges eller distribueres til noget andet formål og/eller på anden måde kommunikeres, offentliggøres eller reproduceres på nogen som helst måde uden forudgående skriftligt samtykke fra Illumina. Med dette dokument udsteder Illumina ingen licens under sit patent, varemærke, sin copyright eller sædvaneret eller lignende rettigheder for nogen tredjeparter.

Instruktionerne i dette dokument skal følges nøje og fuldstændigt af kvalificerede og behørigt uddannede medarbejdere for at sikre, at det produkt eller de produkter, der er beskrevet heri, anvendes korrekt og sikkert. Alt indhold i dette dokument skal læses grundigt og forstås inden brug af produktet/produkterne.

HVIS ALLE INSTRUKTIONERNE HERI IKKE GENNEMLÆSES FULDT UD OG FØLGES NØJE, KAN DET MEDFØRE SKADE PÅ PRODUKTET ELLER PRODUKTERNE, SKADE PÅ PERSONER, HERUNDER BRUGERE ELLER ANDRE, OG SKADE PÅ ANDEN EJENDOM OG VIL GØRE ENHVER GARANTI GÆLDENDE FOR PRODUKTET ELLER PRODUKTERNE UGYLDIG.

ILLUMINA PÅTAGER SIG INTET ANSVAR SOM FØLGE AF FORKERT BRUG AF DET PRODUKT ELLER DE PRODUKTER, DER ER BESKREVET HERI (HERUNDER DELE HERAF ELLER SOFTWARE).

© 2021 Illumina, Inc. Alle rettigheder forbeholdes.

Alle varemærker tilhører Illumina, Inc. eller de respektive ejere. Specifikke varemærkeoplysninger er tilgængelige på www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktoplysninger



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, California 92122 U.S.A.

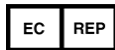
+1.800.809.ILMN (4566)

+1.858.202.4566 (uden for Nordamerika)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com

CE
2797



Illumina Netherlands B.V.
Steenoven 19
5626 DK Eindhoven
The Netherlands

Australsk sponsor

Illumina Australia Pty Ltd
Nursing Association Building
Level 3, 535 Elizabeth Street
Melbourne, VIC 3000
Australien

Produktmærkning

Du kan finde en fyldestgørende forklaring til de symboler, der kan fremgå af produktemballagen og -mærkningen, i symbolforklaringen til det pågældende kit på support.illumina.com.

Efter lanceringen af Eudamed (European Database on Medical Devices) er der et resumé af sikkerheden og ydeevnen (Summary of Safety and Performance – SSP) på <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>, hvor det er knyttet til Basic UDI-DI (0081627002NIPTRP).