

Bijsluiter van VeriSeq NIPT Solution v2

BESTEMD VOOR IN-VITRODIAGNOSTIEK

Beoogd gebruik

De VeriSeq NIPT Solution v2 is een in-vitrodiagnostische test bedoeld voor gebruik als screeningstest voor de detectie van genoombrede foetale genetische anomalieën uit monsters van perifeer volbloed van vrouwen die ten minste 10 weken zwanger zijn. VeriSeq NIPT Solution v2 detecteert met behulp sequencing van het hele genoom partiële deleties en duplicaties voor alle autosomen en de aneuploidie-status voor alle chromosomen. Met de test is het mogelijk om aneuploidie van geslachtschromosomen (SCA) vast te stellen. Dit product mag niet worden gebruikt als enige basis voor diagnostiek of andere beslissingen met betrekking tot de zwangerschapsbegeleiding.

De VeriSeq NIPT Solution v2 omvat: de VeriSeq NIPT-workflowmanager v2 voor de VeriSeq NIPT Microlab STAR, de VeriSeq NIPT-monstervoorbereidingskits en de on-site server VeriSeq v2 met de VeriSeq NIPT-assaysoftware v2. De VeriSeq NIPT Solution v2 is bedoeld voor gebruik met next-generation sequencer.

Samenvatting en uitleg van de assay

Foetale chromosomale afwijkingen, met name aneuploidie wat een afwijkend aantal chromosomen is, zijn een veelvoorkomende oorzaak van onvruchtbaarheid, congenitale afwijkingen, vertraagde ontwikkeling en verstandelijke beperkingen. Aneuploidie treft ongeveer 1 op de 300 levendgeborenen, met een veel hoger aantal dat in verband wordt gebracht met miskramen en doodgeborenen.^{1,2} Tot voor kort waren er twee soorten prenatale tests voor deze aandoeningen: een diagnostische test of een screening. Diagnostische tests zijn invasieve procedures, zoals amniocentese of chorionvillusbiopsie. Deze testmethoden worden beschouwd als de gouden standaard voor de detectie van foetale aneuploidie. Ze gaan echter gepaard met een risico op miskraam tussen 0,11% en 0,22%.³ Conventionele screenings voor meerdere markers hebben geen risico op een miskraam, omdat het om niet-invasief onderzoek gaat, maar ze zijn minder nauwkeurig dan diagnostische tests. De detectiepercentages voor trisomie 21 variëren tussen 69–96%, afhankelijk van de betreffende screening, leeftijd van de moeder en de zwangerschapsduur op het moment van de test.⁴ Nog belangrijker is dat ze een fout-positiefpercentage hebben van ongeveer 5%, hetgeen kan leiden tot invasieve diagnostische tests ter bevestiging en daarmee samenhangend het risico op een proceduregerelateerde miskraam.⁴ Echografisch onderzoek kan ook chromosoomafwijkingen opsporen, maar met nog minder zekerheid dan deze andere methoden.

Foetale aneuploidie voor chromosomen 21, 18, 13, X en Y kan met een hoge mate van nauwkeurigheid worden gedetecteerd door een niet-invasieve prenatale test (NIPT) uit te voeren met behulp van volledig genoomsequencing van celvrij DNA (cfDNA), verkregen uit maternaal plasma bij een zwangerschapsduur van 10 weken of langer. Op basis van een recente meta-analyse van meerdere klinische onderzoeken werden de volgende gewogen gepoolde detectiepercentages en specificiteiten voor trisomie 21 en trisomie 18 in enkelvoudige zwangerschappen gemeld: trisomie 21 respectievelijk 99,7% en 99,96% en trisomie 18 respectievelijk 97,9% en 99,96%.⁵ Uit de resultaten van één onderzoek blijkt dat het gebruik van NIPT als primaire screening voor alle zwangerschappen zou kunnen resulteren in een afname van 89% van het aantal bevestigende invasieve procedures.⁶

Gezien de significante afname in fout-positiefpercentages met NIPT, vergeleken met de conventionele screening voor meerdere markers, hebben talrijke professionele medische organisaties positief gereageerd op verschillende indicaties voor het gebruik van NIPT.

Met name de International Society for Prenatal Diagnosis, het American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) / Society for Maternal Fetal Medicine (SMFM), het American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) en de European Society of Human Genetics/American Society of Human Genetics staan

positief tegenover het aanbieden van NIPT aan alle zwangere vrouwen.^{7,8,9} Een adviesgesprek voorafgaand aan de test, geïnformeerde toestemming en een diagnostische test ter bevestiging van een positief cfDNA-screeningsresultaat worden aangeraden.⁴

De VeriSeq NIPT Solution v2 is een niet-invasieve in-vitrodiagnostische (IVD) test die gebruikmaakt van volledig genoom-sequencing van cfDNA-fragmenten die zijn verkregen uit maternaal perifeer volbloedmonsters van zwangere vrouwen met een zwangerschapsduur van ten minste 10 weken. De test biedt twee opties voor soorten screening: basis en genoombreed. De basisscreening geeft alleen informatie over de aneuploidie-status van de chromosomen 21, 18, 13, X en Y. Genoombrede-screeningen geven informatie over partiële duplicaties en deleties voor alle autosomen en de aneuploidie-status van alle chromosomen. Beide screeningtypes bieden de optie van rapportage van aneuploidie van geslachtschromosomen (SCA), al dan niet inclusief het geslacht van de foetus. De rapportageoptie voor SCA kan worden uitgeschakeld. Als de rapportageoptie voor SCA is uitgeschakeld, wordt het geslacht van de foetus niet vermeld. Raadpleeg voor meer informatie over de geslachtsrapportageopties de *VeriSeq NIPT Solution v2-softwarehandleiding (documentnr. 100000067940)*.

Principes van de procedure

De VeriSeq NIPT Solution v2 is een geautomatiseerde oplossing voor NIPT-laboratoriumtests die bestaat uit geautomatiseerde monstervoorbereiding en analyse van sequencinggegevens. De VeriSeq NIPT-monstervoorbereidingskits zijn gespecialiseerde reagentia voor eenmalig gebruik die worden gebruikt in combinatie met de VeriSeq NIPT Microlab STAR om batches van 24, 48 of 96 monsters te prepareren voor next-generation sequencing. Paired-end sequencinggegevens van het volledige genoom worden geanalyseerd door specialistische software, de VeriSeq NIPT-assaysoftware v2, en er wordt een rapport gegenereerd van de kwalitatieve resultaten.

De workflow bestaat uit de volgende procedures: monsterafname, plasma-isolatie, cfDNA-extractie, bibliotheekvoorbereiding, bibliotheekkwantificering, bibliotheekpooling, sequencing en analyse, die hieronder nader worden beschreven:

- ▶ **Monsterafname**—Er wordt 7–10 ml maternaal perifeer volbloed afgenomen in een Streck celvrij DNA-bloedafnamebuisje (Blood Collection Tube, BCT) dat cellysis en genoomverontreiniging voorkomt en volbloed stabiliseert.
- ▶ **Plasma-isolatie**—Plasma wordt binnen 5 dagen na afname geïsoleerd uit maternaal perifeer volbloed met behulp van standaard centrifugetechnieken. De VeriSeq NIPT Microlab STAR aspireert en verdeelt plasma in een plaat met 96 diepe monsterputjes voor verdere verwerking. Als opnieuw testen nodig is, kunnen monsters na verwerking opnieuw van een dop worden voorzien en nog eens vijf dagen (tot in totaal tien dagen na de bloedafname) bij 4 °C worden bewaard.



LET OP

Langere opslagtijden dan de hier bovengenoemde kan ertoe leiden dat de analyse van individuele monsters vaker mislukt.

- ▶ **cfDNA-extractie**—Zuivering van cfDNA uit plasma wordt bereikt door absorptie op een bindingsplaat, wassen van de bindingsplaat om verontreinigingen te verwijderen en elutie.
- ▶ **Bibliotheekvoorbereiding**—De gezuiverde cfDNA-fragmenten ondergaan een uiteindereparatieproces om de 5'- en 3' overhangende uiteinden stomp te maken. Vervolgens wordt een deoxyadenosinenucleotide aan de 3'-uiteinden toegevoegd om een enkelvoudig overhangend base-uiteinde te maken. Geïndexeerde adapters met een enkelvoudig 3' deoxythymidine overhangend base-uiteinde worden daarna geligeerd op de verwerkte cfDNA-fragmenten. Het geligeerde DNA wordt gezuiverd met behulp van vaste fase, omgekeerde immobilisatieparels. Elk monster in een set van 24, 48 of 96 krijgt een unieke, geïndexeerde adapter. De adapters hebben 2 functies:
 - ▶ De indexen zorgen voor monsteridentificatie in latere sequencing.
 - ▶ Indexadapters bevatten sequenties voor bibliotheekopname op het vaste oppervlak van een sequencingstroomcel voor de vorming van clusters en latere sequencing.

- ▶ **Kwantificering**— Het bibliotheekproduct wordt gekwantificeerd met behulp van een fluorescente kleurstof met een concentratie die wordt bepaald aan de hand van een vergelijking met een DNA-standaardcurve.
- ▶ **Bibliotheekpooling en sequencing**— De monsterbibliotheken worden gepoold in pools van 24 of 48 monsters in aangepaste hoeveelheden voor minimale variatie in dekking. Elke pool wordt dan gesequenced met een next-generation sequencer.
- ▶ De VeriSeq NIPT Solution v2 omvat geen sequencingapparatuur en verbruiksartikelen.
- ▶ **Analyse**— De analyse voor elk monster bestaat uit het volgende:
 - ▶ Identificatie van bibliotheekfragmenten aan de hand van de indexsequentie en uitlijning van de paired-end aflezings met een humaan referentiegenoom.
 - ▶ Schatting van de foetale fractie van de bibliotheek door combinatie van informatie uit de verdeling van de lengtes en de genomcoördinaten van de bibliotheekfragmenten.
 - ▶ Na correctie voor bekende vertekeningen detecteert een statistisch model regio's van het genoom die in de bibliotheek op zodanige wijze onder- of oververtegenwoordigd zijn dat dit consistent is met een anomalie bij het geschatte foetale-fractiepercentage.
 - ▶ Het NIPT-rapport geeft een overzicht van de resultaten voor het geselecteerde testmenu met vermelding van ANOMALY DETECTED (anomalie gedetecteerd) of NO ANOMALY DETECTED (geen anomalie gedetecteerd), samen met een schatting van de foetale fractie voor monsters die de QC met succes hebben doorlopen.
 - ▶ Het aanvullend rapport vermeldt voor elke gedetecteerde anomalie de kenmerkende kwantitatieve metriecken.

Beperkingen van de procedure

- ▶ De VeriSeq NIPT Solution v2 is een screeningstest en mag niet op zichzelf staand zonder andere klinische bevinden en testresultaten worden beschouwd. Conclusies over de foetale aandoening en beslissingen met betrekking tot de zwangerschapsbegeleiding mogen niet uitsluitend zijn gebaseerd op de resultaten van de NIPT-screening.⁷
- ▶ De VeriSeq NIPT Solution v2 rapporteert het volgende:
 - ▶ De basisscreening test op de oververtegenwoordiging van chromosomen 13, 18 en 21.
 - ▶ De genoombrede screening test op onder- en oververtegenwoordiging van alle autosomen, inclusief partiële deleties en duplicaties van ten minste 7 Mb.
 - ▶ Bij enkelvoudige zwangerschappen, waarbij als optie voor geslachtsrapportage Yes (ja) of SCA is geselecteerd, de volgende geslachtschromosoomanomalieën: XO, XXX, XXY en XYY.
 - ▶ Bij enkelvoudige zwangerschappen, waarbij als optie voor geslachtsrapportage Yes (ja) is geselecteerd, wordt het geslacht van de foetus gerapporteerd.
 - ▶ De aanwezigheid van een Y-chromosoom bij tweelingzwangerschappen.
- ▶ Bewijsmateriaal ter onderbouwing van de gevoeligheid en specificiteit van de test beslaat enkelvoudige en tweelingzwangerschappen. Deze gebruiksinstructies bieden geen gevoeligheids- of specificiteitsgegevens voor zwangerschappen met drie of meer baby's.
- ▶ De VeriSeq NIPT Solution v2 is niet bedoeld voor het detecteren van polyploidie, zoals triploidie.
- ▶ De VeriSeq NIPT Solution v2 is niet bedoeld voor het detecteren van gebalanceerde chromosoomherschikkingen.
- ▶ Voor de assay zijn matemale perifere volbloedmonsters nodig van vrouwen die ten minste 10 weken zwanger zijn.
- ▶ Voor basisscreeningen kijkt de VeriSeq NIPT Solution v2-test naar specifieke chromosoomafwijkingen. Resultaten die worden gemeld als NO ANOMALY DETECTED (geen anomalie gedetecteerd) sluiten de mogelijkheid van chromosomale afwijkingen van de geteste chromosomen niet uit. Een negatief resultaat sluit niet de mogelijkheid uit dat de zwangerschap andere chromosomale afwijkingen, genetische aandoeningen of aangeboren afwijkingen (zoals open neurale buis-defecten) heeft.

- ▶ Voor genoombrede screenings kunnen grote deleties en duplicaties die minder dan 75% van het chromosoom uitmaken daarom een aanwijzing zijn voor een aneuploidie van het gehele chromosoom.
- ▶ Voor genoombrede screenings worden bepaalde regio's uitgesloten van de analyse. Een lijst van dergelijke uitgesloten regio's is beschikbaar op de Illumina Support-website. Alleen niet-uitgesloten regio's worden onderzocht op de aanwezigheid van genoomanomalieën.
- ▶ Rapportage over het geslacht van de foetus is niet in alle regio's beschikbaar vanwege lokale regelgeving inzake geslachtsrapportage.
- ▶ De resultaten van de test kunnen worden beïnvloed door bepaalde maternale en foetale factoren, inclusief maar niet beperkt tot:
 - ▶ een recente maternale bloedtransfusie;
 - ▶ een maternale orgaantransplantatie;
 - ▶ een maternale operatie;
 - ▶ maternale immunotherapie of stamcelbehandeling;
 - ▶ maternale maligniteit;
 - ▶ matemaal mosaïcisme;
 - ▶ foetoplacentaal mosaïcisme;
 - ▶ overlijden van de foetus;
 - ▶ niet-levensvatbare tweeling.

Productonderdelen

De VeriSeq NIPT Solution v2 (onderdeelnr. 20030577) bestaat uit de volgende monstervoorbereidingskits:

- ▶ VeriSeq NIPT-monstervoorbereidingskit (24 monsters) (onderdeelnr. 20025895)
- ▶ VeriSeq NIPT-monstervoorbereidingskit (48 monsters) (onderdeelnr. 15066801)
- ▶ VeriSeq NIPT-monstervoorbereidingskit (96 monsters) (onderdeelnr. 15066802)

De VeriSeq NIPT Solution v2 (onderdeelnr. 20030577) bestaat uit de volgende softwareonderdelen:

- ▶ VeriSeq NIPT Assay Software v2 (onderdeelnr. 20047024), voorgeïnstalleerd op de on-site server VeriSeq v2
 - ▶ on-site server VeriSeq v2 (onderdeelnr. 20028403 of 20047000) of een bestaande on-site server VeriSeq (onderdeelnr. 15076164 of 20016240) die is geüpgraded tot v2
- ▶ VeriSeq NIPT-workflowmanager v2 (onderdeelnr. 20044988), voorgeïnstalleerd op de VeriSeq NIPT Microlab STAR
 - ▶ VeriSeq NIPT Microlab STAR (onderdeelnr. Hamilton Company Reno: 95475-01 (115 V) & 95475-02 (230 V), Hamilton Company Bonaduz: 806288)
- ▶ Local Run Manager VeriSeq NIPT-module (onderdeelnr. 20044989)

Reagentia

Meegeleverde reagentia

Illumina heeft de volgende reagentia meegeleverd: VeriSeq NIPT-monstervoorbereidingskit (24 monsters) (onderdeelnr. 20025895), VeriSeq NIPT-monstervoorbereidingskit (48 monsters) (onderdeelnr. 15066801) en VeriSeq NIPT-monstervoorbereidingskit (96 monsters) (onderdeelnr. 15066802). De VeriSeq NIPT-monstervoorbereidingskits zijn geconfigureerd voor gebruik met de ML STAR (onderdeelnr. 95475-01, 95475-02 of 806288), die wordt geleverd door de Hamilton Company.

VeriSeq NIPT-monstervoorbereiding, extractiedoos

Tabel 1 VeriSeq NIPT-extractiedoos (24) en (48), onderdeelnr. 20025869 en 15066803

Naam reagens op label	Aantal containers in kit	Werkzame bestanddelen	Opslag
Lysisbuffer	1	Guanidinehydrochloride in gebufferde waterige oplossing	15 °C tot 30 °C
Wasbuffer I	1	Guanidinehydrochloride en 2-propanol in gebufferde waterige oplossing	15 °C tot 30 °C
Wasbuffer II	1	Gebufferde waterige oplossing met zouten	15 °C tot 30 °C
Elutiebuffer	1	Gebufferde waterige oplossing	15 °C tot 30 °C
Proteïnasebuffer	1	Glycerol in gebufferde waterige oplossing	15 °C tot 30 °C
Proteïnase K	3	Gevriesdroogd proteïnase K	15 °C tot 30 °C

Tabel 2 VeriSeq NIPT-extractiedoos (96), onderdeelnr. 15066807

Naam reagens op label	Aantal containers in kit	Werkzame bestanddelen	Opslag
Lysisbuffer	1	Guanidinehydrochloride in gebufferde waterige oplossing	15 °C tot 30 °C
Wasbuffer I	1	Guanidinehydrochloride en 2-propanol in gebufferde waterige oplossing	15 °C tot 30 °C
Wasbuffer II	2	Gebufferde waterige oplossing met zouten	15 °C tot 30 °C
Elutiebuffer	1	Gebufferde waterige oplossing	15 °C tot 30 °C
Proteïnasebuffer	1	Glycerol in gebufferde waterige oplossing	15 °C tot 30 °C
Proteïnase K	4	Gevriesdroogd proteïnase K	15 °C tot 30 °C

VeriSeq NIPT-monstervoorbereiding, Bibliotheekvoorbereidingsdoos

Tabel 3 VeriSeq NIPT-bibliotheekvoorbereidingsdoos (24) en (48), onderdeelnr. 20026030 en 15066809

Naam reagens op label	Aantal containers in kit	Werkzame bestanddelen	Opslag
Uiteindereparatiemengsel	1	DNA-polymerase en dNTP's in gebufferde waterige oplossing	-25 °C tot -15 °C
A-Tailing-mengsel	1	DNA-polymerase en dATP in gebufferde waterige oplossing	-25 °C tot -15 °C
Ligatiemengsel	1	DNA-ligase in gebufferde waterige oplossing	-25 °C tot -15 °C
Hybridisatiebuffer	1	Gebufferde waterige oplossing	-25 °C tot -15 °C
VeriSeq NIPT DNA-adapterplaat	1	Oligonucleotiden in gebufferde waterige oplossing	-25 °C tot -15 °C

Tabel 4 VeriSeq NIPT-bibliotheekvoorbereidingsdoos (96), onderdeelnr. 15066810

Naam reagens op label	Aantal containers in kit	Werkzame bestanddelen	Opslag
Uiteindereparatiemengsel	1	DNA-polymerase en dNTP's in gebufferde waterige oplossing	-25 °C tot -15 °C
A-Tailing-mengsel	2	DNA-polymerase en dATP in gebufferde waterige oplossing	-25 °C tot -15 °C
Ligatiemengsel	2	DNA-ligase in gebufferde waterige oplossing	-25 °C tot -15 °C
Hybridisatiebuffer	1	Gebufferde waterige oplossing	-25 °C tot -15 °C
VeriSeq NIPT DNA-adapterplaat	1	Oligonucleotiden in gebufferde waterige oplossing	-25 °C tot -15 °C

VeriSeq NIPT-monstervoorbereiding, accessoiredoos

Tabel 5 VeriSeq NIPT-accessoiredoos, Onderdeelnr. 15066811

Naam reagens op label	Aantal containers in kit	Werkzame bestanddelen	Opslag
DNA-bindingsplaat	1	Propyleen microplaat met aangepast siliconen membraan	2 °C tot 8 °C
Resuspensiebuffer	1	Gebufferde waterige oplossing	2 °C tot 8 °C
Zuiveringsparels monster	1	Vaste fase, paramagnetische parels in gebufferde waterige oplossing	2 °C tot 8 °C
DNA-kwantificeringsreagens	1	DNA-intercalatiekleurstof in DMSO	2 °C tot 8 °C
DNA-kwantificeringsnorm	1	dsDNA-standaard in gebufferde waterige oplossing	2 °C tot 8 °C

VeriSeq NIPT-monstervoorbereiding, workflowbuisjes en -labels

Tabel 6 Workflowbuisjes en -labels, onderdeelnr. 15071543

Naam artikel op label	Aantal artikelen in kit	Opslag
Label (LBL)–Streepjescode plaat	9	15 °C tot 30 °C
Label (LBL)–Streepjescode plaat met diepe monsterputjes	12	15 °C tot 30 °C
Buisje (TB)–Leeg poolingbuisje	5	15 °C tot 30 °C

Niet meegeleverde reagentia

Benodigde, maar niet meegeleverde reagentia

- ▶ Sequencingreagentia en verbruiksartikelen voor het next-generation sequencing (NGS)-systeem
- ▶ DNase/RNase-vrij water
- ▶ Ethanol, 100% (200 proof) voor moleculaire biologie



OPMERKING

Ethanol dat niet geschikt is voor moleculaire biologie kan een negatief effect hebben op de prestaties van de assay.

Optionele reagentia, niet meegeleverd

- ▶ Dulbecco's fosfaatgebufferde fysiologische zoutoplossing (DPBS) voor amplificatiereagenscontrole

Opslag en hantering

- 1 Kamertemperatuur wordt gedefinieerd als 15 °C tot 30 °C.
- 2 Alle reagentia zijn uitsluitend bedoeld voor eenmalig gebruik. Nadat reagentia zijn geprepareerd voor gebruik, moeten ze direct worden gebruikt.
- 3 Als de verpakking of inhoud van de onderdelen van de VeriSeq NIPT Solution is beschadigd of aangetast, moet u contact opnemen met de klantenservice van Illumina.
- 4 Reagentia zijn stabiel mits opgeslagen als aangegeven en tot de op de kitlabels vermelde uiterste gebruiksdatum. Raadpleeg voor de opslagcondities de kolom Opslag in de tabellen in *Meegeleverde reagentia op pagina 4*. Gebruik geen reagentia waarvan de uiterste gebruiksdatum is verstreken.
- 5 Veranderingen in het uiterlijk van de meegeleverde reagentia kunnen duiden op kwaliteitsverslechtering van de materialen. Als er sprake is van uiterlijke veranderingen (zoals duidelijke veranderingen in de kleur van het reagens of troebelheid als gevolg van microbiële verontreiniging), mogen de reagentia niet worden gebruikt.

- 6 Volg de volgende beste werkwijze voor het hanteren van zuiveringsparels voor monsters:
 - ▶ Vries de parels nooit in.
 - ▶ Laat de parels vóór gebruik op kamertemperatuur komen.
 - ▶ Vortex de parels direct vóór gebruik tot ze goed gesuspenderd zijn en de kleur homogeen is.
- 7 Lysisbuffer, wasbuffer I, wasbuffer II, elutiebuffer en proteïnasebuffer kunnen zichtbare neerslag of kristallen vormen. Vortex krachtig vóór gebruik en controleer de buffer visueel op neerslag.
- 8 Vries volbloed na afname nooit in.
- 9 Sequence de bibliotheken zo snel als mogelijk na pooling. Gepoolde bibliotheken zijn stabiel gedurende 7 achtereenvolgende dagen opslag bij -25 °C tot -15 °C. Bij opslag van het product gedurende deze tijdsduur onder deze omstandigheden is extra denaturatie niet nodig.

Apparatuur en materialen

Benodigde, maar niet meegeleverde apparatuur en materialen

Benodigde, maar niet meegeleverde apparatuur

Apparatuur	Leverancier
Enkelkanaalspipetten 20 µl	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Enkelkanaalspipetten 200 µl	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Enkelkanaalspipetten 1000 µl	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Pipetteerhulp	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Koelkast, 2 °C tot 8 °C	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Vriezer, -25 °C tot -15 °C	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Microcentrifuge	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Vortexer	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Centrifuge en rotoeenheid voor bloedafnamebuisjes	
Aanbevolen:	
<ul style="list-style-type: none"> • Centrifuge van Allegra X12R-serie, 1600 g • Allegra-centrifuge GH-3.8 rotor met buckets • Bucketdeksels voor Allegra-centrifuge, set van twee • Adaptereenheid voor Allegra-centrifuge, 16 mm, set van vier 	<ul style="list-style-type: none"> Beckman Coulter, artikelnr. 392304 (120 V of 230 V) Beckman Coulter, artikelnr. 369704 Beckman Coulter, artikelnr. 392805 Beckman Coulter, artikelnr. 359150
Gelijkwaardig:	
<ul style="list-style-type: none"> • Gekoelde centrifuge met een vermogen van 1600 x g met een niet-remmenmogelijkheid • Zwaairotor met buckets • Bucketinzetstukken, capaciteit 24, 48 of 96 buisjes, minimumdiepte 76 mm • Inzetstukadapters als ondersteuning van bloedafnamebuisjes van 16 x 100 mm 	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Centrifuge en rotoeenheid voor microplaten	
Aanbevolen:	
<ul style="list-style-type: none"> • Sorvall Legend XTR-centrifuge • HIGHPlate 6000-microplaatrotor • Twee van een van de volgende steunbases voor microplaten: <ul style="list-style-type: none"> • Steunbasis voor MicroAmp-plaat met 96 monsterputjes • Drager voor PCR-plaat met 96 monsterputjes 	<ul style="list-style-type: none"> Thermo Fisher Scientific, catalogusnr. 75004521 (120 V) of catalogusnr. 75004520 (230 V) Thermo Fisher Scientific, catalogusnr. 75003606 Thermo Fisher Scientific, catalogusnr. 4379590 Thermo Fisher Scientific, catalogusnr. AB-0563/1000

Apparatuur	Leverancier
<p>Gelijkwaardig:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Centrifuge met een vermogen van 5600 × g • Zwaaiplaatrotor met dragers voor platen met 96 monsterputjes, diepte 76,5 mm • Steunbasis voor microplaten 	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
<p>Een van de volgende microplaatlezers (fluorometer) met SoftMax Pro v6.2.2 of hoger:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gemini XPS • SpectraMax M2 	<p>Moleculaire hulpmiddelen, onderdeelnr. XPS</p> <p>Moleculaire hulpmiddelen, onderdeelnr. M2</p>
SpectraMax High-Speed USB, seriële adapter	Moleculaire hulpmiddelen, onderdeelnr. 9000-0938
<p>Thermocycler met de volgende specificaties:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Verwarmd deksel • Temperatuurbereik 4 °C tot 98 °C • Temperatuurnauwkeurigheid ±2 °C • Minimum stijgings-/dalingssnelheid 2 °C per seconde • Compatibel met Twin.tec PCR-plaat met 96 monsterputjes, volledig omrand 	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
VeriSeq NIPT Microlab STAR	Hamilton, onderdeelnr. 95475-01 (115 V), onderdeelnr. 95475-02 (230 V) of onderdeelnr. 806288 (voor Hamilton Company Bonaduz)
<p>Een next-generation sequencing (NGS)-systeem met de volgende functies:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 2 x 36 bp paired-end sequencing • Compatibel met dual-indexadapters in de VeriSeq NIPT-monstervoorbereiding • Automatische productie van .BCL-bestanden • Tweekanaals-chemie • 400 miljoen paired-end aflezingen per run • Compatibel met VeriSeq NIPT-assaysoftware v2 of een NextSeq 550Dx-sequencingsysteem. 	Leverancier instrument of Illumina, onderdeelnr. 20005715
<p>Bij gebruik van een NextSeq 550Dx-sequencingsysteem:</p> <ul style="list-style-type: none"> • NextSeq 550Dx-reagenskit met hoge output v2.5, 75 cycli 	Illumina, onderdeelnr. 20028870
on-site server VeriSeq v2 of een geüpgradede on-site server VeriSeq	Illumina, onderdeelnr. 20028403 of 20047000 (v2) of nr.15076164 of nr. 20016240 (geüpgradede)

Optionele apparatuur, niet meegeleverd

Apparatuur	Leverancier
Pluggo-ontdopsysteem	LGP Consulting, onderdeelnr. 4600 4450
SpectraMax SpectraTest FL1 fluorescente valideringsplaat	Molecular Devices, onderdeelnr. 0200-5060
Draai-/roltafel buisjes, 15 ml-buisjes, 40 tpm, 100–240 V	Thermo Scientific, catalogusnr. 88881001 (VS) of catalogusnr. 88881002 (EU)

Benodigde, maar niet meegeleverde materialen

Verbruiksartikel	Leverancier
Geleidende, niet-steriele filtertips van 1000 µl	Hamilton, onderdeelnr. 235905
Geleidende, niet-steriele filtertips van 300 µl	Hamilton, onderdeelnr. 235903
Geleidende, niet-steriele filtertips van 50 µl	Hamilton, onderdeelnr. 235948

Verbruiksartikel	Leverancier
<p>Reservoir met diepe monsterputjes met de volgende specificaties:</p> <ul style="list-style-type: none"> • SLAS 1-2004 microplaatformaat met 96 putjes met een piramide- of kegelvormige bodem en een minimumcapaciteit van 240 ml. • Polypropyleen met bij voorkeur een lage DNA-binding voor alle oppervlakken die met het monster in contact komen. • De inwendige afmetingen (vloeistofniveau) zijn compatibel met de geautomatiseerde aspiratie- en dispenseerstappen van VeriSeq NIPT Microlab STAR. • De hoogteafmetingen zijn compatibel met de geautomatiseerde bewegingen van VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	<p>Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden</p> <p>Compatibele reservoirs:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Corning Axygen, productnr. RES-SW96-HP-SI • Agilent, productnr. 201246-100
<p>Reagensbakje met de volgende specificaties:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bakje dat veilig in de drager van de VeriSeq NIPT Microlab STAR past, met taps toelopende bodem en een minimumcapaciteit van 20 ml. • Polypropyleen dat geen RNase/DNase bevat. • De inwendige afmetingen (vloeistofniveau) zijn compatibel met de geautomatiseerde aspiratie- en dispenseerstappen van VeriSeq NIPT Microlab STAR. • De hoogteafmetingen zijn compatibel met de geautomatiseerde bewegingen van VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	<p>Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden</p> <p>Compatibele bakjes:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Roche, productnr. 03004058001
<p>Platen met diepe monsterputjes met de volgende specificaties:</p> <ul style="list-style-type: none"> • SLAS 1-2004, 3-2004 en 4-2004 microplaatformaat met 96 putjes met een piramide- of kegelvormige bodem en een minimale putjescapaciteit van 2 ml. • Polypropyleen met bij voorkeur een lage DNA-binding voor alle oppervlakken die in contact komen met het monster en een torsiebestendig frame. • De afmetingen van de putjes (vloeistofniveau) zijn compatibel met de geautomatiseerde aspiratie- en dispenseerstappen van de VeriSeq NIPT Microlab STAR. • De hoogteafmetingen van de plaat zijn compatibel met de geautomatiseerde bewegingen van de VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	<p>Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden</p> <p>Compatibele platen:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, onderdeelnr. 0030505301 • Eppendorf, onderdeelnr. 30502302 • USA Scientific, onderdeelnr. 1896-2000
<p>Plaet met 384 putjes met de volgende specificaties:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Microplaat met 384 putjes, geoptimaliseerd voor lage volumes, met een minimale putjescapaciteit van 50 µl. • Polystyreen met lichtwering en een lage DNA-binding voor alle oppervlakken die met het monster in contact komen. • De afmetingen van de putjes (vloeistofniveau) zijn compatibel met de geautomatiseerde aspiratie- en dispenseerstappen van de VeriSeq NIPT Microlab STAR. • De hoogteafmetingen van de plaat zijn compatibel met de geautomatiseerde bewegingen van de VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	<p>Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden</p> <p>Compatibele platen:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Corning, productnr. 3820

Verbruiksartikel	Leverancier
<p>Plaat met 96 putjes met de volgende specificaties:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Microplaat met een torsiebestendig frame en 96 putjes met taps toelopende bodems, verhoogde randen en een minimale putjescapaciteit van 150 µl. • Polypropyleen dat geen RNase/DNase bevat met een lage DNA-binding voor alle oppervlakken die met het monster in contact komen. • De afmetingen van de putjes (vloeistofniveau) zijn compatibel met de geautomatiseerde aspiratie- en dispenseerstappen van de VeriSeq NIPT Microlab STAR. • De hoogteafmetingen van de plaat zijn compatibel met de geautomatiseerde bewegingen van de VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	<p>Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden</p> <p>Compatibele platen:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, onderdeelnr. 0030129512 • Eppendorf, onderdeelnr. 30129580 • Eppendorf, onderdeelnr. 30129598 • Eppendorf, onderdeelnr. 30129660 • Eppendorf, onderdeelnr. 30129679 • BioRad, onderdeelnr. HSP9601
<p>Een van de volgende afsluitmaterialen:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Microseal 'F' Foil • Folieafsluitingen 	<p>Bio-Rad, catalogusnr. MSF1001 Beckman Coulter, itemnr. 538619</p>
Cell-Free DNA BCT CE	Streck, catalogusnr. 218997
Duwdoppen	Sarstedt, bestelnr. 65.802
2 ml-buisjes met schroefdop	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Filtertips van 20 µl voor pipet van 20 µl	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Filtertips van 200 µl voor pipet van 200 µl	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Filtertips van 1000 µl voor pipet van 1000 µl	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Serologische pipetten van 25 ml	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Serologische pipetten van 10 ml	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
<p>Aanbevolen:</p> <p>Deconex® SOLARSEPT Deconex® 61 DR</p>	Borer Chemie AG
<p>Gelijkwaardig:</p> <p>een snelle desinfectiespray op alcoholbasis een oplossing met desinfectiemiddel</p>	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden

Optionele materialen, niet meegeleverd

Verbruiksartikel	Leverancier
Buisje, schroefdop, 50 ml (alleen voor controlemonsters)	Sarstedt, bestelnr. 60.551
Buisje, schroefdop, 50 ml	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden

Afname, transport en opslag van monsters



LET OP

Hanteer alle monsters alsof het potentieel infectieuze stoffen zijn.

- 1 Volbloedmonsters van 7–10 ml moeten worden afgenomen in een Streck celvrij DNA-bloedafnamebuisje.
- 2 Het transport van volbloed moet voldoen aan alle toepasselijke heersende regelgeving inzake het transport van etiologische stoffen. Er wordt aanbevolen gebruik te maken van snelverzending/-transport.
- 3 Tijdens het transport gekoeld bewaren tussen 4 °C en 30 °C. De monsters na ontvangst bewaren bij 2 °C tot 8 °C tot verdere verwerking. Er mag niet meer dan 5 dagen liggen tussen de bloedafname en de eerste plasma-isolatie.
- 4 Als opnieuw testen nodig is, kunnen monsters na verwerking opnieuw van een dop worden voorzien en nog eens vijf dagen (tot in totaal tien dagen na de bloedafname) bij 4 °C worden bewaard.

**LET OP**

Langere opslagtijden dan hierboven wordt genoemd, kan ertoe leiden dat de analyse van individuele monsters vaker mislukt.

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

- ▶ Deze assay bevat proteïnase K. Inademen, inslikken, contact met de huid en met de ogen kunnen resulteren in persoonlijk letsel. Gebruik het in een goed geventileerde ruimte, draag beschermende kleding, adem geen stof in en voer containers en ongebruikte inhoud af overeenkomstig de toepasselijke overheidsregels met betrekking tot veiligheid.
- ▶ Deze assay bevat guanidiniumchloride. Inademen, inslikken en contact met de huid en met de ogen kunnen resulteren in persoonlijk letsel. Gebruik het in een goed geventileerde ruimte, draag beschermende kleding en voer containers en ongebruikte inhoud af overeenkomstig de toepasselijke lokale overheidsregels met betrekking tot veiligheid.
- ▶ Deze assay bevat 2-propanol, een brandbare chemische stof. Buiten bereik van hitte en open vuur houden. Inademen, inslikken en contact met de huid en met de ogen kunnen resulteren in persoonlijk letsel. Gebruik het in een goed geventileerde ruimte, draag beschermende kleding en voer containers en ongebruikte inhoud af overeenkomstig de toepasselijke lokale overheidsregels met betrekking tot veiligheid.
- ▶ Deze assay bevat dimethylsulfoxide, een bijtende en brandbare vloeistof. Inademen, inslikken en contact met de huid en met de ogen kunnen resulteren in persoonlijk letsel. Gebruik het in een goed geventileerde ruimte, draag beschermende kleding en voer containers en ongebruikte inhoud af overeenkomstig de toepasselijke lokale overheidsregels met betrekking tot veiligheid.
- ▶ Om de vorming van schadelijke gassen te voorkomen mag cfDNA-extractieafval (dat guanidinethiocynaat bevat) niet worden afgevoerd in combinatie met afval dat bleekmiddel (natriumhypochloriet) bevat.
- ▶ Hanteer alle monsters alsof het potentieel infectieuze stoffen zijn.
- ▶ Volg de standaard voorzorgsmaatregelen die in het laboratorium gelden. Pipetteer niet met de mond. Niet eten, drinken of roken in de aangegeven werkgebieden. Draag wegwerphandschoenen en een laboratoriumjas bij het hanteren van monsters en testreagentia. Was de handen grondig na het hanteren van monsters en testreagentia.
- ▶ Gebruik geen assay-onderdelen waarvan de uiterste gebruiksdatum die op het label op de assaydoos staat vermeld, is verstreken. Wissel de assay-onderdelen van verschillende assaylots niet onderling uit. Assaylots staan vermeld op het label op de assaydoos. Bewaar de assay-onderdelen bij de aangegeven temperatuur.
- ▶ Om kwaliteitsverslechtering van het monster of het reagens te voorkomen, moeten alle natriumhypochlorietdampen van het reinigen volledig zijn verdwenen alvorens met het protocol te beginnen.
- ▶ Wanneer de omschreven procedures niet worden gevolgd, kunnen de resultaten onjuist zijn of kan de monsterkwaliteit significant slechter zijn.
- ▶ Meld ernstige incidenten in verband met dit product onmiddellijk aan Illumina en de bevoegde autoriteiten van de lidstaten waar de gebruiker en de patiënt gevestigd zijn.
- ▶ Raadpleeg voor informatie met betrekking tot milieu, gezondheid en veiligheid de veiligheidsinformatiebladen (SDS) op support.illumina.com/sds.html.

Procedurele opmerkingen

Voorkomen van verontreiniging

- ▶ Gebruik nieuwe tips en nieuw verbruiksmateriaal voor het laboratorium.
- ▶ Gebruik aerosolbestendige tips om het risico op overdracht en kruisverontreiniging tussen monsters onderling te verkleinen.

- ▶ Vanwege het risico op verontreiniging moet u uiterste zorg betrachten om de inhoud van monsterputjes volledig in de putjes te houden. De inhoud mag niet spetteren. Centrifugeer na elke vortexstap.
- ▶ Volg de toepasselijke voorschriften inzake een goede laboratoriumwerkwijze en hygiëne bij het hanteren van bloed en bloedderivaten.
- ▶ Gebruik geen spuitbus met bleekmiddel bij het prepareren van de bibliotheek. Sporen van verontreiniging met bleekwater kunnen de assay laten mislukken.

Reiniging dek VeriSeq NIPT Microlab STAR

- ▶ Controleer vóór gebruik of het dek schoon is. Voer minstens één keer per week het wekelijkse onderhoud uit en volg daarbij deze reinigingsinstructies op.
- ▶ Verwijder alle uitlaadbare dragers, reinig ze met een snelle desinfectiespray op alcoholbasis (Deconex® SOLARSEPT of een gelijkwaardig product) en laat ze aan de lucht drogen. Als de dragers erg vuil zijn, kunt u ze vervolgens in een oplossing met desinfectiemiddel (Deconex® 61 DR-reinigingsvloeistof of een gelijkwaardig product) laten weken, spoelen met het desinfectiemiddel op alcoholbasis en aan de lucht laten drogen.
- ▶ Open de behuizing aan de voorzijde en neem het dek af met een doek die doordrenkt is met Deconex® SOLARSEPT (of een gelijkwaardig product). Met name de schuifblokken moeten schoon zijn.
- ▶ Verwijder het CVS-spruitstuk en reinig het spruitstuk, de pakking en de inwendige compartimenten van de CVS met een doek.
- ▶ Maak het afvalbakje voor de tips van de CORE 96-kop en het onafhankelijke kanaal leeg.
- ▶ Verwijder de tip-ejectieplaat van het onafhankelijke kanaal van het tipafvalstation en reinig dit: spray Deconex® SOLARSEPT (of een gelijkwaardig product) direct op het oppervlak en neem dit af. Trek een nieuwe plastic zak over het frame en maak vast. Plaats de schone tip-ejectieplaat terug.
- ▶ Spray Deconex® SOLARSEPT (of een gelijkwaardig product) direct op het oppervlak van het afvalbakje en de sleuf van de CORE 96-kop en veeg schoon.
 - ▶ Als de aanslag op tipafvalbakjes moeilijk te verwijderen is, veeg dan met een doek die bevochtigd is met DNase/RNase-vrij water totdat de aanslag weg is. Gooi de doek volgens de voorschriften weg. Steriliseer vervolgens met het desinfectiemiddel op alcoholbasis.
- ▶ Bevochtig een pluisvrije doek of wattenstaafje met 70% ethanol. Veeg hiermee over het laserscannervenster van de streepjescodelezer. Reinig met dezelfde doek of met een wattenstaafje elk monsterputje van de CPAC-plaatadapter. Als er een doek wordt gebruikt, moet de doek met de achterkant van een pen in elk putje van de adapter worden geduwd om er zeker van te zijn dat de binnenzijde van het monsterputje goed schoon is.
- ▶ Reinig de onafhankelijke kanalen:
 - ▶ Reinig op de onafhankelijke kanalen de tip-ejectiehuls (buitenste deel van de pipettekanalen) met een pluisvrije doek met Deconex® SOLARSEPT (of een gelijkwaardig product). (Raadpleeg de *Hamilton Microlab STAR-handleiding nr. 15070074*.)
 - ▶ Reinig de stopschijf en de O-ringen van de pipettekop (buitenste deel van de pipettekanalen) met een pluisvrije doek met Deconex® SOLARSEPT (of een gelijkwaardig product).
- ▶ Reinig de CORE 96-kop:
 - ▶ Gebruik dezelfde pluisvrije doek met Deconex® SOLARSEPT (of een gelijkwaardig product) om de behuizing van de 96-kop en de onderzijde van de stopschijf te reinigen.
 - ▶ Gebruik dezelfde doek of een in repen gescheurde doek met Deconex® SOLARSEPT (of een gelijkwaardig product) om daarmee rondom de zijkanten van de pipettekanalen van de 96-kop te 'flossen' zodat de O-ringen worden gereinigd. Herhaal deze procedure voor elk pipettekanaal op de 96-kop.
- ▶ Spray de voor- en zijkant met Deconex® SOLARSEPT (of een gelijkwaardig product) en veeg droog.
- ▶ Reinig het Autoload-beschermflint met een doek met Deconex® SOLARSEPT (of een gelijkwaardig product) en neem af zonder druk uit te oefenen.
- ▶ Wanneer het dek en de onderdelen helemaal droog zijn, zet dan de dragers terug.

**OPMERKING**

Onjuiste reiniging en onderhoud van de ML STAR kunnen resulteren in kruisverontreiniging en slechte assayprestaties.

Quality Control (kwaliteitscontrole)

Er kan een beoordeling worden uitgevoerd van controle materiaal met bekende werkingseigenschappen om verschillen in verwerking en technische procedures in het laboratorium te detecteren.

**OPMERKING**

Het verwerken van een controlemonster of een amplificatiereagenscontrole reduceert het totaal aantal onbekende maternale monsters dat met elke monstervoorbereidingskit kan worden verwerkt.

Gebruik niet meer dan twee NTC-monsters per batch van 24 of 48 monsters of vier NTC-monsters per batch van 96 monsters.

Gebruiksaanwijzing

Tips en technieken

Tenzij er in het protocol een veilig stoppunt is aangegeven, moet u onmiddellijk doorgaan naar de volgende stap.

Aanbrengen van streepjescodes op de platen

- Streepjescodes voor volledig omrande platen beginnen met PL.
- Streepjescodes voor platen met diepe monsterputjes beginnen met DW.
- Breng de streepjescodes voor de volledig omrande platen en de platen met diepe monsterputjes aan op de zijde naast kolom 12.
- Laad de platen met de streepjescode naar rechts voor automatisch scannen.

Afdekfolie aanbrengen op en verwijderen van de plaat

- ▶ Sluit de plaat met 96 monsterputjes altijd af met afdekfolie alvorens verder te gaan met de volgende stappen in het protocol:
 - ▶ Centrifugestappen
 - ▶ Thermocyclingstappen
- ▶ Om de plaat af te sluiten, moet de kleefolie op de plaat worden aangebracht en worden afgesloten.
- ▶ Voorafgaand aan het verwijderen van de afdekfolie:
 - ▶ Centrifugeer de plaat met 96 monsterputjes bij 1000 × g gedurende 20 seconden.
 - ▶ Plaats de plaat op een vlakke ondergrond alvorens de afdekfolie voorzichtig te verwijderen.


VeriSeq NIPT Microlab STAR

- ▶ Voer vóór gebruik het vereiste onderhoud uit volgens de instructies van de fabrikant en documenteer dit.
- ▶ Observeer de ML STAR tijdens de automatische stappen. Controleer de software-interface van de VeriSeq NIPT-workflowmanager v2 op prompts en instructies voor de operator.
- ▶ Laat de voorkant tijdens gebruik in positie.
- ▶ Houd het dek tijdens gebruik volledig vrij.
- ▶ Tijdens de plaatvacuümstappen moet u, wanneer de VeriSeq NIPT-workflowmanager v2 dit vraagt, handmatig helpen om de afsluiting tussen de plaat en het vacuümspruitstuk tot stand te brengen.

- ▶ Laat het systeem de tips automatisch van de adapter afvoeren. Verwijder tips niet handmatig, tenzij u een softwaremelding krijgt met de vraag om dit te doen.
- ▶ Verwijder gebruikte reagentia en gebruikte verbruiksartikelen zodra de workflowmanager dit vraagt.
- ▶ Maak de mandflessen voor vacuümafval dagelijks leeg. De eerste mandfles mag nooit voor meer dan de helft gevuld zijn. Als het vacuümafvalbakje overloopt, kan dit de vacuümpomp beschadigen en het toegepaste vacuüm van het systeem doen verminderen.

Verwerking van monsters

Procedure

- 1 Voer voor elk aliquot de volgende stappen uit:
 - a Centrifugeer monsters met barcodes bij 1600 × g gedurende 10 minuten bij 4 °C met de rem uitgeschakeld.
 - b Als de centrifuge volledig tot stilstand is gekomen, verwijder dan de monsterbuisjes. Start na het centrifugeren binnen 15 minuten met plasma-isolatie. Centrifugeer opnieuw als er meer dan 15 minuten zijn verstreken.
 - 2 Inspecteer elk buisje op geschiktheid van het monster, inclusief verificatie van het volgende:
 - ▶ het monstervolume voldoet aan verwachting;
 - ▶ het monster is op de juiste wijze gescheiden tijdens het centrifugeren;
 - ▶ het plasmaniveau is minimaal 1,5 ml boven de buffy coat;
 - ▶ het monster is niet sterk gehemolyseerd (d.w.z. het plasma heeft geen dieprode kleur);
 - ▶ het monster is niet lipemisch (plasma ziet er bijvoorbeeld niet troebel wit of melkachtig en ondoorzichtig uit);
 - ▶ het monster bevat geen stolsels.
-  **LET OP**
Monsters die onjuist zijn opgeslagen of gehanteerd, kunnen daardoor ongeschikt zijn. Als ongeschikte monsters in de workflow worden verwerkt, kunnen ze de bindingsplaat tijdens extracties verstopten, wat leidt tot het overlopen van monsters naar aangrenzende monsterputjes.
- 3 Haal de doppen van de buisjes en plaats ze in de buisdragers. Laad alle monsters en eventuele plasmacontroles voor de batch.

Plasma isoleren

Vorbereiden

- 1 Label 1 plaat met diepe monsterputjes 'Plasma tussenstap' en breng een streepjescode aan.
- 2 Label 1 plaat met diepe monsterputjes 'Definitief plasma' en breng een streepjescode aan.



LET OP

Zorg ervoor dat u het juiste plaattype gebruikt voor de platen Tussenstap plasma en Definitief plasma. Het gebruik van een reservoir met diepe monsterputjes in plaats van een plaat met diepe monsterputjes leidt tot vermenging van monsters en kan tot onjuiste resultaten leiden.

Procedure

- 1 Open de AppLauncher en selecteer dan **VeriSeq NIPT Method** (VeriSeq NIPT-methode).
- 2 Voer de batch-ID en de gebruikersnaam in en selecteer dan **OK**.
De batch-ID mag maximaal 26 karakters bevatten. Gebruik alleen cijfers, letters, onderstrepingstekens (_) of verbindingsstreepjes (-). Bijvoorbeeld: 2025-10-16_Batch3.
- 3 Selecteer **New Batch** (nieuwe batch).
- 4 Selecteer na de inwerkingstelling **OK** om de plasma-isolatie te starten.

- 5 Voer een van de volgende stappen uit:
- Selecteer het monsterformulier voor de batch en selecteer dan **OK** om een bestaand monsterformulier dat u eerder heeft aangemaakt te laden.
 - Om verder te gaan zonder een monsterformulier te selecteren, selecteer **No Sample Sheet** (geen monsterformulier).

Voor informatie over het aanmaken van een monsterformulier of het instellen van standaardwaarden, zie de *VeriSeq NIPT Solution v2-softwarehandleiding (documentnr.100000067940)*.



OPMERKING

Monstertype, enkelvoudig of tweeling, moet voor ieder monster correct worden aangegeven om te zorgen voor juiste gegevensanalyse.

Als u No Sample Sheet (geen monsterformulier) kiest, zorg er dan voor dat u standaardmonsterwaarden hebt ingesteld in de servicetools van de workflowmanager.

- 6 Selecteer de batchgrootte en selecteer dan **OK**.
- 7 Selecteer het aantal amplificatiereagenscontroles (NTC's, no template controls) en selecteer dan **OK**.



OPMERKING

NTC-posities zijn altijd de laatste posities die worden geselecteerd. Als bijvoorbeeld een run van 24 monsters twee NTC's bevat, zijn posities 23 en 24 NTC's.

- 8 Controleer of alle barcodes zijn aangebracht en laad dan de monsters, tips en platen (met de barcode naar rechts) op de drager. Selecteer **OK** na elke ladingsprompt.

Monsterbatchgrootte	Drager Type	Spoor	Artikel	Locatiepositie
24, 48, 96	Tip	7-12	Tips van 1000 µl	5
			Tips van 1000 µl (alleen voor batchgrootte 96)	4, 5
	Buisje	15	Geprepareerde bloedmonsterbuisjes 1-24 (voor alle batchgrootten)	1-24
	Buisje	16	Geprepareerde bloedmonsterbuisjes 25-48 (alleen voor batchgrootten 48 en 96)	25-48
	Buisje	17	Geprepareerde bloedmonsterbuisjes 49-72 (alleen voor batchgrootte 96)	49-72
	Buisje	18	Geprepareerde bloedmonsterbuisjes 73-96 (alleen voor batchgrootte 96)	73-96
	Multiflex	19-24	Lege plaat met diepe monsterputjes, Definitief plasma – met streepjescode	4
	Multiflex	19-24	Lege plaat met diepe monsterputjes, Tussenstap plasma – met streepjescode	5
	Reagens	47	[Optioneel] DPBS voor amplificatiereagenscontrole	5

- 9 Controleer of de dragers, laboratoriumbenodigdheden en reagentia correct zijn geladen, selecteer dan **OK** in het scherm Pre-Spin Deck Verification (verificatie dek vóór centrifugeren).
- 10 Observeer de ML STAR tijdens de automatische stappen.
- 11 Wanneer de workflowmanager dit aangeeft, controleer dan of het ML STAR-laaddek vrij is van obstructies zodat de ML STAR de dragers kan uitladen.
- 12 Selecteer **Unload** (uitladen) om het dek uit te laden.
- 13 Verwijder de plaat met diepe monsterputjes voor tussenstap plasma.
- a Controleer of er in elk monsterputje van de plaat een even groot volume zit (geen pipetteerfouten). Het verwachte volume is 1000 µl.
 - b Let op inconsistenties en registreer deze na afloop van de plasma-isolatieprocedure.

- c Sluit de plaat af, laad deze met balans en centrifugeer bij 5600 × g gedurende 10 minuten met de rem uitgeschakeld of in de laagste stand.

14 Selecteer **Yes** (ja) om verder te gaan naar het voorbereiden van definitief plasma.

15 Verwijder de afdekfolie van de plaat en laad de plaat opnieuw op de drager.

Monsterbatchgrootte	Drager Type	Spoor	Artikel	Locatiepositie
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Plaat met diepe monsterputjes voor tussenstap plasma.	5

16 Selecteer het selectievakje **Intermediate Plasma plate has been spun** (Plaat tussenstap plasma is gecentrifugeerd) en selecteer dan **OK**.

17 Observeer de ML STAR tijdens de automatische stappen.

18 Wanneer de workflowmanager dit aangeeft, controleer dan of het ML STAR-laaddek vrij is van obstructies zodat de ML STAR de dragers kan uitladen.

19 Selecteer **Unload** (uitladen) om het dek uit te laden.

20 Wanneer de workflowmanager dit vraagt, moeten de dragers en het dek worden geleegd.

21 Verwijder de plaat met diepe monsterputjes voor definitief plasma.

22 Controleer de plaat op:

- ▶ Gelijke volumes in alle monsterputjes. Het verwachte volume is 900 µl.
- ▶ Zichtbare celpellets.
- ▶ Overmatige hemolyse.

Als u abnormale zichtbare celpellets of overmatige hemolyse waarneemt, moet het aangedane monster na afloop van de plasma-isolatiemethode ongeldig worden verklaard, of moet Batch-manager worden gebruikt. Raadpleeg voor meer informatie over Batch-manager de *VeriSeq NIPT Solution v2-softwarehandleiding* (documentnr. 1000000067940).

23 Wanneer de workflowmanager dit vraagt, selecteer dan **OK**.

24 Voer opmerkingen in over aangetaste monsterputjes en selecteer dan **OK**.

25 Voer een van de volgende stappen uit.

- Om verder te gaan met cfDNA-extractie, selecteer **Yes** (ja).
- Selecteer **Exit** (afsluiten) om te stoppen.

VEILIG STOPPUNT

Als u stopt, moet de de plaat voor definitief plasma met afdekfolie worden afgesloten en maximaal 7 dagen worden opgeslagen bij 2 °C tot 8 °C.

Extraheren cfDNA

Vorbereiden

1 Controleer visueel of de uiterste gebruiksdatum van de extractie- en accessoiredozen niet is verstreken.

2 Prepareer de volgende reagentia. Label de reservoirbakjes en de diepe monsterputjesreservoirs met de naam van de reagentia.

Artikel	Opslag	Instructies
Plaat met diepe monsterputjes voor definitief plasma	2 °C tot 8 °C	Wanneer de plaat eerder was opgeslagen, moet deze 30 minuten blijven staan om op kamertemperatuur te komen. Centrifugeer bij 1000 × g gedurende 20 seconden. Verwijder vóór gebruik de afdekfolie van de plaat met diepe monsterputjes voor definitief plasma.

3 Voeg langzaam 3,75 ml proteïnasebuffer toe aan elke reagensflacon met proteïnase K.

- ▶ Prepareer 3 flacons voor 24 en 48 monsters.
- ▶ Prepareer 4 flacons voor 96 monsters.

- 4 Plaats een dop op de flacons met proteïnase K en vortex tot de inhoud is geresuspendeerd.



LET OP

De rubber stop niet verontreinigen. Als er andere stoffen op de rubber stop komen, kunnen latere monsters verontreinigd raken.

- 5 Doe de geprepareerde proteïnase K uit alle flacons in een reagensbakje en label het als proteïnase K.
- 6 Voeg 100 ml 100% EtOH toe aan elke reagensfles met wasbuffer II.
- ▶ Prepareer 1 fles voor 24 en 48 monsters.
 - ▶ Prepareer 2 flessen voor 96 monsters.
- 7 Meng de inhoud door de flessen met wasbuffer II om te keren.
- 8 Plaats vinkjes in de selectievakjes op de flessen met wasbuffer II.
- 9 Label 1 nieuwe, volledig omrande plaat 'Tussenstap' en breng een plaatstreepjescode aan.
- 10 Label 1 nieuwe, volledig omrande plaat 'cdDNA elutie' en breng een plaatstreepjescode aan.
- 11 Label 1 nieuwe plaat met diepe monsterputjes 'Extractie tussenstap' en breng een plaat met diepe monsterputjes-streepjescode aan.
- 12 Breng een plaatstreepjescode op de DNA-bindingsplaat aan.
- 13 Prepareer een 70% EtOH-reinigingsoplossing (70% EtOH, 30% DNase/RNase-vrij water) voor het reinigen van het vacuümsysteem.
- 14 Prepareer het vacuümsysteem.
- a Verwijder het vacuümspruitstuk en reinig dit met 70% EtOH.
 - b Maak het vacuümafvalbakje leeg.
 - c Controleer of het ML STAR-vacuümsysteem is ingeschakeld.

Reinig de pakking niet met EtOH, want deze kan hierdoor broos worden.

Procedure

- 1 Selecteer **OK** om te beginnen met cfDNA-extractie.
- 2 Als de VeriSeq NIPT-methode nog niet is geopend:
- a Open de AppLauncher en selecteer **VeriSeq NIPT Method** (VeriSeq NIPT-methode).
 - b Voer de batch-ID en de gebruikersnaam in en selecteer dan **OK**.
- 3 Laad de tips als volgt op de tipdragers en selecteer dan **OK**.

Monsterbatchgrootte	Drager Type	Spoor	Artikel	Locatiepositie
24	Tip	1-6	Tips van 1000 µl	1
		7-12	Tips van 300 µl	1
48	Tip	1-6	Tips van 1000 µl	1, 2
		7-12	Tips van 300 µl	1
96	Tip	1-6	Tips van 1000 µl	1, 2, 3, 4
		7-12	Tips van 300 µl	1

- 4 Laad de getelde tips als volgt op de tipdragers.

Monsterbatchgrootte	Drager Type	Spoor	Artikel	Locatiepositie
24, 48, 96	Tip	49-54	Tips van 1000 µl	1
			Tips van 300 µl	2
			Tips van 50 µl	3

- 5 Voer de locatie van de eerste en laatste tip voor elk tiprek in en selecteer dan **OK**.

- 6 Scan de barcodes op de extractiedoos.
- 7 Voer de gebruikersnaam of de initialen van degene die het reagens heeft bereid in en selecteer dan **OK**.
- 8 Scan de streepjescodes op de accessoiredoos.
- 9 Voer de gebruikersnaam in, of de initialen van degene die het reagens heeft voorbereid, en selecteer dan **OK**.
- 10 Controleer of de barcodes zijn aangebracht.
- 11 Verwijder de afdekfolie van de plaat met diepe monsterputjes voor definitief plasma en laad de platen (met de barcode naar rechts) als volgt op de plaatdrager. Selecteer dan **OK**.

Monsterbatchgrootte	Drager Type	Spoor	Artikel	Locatiepositie
24, 48, 96	Multiflex	19-24	Nieuwe, volledig omrande plaat, Tussenstap – met streepjescode	1
			Nieuwe, volledig omrande plaat, cfDNA elutie – met streepjescode	2
			Nieuwe plaat met diepe monsterputjes, Extractie tussenstap – met streepjescode	4
			Plaat met diepe monsterputjes voor definitief plasma – met streepjescode	5

- 12 Controleer of de DNA-bindingsplaat een barcode heeft en selecteer dan **OK**.
- 13 Voor batches waarbij de plaat gedeeltelijk wordt gebruikt, de ongebruikte putjes afsluiten met een bijgesneden plaatafdekfolie (kolommen 4-12 voor 24 monsterbatches en kolommen 7-12 voor 48 monsterbatches).
- 14 Laad de DNA-bindingsplaat op het vacuümspruitstuk met de barcode naar rechts gericht.
- 15 Selecteer het **selectievakje Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (Zijn de DNA-bindingsplaatkolommen afgesloten?) en selecteer dan **OK**.
- 16 Laad de reagensbakjes als volgt op de reagensdrager en selecteer dan **OK**.

Monsterbatchgrootte	Drager Type	Spoor	Artikel	Locatiepositie
24, 48	Reagens	47	16 ml elutiebuffer	1
			11 ml proteïnase K	2
96	Reagens	47	16 ml elutiebuffer	1
			15 ml proteïnase K	2

- 17 Breng de gespecificeerde reagentia over naar de diepe monsterputjesreservoirs en laad vervolgens de reservoirs als volgt op de diepe monsterputjesdragers.
- 18 Selecteer **OK**.

Monsterbatchgrootte	Drager Type	Spoor	Artikel	Locatiepositie
24, 48	Diepe monsterputjes	39-44	125 ml wasbuffer II	1
			125 ml wasbuffer I	2
			60 ml 100% EtOH	3
			100 ml lysisbuffer	4
			60 ml DNase/RNase-vrij water	5
96	Diepe monsterputjes	39-44	200 ml wasbuffer II	1
			125 ml wasbuffer I	2
			100 ml 100% EtOH	3
			100 ml lysisbuffer	4
			100 ml DNase/RNase-vrij water	5

- 19 Wacht tot de automatische reagensvolumecontrole is uitgevoerd.

- 20 Controleer of het vacuümafvalbakje niet meer dan halfvol is (leeg wordt aanbevolen) en selecteer dan **OK**.
- 21 Controleer de plaatsing van alle dragers, laboratoriumbenodigdheden en reagentia en selecteer dan **OK** in het scherm Extraction Deck Verification (verificatie extractiedek).
- 22 Observeer de ML STAR tijdens de automatische stappen.

**LET OP**

U moet overgelopen monsters handmatig ongeldig verklaren als ze niet door het systeem zijn gedetecteerd voordat ze nabije monsterputjes hebben verontreinigd.

- 23 Verwijder na de laatste vacuümstap de DNA-bindingsplaat en reinig de onderzijde met 70% EtOH.
- 24 Sluit alle vrije monsterputjes op de DNA-bindingsplaat af met afdekfolie en plaats deze op de lege plaat met diepe monsterputjes voor definitief plasma.
- 25 Centrifugeer de DNA-bindingsplaat/plaat voor definitief plasma bij 5600 × g gedurende 10 minuten met de rem ingeschakeld.
- 26 Selecteer **OK**.
- 27 Tijdens het centrifugeren van de DNA-bindingsplaat de vacuümreiniging uitvoeren:
 - a Verwijder het vacuümspruitstuk en selecteer dan **OK**.
 - b Wacht tot de automatische afvalafvoer is uitgevoerd.
 - c Reinig het vacuümspruitstuk en de binnenzijde van het vacuümsysteem met 70% EtOH, plaats dan het vacuümspruitstuk terug.
 - d Selecteer het selectievakje **Manifold is on Vacuum** (spruitstuk is vacuüm) om de verplaatsing van de elutieplaat op het vacuümspruitstuk te initialiseren en selecteer dan **OK**.
- 28 Verwijder na het centrifugeren de afdekfolie van de monsterputjes met monster op de DNA-bindingsplaat en plaats deze bovenop de cfDNA-elutieplaat.
De cfDNA-elutieplaat zit op het vacuümspruitstuk.
- 29 Laad de DNA-bindingsplaat met de barcode naar rechts gericht en selecteer dan **OK**.
- 30 Observeer de ML STAR tijdens de automatische stappen.
- 31 Selecteer na de incubatie het selectievakje **Plates are assembled as indicated** (platen zijn geplaatst als aangegeven) om te bevestigen dat de DNA-bindingsplaat/cfDNA-elutieplaat-eenheid op een steunbasis zit (indien vereist door een centrifuge).
- 32 Sluit de vrije monsterputjes op de DNA-bindingsplaat af met afdekfolie.
- 33 Centrifugeer 2 minuten bij 5600 × g met de rem ingeschakeld en selecteer dan **OK**.
- 34 Controleer of er in elk monsterputje van de cfDNA-elutieplaat een even groot volume zit.
Het verwachte volume is ongeveer 55 µl.
- 35 Sluit de cfDNA-elutieplaat af met afdekfolie en bewaar deze voor de bibliotheekvoorbereiding.
- 36 Wanneer de workflowmanager dit aangeeft, controleer dan of het ML STAR-laaddek vrij is van obstructies zodat de ML STAR de dragers kan uitladen.
- 37 Selecteer **Unload** (uitladen) om het dek uit te laden.
- 38 Laad alle dragers uit en reinig het ML STAR-dek, selecteer dan **OK**.
- 39 Voer opmerkingen in over aangetaste monsterputjes en selecteer dan **OK**.
- 40 Voer een van de volgende stappen uit:
 - Selecteer **Yes** (ja) om verder te gaan met het voorbereiden van bibliotheken.
 - Selecteer **Exit** (afsluiten) om te stoppen.

VEILIG STOPPUNT

Als u stopt, moet de cfDNA-elutieplaat met afdekfolie worden afgesloten en maximaal 7 dagen worden opgeslagen bij -25 °C tot -15 °C.

Bibliotheken voorbereiden

Vorbereiden

- 1 Controleer visueel of de uiterste gebruiksdatum van de bibliotheekvoorbereidingsdozen en de accessoiredozen niet is verstreken.
- 2 Prepareer de volgende reagentia. Label de reservoirbakjes en de diepe monsterputjesreservoirs met de reagensnamen.

Artikel	Opslag	Instructies
Uiteindereparatiemengsel	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien op kamertemperatuur. Vortex om te mengen.
A-Tailing-mengsel	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien op kamertemperatuur. Vortex om te mengen, dan kort centrifugeren.
Ligatiemengsel	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien op kamertemperatuur. Vortex om te mengen, dan kort centrifugeren.
Resuspensiebuffer	2 °C tot 8 °C	Vortex om te mengen. Na gebruik weer opslaan.
Hybridisatiebuffer	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien op kamertemperatuur. Vortex om te mengen. Na gebruik weer opslaan.
VeriSeq NIPT DNA-adapterplaat	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien op kamertemperatuur. Vortex om te mengen. Centrifugeer bij 1000 × g gedurende 20 seconden. Breng een plaatstreepjescode aan.
Zuiveringsparels monster	2 °C tot 8 °C	Laat 30 minuten staan om op kamertemperatuur te komen. Vortex krachtig vóór elk gebruik. Meng door vortexen of omkeren tot alle parels gesuspendeerd zijn en het mengsel homogeen is.
cfDNA-elutieplaat	-25 °C tot -15 °C	Wanneer de plaat opgeslagen is geweest, moet u zeker weten dat dit niet langer was dan 7 dagen en dat de plaat bij kamertemperatuur is ontdooid. Vortex bij 1500 tpm gedurende 1 minuut. Centrifugeer bij 1000 × g gedurende 20 seconden.

- 3 Bereid vers 50 ml 80% EtOH uit 40 ml 100% EtOH en 10 ml DNase/RNase-vrij water.
Meng de EtOH door om te keren.
- 4 Label 1 nieuwe, volledig omrande plaat 'Bibliotheken' en breng een plaatstreepjescode aan.
- 5 Controleer of de ML STAR-thermocontrole is ingeschakeld.

Enzymen verdunnen

- 1 Doe A-Tailing-mengsel en resuspensiebuffer samen in een buis met schroefdop. Vortex om te mengen, dan kort centrifugeren.

Monsterbatchgrootte	A-Tailing-mengsel	Resuspensiebuffer
24, 48	900 µl	1200 µl
96	1800 µl	2400 µl

- 2 Doe ligatiemengsel en resuspensiebuffer in een buis met schroefdop. Vortex om te mengen, dan kort centrifugeren.

Monsterbatchgrootte	Ligatiemengsel	Resuspensiebuffer
24, 48	230 µl	1713 µl
96	440 µl	3278 µl

Procedure

- 1 Selecteer **OK** om te beginnen met de bibliotheekvoorbereiding. Als de VeriSeq NIPT-methode nog niet is geopend:
 - a Open de AppLauncher en selecteer dan **VeriSeq NIPT Method** (VeriSeq NIPT-methode).
 - b Voer de batch-ID en de gebruikersnaam in en selecteer dan **OK**.
- 2 Controleer of de volgende verbruiksartikelen zijn bereid als aangegeven in het scherm Reagent Preparation (prepareren reagens).
 - ▶ A-Tailing-mengsel, ligatiemengsel en 80% EtOH.
 - ▶ Zuiveringsparels monster, uiteindereparatiemengsel en de VeriSeq NIPT DNA-adapterplaat.
- 3 Selecteer de selectievakjes en selecteer dan **OK**.
- 4 Scan de barcodes van de bibliotheekvoorbereidingsdoos.
- 5 Voer de gebruikersnaam in, of de initialen van degene die het reagens heeft voorbereid, en selecteer dan **OK**.
- 6 Scan de barcodes op de accessoiredoos.
- 7 Voer de gebruikersnaam in, of de initialen van degene die het reagens heeft voorbereid, en selecteer dan **OK**.
- 8 Laad de tips als volgt op de tipdragers en selecteer dan **OK** voor alle dragers.

Monsterbatchgrootte	Drager Type	Spoor	Artikel	Locatiepositie
24	Tip	1-6	Tips van 50 µl	1
		7-12	Tips van 300 µl	1, 2
48	Tip	1-6	Tips van 50 µl	1, 2
		7-12	Tips van 300 µl	1, 2, 3, 4
96	Tip	1-6	Tips van 50 µl	1, 2, 3, 4
		7-12	Tips van 300 µl	1, 2, 3, 4, 5

- 9 Als u het protocol heeft gestopt na de cfDNA-extractieprocedure, laad dan de getelde tips als volgt op de tipdragers.

Monsterbatchgrootte	Drager Type	Spoor	Artikel	Locatiepositie
24, 48, 96	Tip	49-54	Tips van 1000 µl	1
			Tips van 300 µl	2
			Tips van 50 µl	3

- 10 Voer de locatie van de eerste en laatste tip voor elk tiprek in en selecteer dan **OK**.
- 11 Controleer of de barcodes zijn aangebracht en laad de platen (barcode naar rechts) als volgt op de plaatdrager. Selecteer dan **OK**.

Monsterbatchgrootte	Drager Type	Spoor	Artikel	Locatiepositie
24, 48, 96	Multiflex	19-24	cfDNA-elutieplaat – met streepjescode	1
			DNA-adapterplaat – met streepjescode	2
			Nieuwe plaat met 96 monsterputjes, volledig omrand – met streepjescode	3
			Nieuwe plaat met 96 monsterputjes, volledig omrand	4, 5

- 12 Laad de drager met diepe monsterputjes als volgt en selecteer dan **OK**.

Monsterbatchgrootte	Drager Type	Spoor	Artikel	Locatiepositie
24, 48, 96	Diepe monsterputjes	39-44	50 ml 80% EtOH in een reservoir met diepe monsterputjes	1
			Nieuwe plaat met 96 monsterputjes, volledig omrand	2, 3, 4, 5

- 13 Laad de reagensbakjes als volgt op de reagensdrager en selecteer dan **OK**.

Monsterbatchgrootte	Drager Type	Spoor	Artikel	Locatiepositie
24, 48, 96	Reagens	47	2,5 ml uiteindereparatiemengsel	1
			Geprepareerd A-Tailing-mengsel (totaal volume)	2
			Geprepareerd ligatiemengsel (totaal volume)	3
			10 ml zuiveringsparels monster	4
			12 ml hybridisatiebuffer	5

- 14 Controleer of de dragers, laboratoriumbenodigdheden en reagentia zijn geladen als aangegeven, selecteer dan **OK** in het scherm Library Deck Verification (verificatie bibliotheekdek).
- 15 Wacht tot de automatische reagensvolumecontrole is uitgevoerd.
- 16 Observeer de ML STAR tijdens de automatische stappen.
- 17 Wanneer de workflowmanager dit vraagt, controleer dan of het ML STAR-laaddek vrij is van obstructies zodat de ML STAR de dragers kan uitladen en selecteer dan **Unload** (uitladen) om het dek uit te laden.
- 18 Controleer of er in elk monsterputje van de bibliotheekplaat een even groot volume zit.



LET OP

Als de monsterputjes niet even grote volumes bevatten, kunnen de monsters onjuiste resultaten opleveren.

- 19 Bij opslaan de bibliothekenplaat afsluiten met afdekfolie en deze bewaren.
- 20 Laad de dragers uit, reinig het dek en selecteer dan **OK**.
- 21 Voer opmerkingen in over aangetaste monsterputjes en selecteer dan **OK**.
- 22 Voer een van de volgende stappen uit:
- ▶ Selecteer **Yes** (ja) om verder te gaan met het kwantificeren van bibliotheken.
 - ▶ Selecteer **Exit** (afsluiten) om te stoppen.
- 23 Tenzij u stopt, onmiddellijk verdergaan met kwantificering.

VEILIG STOPPUNT

Als u stopt, moet de bibliotheekplaat vóór opslag met afdekfolie worden afgesloten. De bibliothekenplaat is tot 7 dagen na de datum van voorbereiding stabiel bij -25 °C tot -15 °C.

Bibliotheken kwantificeren

Vorbereiden

- 1 Prepareer de volgende reagentia:

Artikel	Opslag	Instructies
DNA- kwantificeringsreagens	2 °C tot 8 °C	Buiten bereik van licht houden. Incubeer gedurende 30-150 minuten op kamertemperatuur. (Aanbevolen wordt het reagens te verwijderen bij aanvang van de procedure "Bibliotheken voorbereiden"). Vortex om te mengen, dan kort centrifugeren.
DNA-kwantificeringsnorm	2 °C tot 8 °C	Vortex om te mengen, dan kort centrifugeren.
Bibliothekenplaat	-25 °C tot -15 °C	Wanneer de plaat eerder opgeslagen is geweest, moet u zeker weten dat dit niet langer was dan 7 dagen en dat de plaat bij kamertemperatuur is ontdooid. Vortex om te mengen. Centrifugeer bij 1000 × g gedurende 20 seconden.
Resuspensiebuffer	2 °C tot 8 °C	Vortex om te mengen.

- 2 Schakel de fluorometer 10 minuten vóór gebruik in.
- 3 Breng een plaatstreepjescode aan op een nieuwe plaat met 384 monsterputjes.
- 4 Breng een plaatstreepjescode aan op een nieuwe, volledig omrande plaat.

Procedure

- 1 Selecteer **OK** om te starten met kwantificeren.
- 2 Als de VeriSeq NIPT-methode nog niet is geopend:
 - a Open de AppLauncher en selecteer **VeriSeq NIPT Method** (VeriSeq NIPT-methode).
 - b Voer de batch-ID en de gebruikersnaam in en selecteer dan **OK**.
- 3 Scan de barcodes op de accessoiredoos.
- 4 Voer de gebruikersnaam in, of de initialen van degene die het reagens heeft voorbereid, en selecteer dan **OK**.
- 5 Laad de tips als volgt op de tipdrager en selecteer dan **OK**.

Monsterbatchgrootte	Drager Type	Spoor	Artikel	Locatiepositie
24, 48	Tip	1-6	Rek voor tips van 300 µl	1
			Rek voor tips van 50 µl	2
96	Tip	1-6	Rek voor tips van 300 µl	1
			Rek voor tips van 50 µl	2, 3

- 6 Controleer of de barcodes zijn aangebracht en verwijder dan indien nodig de afdekfolie van de bibliothekenplaat.
- 7 Laad de platen (barcode naar rechts gericht) als volgt op de Multiflex-drager en selecteer dan **OK**.

Monsterbatchgrootte	Drager Type	Spoor	Artikel	Locatiepositie
24, 48, 96	Multiflex	19-24	Nieuwe, volledig omrande platen – met streepjescode	1
			Nieuwe plaat met 384 monsterputjes – met streepjescode	2
			Bibliothekenplaat – met streepjescode	3
			Nieuwe plaat met 96 monsterputjes, volledig omrand	4, 5

- 8 Laad reagensbuisjes zonder dop als volgt in de buisdrager en selecteer dan **OK**.

Monsterbatchgrootte	Drager Type	Spoor	Artikel	Locatiepositie
24, 48, 96	Buisje	46	DNA-kwantificeringsnorm	1
			DNA-kwantificeringsreagens	2

- 9 Laad de reagensbakjes als volgt op de reagensdrager en selecteer dan **OK**.

Monsterbatchgrootte	Drager Type	Spoor	Artikel	Locatiepositie
24, 48, 96	Reagens	47	Nieuw reagensbakje (leeg)	1
			16 ml resuspensiebuffer	2

- 10 Als u het protocol heeft gestopt na de bibliotheekvoorbereidingsprocedure, laad dan de getelde tips als volgt op de tipdragers.

Monsterbatchgrootte	Drager Type	Spoor	Artikel	Locatiepositie
24, 48, 96	Tip	49–54	Tips van 1000 µl	1
			Tips van 300 µl	2
			Tips van 50 µl	3

- 11 Voer de locatie van de eerste en laatste tip voor elk tiprek in en selecteer dan **OK**.
- 12 Controleer of de dragers, laboratoriumbenodigdheden en reagentia correct zijn geladen, selecteer dan **OK** in het scherm Quant Deck Verification (verificatie kwantificeringsdek).
- 13 Wacht tot de automatische reagensvolumecontrole is uitgevoerd.
- 14 Observeer de ML STAR tijdens de automatische stappen.
- 15 Wanneer de workflowmanager dit aangeeft, controleer dan of het ML STAR-laaddek vrij is van obstructies zodat de ML STAR de dragers kan uitladen.
- 16 Selecteer **Unload** (uitladen) om het dek uit te laden.
- 17 Laad de bibliotheekenplaat uit.
- Controleer of er in elk monsterputje van de plaat een even groot volume zit.
 - Sluit de bibliotheekenplaat af met afdekfolie en bewaar bij kamertemperatuur tot de fluorometrische gegevensanalyse is uitgevoerd.
- 18 Laad de resterende platen met 96 monsterputjes uit en controleer of er in elk monsterputje een even groot volume zit.
Grote volumeafwijkingen kunnen duiden op een probleem tijdens de pipetteerstappen.
- 19 Laad de plaat met 384 monsterputjes uit en controleer of er in de betreffende monsterputjes vloeistof zit.
- 20 Sluit de plaat af met een afdekfolie.
- 21 Centrifugeer bij 1000 × g gedurende 20 seconden.
- 22 Incubeer bij kamertemperatuur gedurende 10 minuten, buiten het bereik van licht.
- 23 Laad alle dragers uit en reinig het ML STAR-dek, selecteer dan **OK**.



OPMERKING

De kwantificatiereagentia pas weggooien als er gegevens zijn verkregen. U hebt de reagentia nog nodig als u de kwantificering opnieuw moet doen.

- 24 Verwijder na de incubatie de afdekfolie en laad de plaat met 384 monsterputjes op de microplaatlezer. Let erop dat bij het laden A1 linksboven zit.
- 25 Dubbelklik op de VeriSeq NIPT-template om deze te openen in SoftMax Pro.
- 26 Selecteer **New Experiment** (nieuw experiment) in het tabblad Home (start).
- 27 Selecteer **Read** (lezen).

28 Exporteer de gegevens als XML op de volgende wijze.

- Klik met de rechtermuisknop op **Plate** (plaat) en selecteer dan **Rename** (een andere naam geven).
- Scan de barcode van de kwantificeringsplaat en selecteer dan **OK**.
- Selecteer links bovenin het scherm het plaat-pictogram en selecteer dan **Export** (exporteren) in het menu.
- Selecteer het selectievakje **Expt name** (naam experiment), zet de optie plaatgegevens op onbewerkt, zet het uitvoerformaat op XML en selecteer dan **OK**.
- Stel het pad en de naam van het uitvoerbestand in en selecteer dan **Save** (opslaan).

De Hamilton-computer moet toegang hebben tot de locatie van het bestand. Gebruik geen spaties bij het instellen van de naam of het pad van het bestand.

Analyse

- Voer in het scherm Scanner Information (scannerinformatie) van de workflowmanager een fluorometer-ID in.
- Voer opmerkingen in over de fluorometerrun en selecteer dan **OK**.
- Navigeer naar het .XML-kwantificeringsbestand met de fluorometrische gegevens en selecteer dan **OK**.
- Controleer de analysesresultaten van de standaardcurve en monsterconcentratie, en selecteer dan **OK**.
- Als u de plaat opnieuw moet scannen, selecteer dan **Rescan** (opnieuw scannen).
De monsters zijn tijd- en lichtgevoelig. Voer de herhalingscan (indien nodig) onmiddellijk uit.
- Voer opmerkingen in over aangetaste monsterputjes en selecteer dan **OK**.
- Beoordeel de resultaten en ga als volgt verder.
 - Als de resultaten voldoen aan de specificatie, ga verder naar Pool Libraries (bibliotheken poolen). Zie voor specificaties de tabel met kwantificerings-QC metriekeken en -grenswaarden in de *VeriSeq NIPT Solution v2-softwarehandleiding (documentnr. 100000067940)*.
 - Als de resultaten niet voldoen aan de specificatie, zal het systeem de methode afbreken. Herhaal de kwantificeringsprocedures die beginnen met *Voorbereiden op pagina 22*.
- Voer een van de volgende stappen uit:
 - Selecteer **Yes** (ja) om verder te gaan met Pool Libraries (bibliotheken poolen).
 - Selecteer **Exit** (afsluiten) om te stoppen.

VEILIG STOPPUNT

Als u stopt, moet de bibliotheekplaat vóór opslag met afdekkfolie worden afgesloten. De bibliothekenplaat is stabiel gedurende maximaal 7 achtereenvolgende dagen opslag bij -25 °C tot -15 °C.

Poolbibliotheken

Voorbereiden

- Prepareer de volgende reagentia:

Artikel	Opslag	Instructies
Hybridisatiebuffer	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien op kamertemperatuur. Vortex om te mengen. Na gebruik weer opslaan.
Bibliothekenplaat	-25 °C tot -15 °C	Wanneer eerder opgeslagen geweest, ontdooien op kamertemperatuur. Vortex bij 1500 tpm gedurende 1 minuut. Centrifugeer bij 1000 × g gedurende 20 seconden.

- Label een leeg poolingbuisje Pool A. Als het om 96 monsters gaat, label dan een tweede leeg poolingbuisje Pool B.

- 3 Sla het volgende denatureringsprogramma op de thermocycler met verwarmd deksel op.
 - a Kies de voorverwarmd deksel-optie en stel in op 102 °C.
 - b Stel het reactievolume in op 50 µl.
 - c Stel de stijgings-/dalingsnelheid in op maximaal (≥ 2 °C per seconde).
 - d Incubeer bij 96 °C gedurende 10 minuten en vervolgens bij 4 °C gedurende 5 seconden.
 - e Stel dan in op 4 °C.

Procedure

- 1 Plaats de bibliothekenplaat op de voorgeprogrammeerde thermocycler en voer het denatureringsprogramma uit.



OPMERKING

De bibliothekenplaat niet denatureren voordat de kwantificering heeft voldaan aan de QC metriek, omdat u de kwantificering mogelijk opnieuw wilt doen.

- 2 Centrifugeer de biblioteekenplaat bij 1000 × g gedurende 20 seconden.
- 3 Selecteer **OK** in de workflowmanager om te beginnen met het poolen van de bibliotheken.
- 4 Als de VeriSeq NIPT-methode nog niet is geopend:
 - a Open de AppLauncher en selecteer **VeriSeq NIPT Method** (VeriSeq NIPT-methode).
 - b Voer de batch-ID en de gebruikersnaam in en selecteer dan **OK**.
- 5 Selecteer de poolconcentratie en selecteer dan **OK**.
Pas indien nodig de poolingconcentratie aan om de beoogde clusterdichtheid van 220–260 k/mm² te bereiken.
- 6 Als de workflowmanager dit vraagt, voer dan een van de volgende stappen uit:
 - ▶ Om een monsterformulier te laden, selecteer het monsterformulier voor de batch en selecteer dan **Load** (Laden).
 - ▶ Selecteer **Use Default** (standaard gebruiken) voor alle instellingen om de standaardwaarden van het systeem te gebruiken voor de resterende monstertypen, de geslachtsrapportage of het screeningstype. Voor informatie over het aanmaken van een monsterformulier, zie de *VeriSeq NIPT Solution v2-softwarehandleiding (documentnr. 1000000067940)*.



LET OP

Voordat u de optie Use Default (standaard gebruiken) selecteert, moet u ervoor zorgen dat u standaardwaarden hebt ingesteld in de servicetools van de workflowmanager. Als dit wordt nagelaten, kan dit leiden tot een onvolledige analyse van de monsters.

- 7 Selecteer **Start** om de timer te starten voor het denatureren van de plaat.
- 8 Laad de tips als volgt op de tipdragers.

Monsterbatchgrootte	Drager Type	Spoor	Artikel	Locatiepositie
24, 48, 96	Tip	7–12	Filtertips van 50 µl	1

- 9 Laad de gedenatureerde bibliotheekplaat (barcode naar rechts gericht) als volgt op de Multiflex-drager en selecteer dan **OK**.

Monsterbatchgrootte	Drager Type	Spoor	Artikel	Locatiepositie
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Gedenatureerde bibliotheekplaat (met barcode)	1

- 10 Laad de poolingbuisjes als volgt op de buisdrager en selecteer dan **OK**.

Monsterbatchgrootte	Drager Type	Spoor	Artikel	Locatiepositie
24, 48	Buisje	46	Nieuw 2 ml-buisje, Pool A	1
96	Buisje	46	Nieuw 2 ml-buisje, Pool A	1
			Nieuw 2 ml-buisje, Pool B	2

- 11 Laad de reagensbakjes als volgt op de reagensdrager en selecteer dan **OK**.

Monsterbatchgrootte	Drager Type	Spoor	Artikel	Locatiepositie
24, 48, 96	Reagens	47	3 ml hybridisatiebuffer	1

- 12 Laad de tips als volgt op de tipdragers.

Monsterbatchgrootte	Drager Type	Spoor	Artikel	Locatiepositie
24, 48, 96	Tip	49–54	Filtertips van 1000 µl	1
			Filtertips van 300 µl	2
			Filtertips van 50 µl	3

- 13 Voer de locatie van de eerste en laatste tip voor elk tiprek in en selecteer dan **OK**.
- 14 Controleer of de dragers, laboratoriumbenodigdheden en reagentia correct zijn geladen, selecteer dan **OK** in het scherm Pooling Deck Verification (verificatie poolingdek).
- 15 Observeer de ML STAR tijdens de automatische stappen.
- 16 Voer opmerkingen in over aangetaste monsterputjes en selecteer dan **OK**.
- 17 Wanneer de workflowmanager dit aangeeft, controleer dan of het ML STAR-laaddek vrij is van obstructies zodat de ML STAR de dragers kan uitladen.
- 18 Selecteer **Unload** (uitladen) om het dek uit te laden.
- 19 Laad de buisdrager uit.
- 20 Plaats een dop op elke poolingbuis, vortex en centrifugeer kort.
- 21 Selecteer **OK**.
- 22 Sequence de bibliotheken zo snel als mogelijk na pooling. Zo nodig de bibliothekenplaat afsluiten met afdekfolie en maximaal 7 dagen bewaren bij 25 °C tot 15 °C om opnieuw te kunnen poolen.

VEILIG STOPPUNT

Als u stopt, moeten de doppen op de poolingbuisjes worden gedaan en de buisjes maximaal 7 dagen worden opgeslagen bij -25 °C tot -15 °C.

Gepoolde bibliotheken voorbereiden voor sequencing

Voorbereiden

- 1 Prepareer de volgende reagentia:

Artikel	Opslag	Instructies
Poolbuisjes	-25 °C tot -15 °C	Wanneer eerder opgeslagen geweest, ontdooien op kamertemperatuur. Vortex kort. Centrifugeer kort.

- 2 Bereid het next-generation sequencingsysteem voor door de volgende velden in te vullen in de Local Run Manager VeriSeq NIPT-module:

- a Run Name (Naam run)

- b Run Description (Beschrijving run) (optioneel)
- c Pool Barcode (Barcode pool)

Raadpleeg voor meer informatie over het gebruik van de Local Run Manager VeriSeq NIPT-module de *VeriSeq NIPT Solution v2-softwarehandleiding (documentnr. 100000067940)*.



LET OP

De in de Local Run Manager-module ingevoerde barcode van de pool moet overeenkomen met de barcode van de pool die in de workflowmanager is ingevoerd. Onjuiste runconfiguraties worden door de analysesoftware afgewezen en de sequencing moet mogelijk worden herhaald.

In de volgende procedure wordt beschreven hoe de gepoolde bibliotheken correct worden geladen op een next-generation sequencinginstrument met een cartridge.

Procedure

- 1 Voeg de volgende verbruiksartikelen toe aan de reagenscartridge en pipetteer om te mengen.
 - ▶ 900 µl hybridisatiebuffer
 - ▶ 450 µl Pool A
- 2 Ga verder met sequencing met een next-generation sequencing-systeem.
Raadpleeg voor instructies voor het sequencen de handleiding voor het next-generation sequencing-instrument. Raadpleeg voor een NextSeq 550Dx de *handleiding voor het NextSeq 550Dx-instrument (documentnr. 100000009513)* of de *bijsluiter van het NextSeq 550Dx-instrument (documentnr. 100000043133)*.
- 3 Herhaal deze procedure zo nodig voor Pool B.
 - ▶ Om de beoogde clusterdichtheid te bereiken, kan de bibliotheekplaat met de Hamilton opnieuw worden gepoold met een andere poolconcentratie. Door opnieuw te poolen wordt de oorspronkelijke pool ongeldig.
 - ▶ Om de beoogde clusterdichtheid te bereiken, kan ook de verhouding van pool tot HT1 (450+900 ul) worden gewijzigd.

Next-generation sequencing

De VeriSeq NIPT Solution v2 is te gebruiken met een next-generation sequencer met de volgende specificaties:

- ▶ capaciteit van 2x36 paired-end aflezingen;
- ▶ compatibel met indexadapters in de VeriSeq NIPT-monstervoorbereidingskit;
- ▶ tweekanaals-chemie;
- ▶ automatische productie van .BCL-bestanden (onbewerkte gegevens van sequencinginstrument);
- ▶ 400 miljoen paired-end aflezingen per run;
- ▶ compatibel met VeriSeq NIPT-assaysoftware v2.

De NextSeq 550Dx is compatibel met de VeriSeq NIPT Solution v2.

Analyse sequencinggegevens

Na voltooiing van de sequencing worden de sequencinggegevens automatisch naar de VeriSeq NIPT-assaysoftware v2 gestuurd voor analyse en rapportage. Het rapport omvat classificaties voor elk monster in de batch, alsmede een beoordeling van alle QC-metrieken van de runs. Voor een batch met 48 monsters duurt het analyseproces vanaf het moment van voltooiing van de sequencing tot het definitieve resultaat ongeveer 4 uur. Voor gedetailleerde informatie over de gegevensanalyse en het uitvoerbestand, zie de *VeriSeq NIPT Solution v2-softwarehandleiding (documentnr. 100000067940)*.

Interpretatie van de resultaten

Het VeriSeq NIPT Solution v2-algoritme maakt gebruik van een geavanceerd statistisch model dat verschillende soorten informatie uit de verzameling van paired-end sequencingbibliotheekfragmenten combineert. Met dit model worden regio's van het genoom gedetecteerd die onder- of oververtegenwoordigd zijn in de bibliotheek van elk monster. Het is zo dat dit model er rekening mee houdt of de mate van onder- of oververtegenwoordiging kwantitatief consistent is met een aneuploïd voorval in het foetale genoom in het foetale-fractiepercentage dat voor de bibliotheek is geschat.

Voor alle chromosomen worden paired-end sequencing-gegevens uitgelijnd met het referentiegenoom (HG19). Alleen unieke, niet-geduplicateerde uitgelijnde sequenties worden samengevoegd in bins van 100 kb. Voor de bijbehorende bintellingen is rekening gehouden met GC-vertekening en eerder vastgestelde regio-specifieke genomische dekking. Op basis van dergelijke gestandaardiseerde bintellingen worden de statistische scores afgeleid voor elk autosoom door de dekkingsregio's waar aneuploidie aanwezig kan zijn te vergelijken met de rest van de autosomen. Er wordt een aannemelijkheidsquotiënt (LLR) berekend voor elk monster, rekening houdend met deze scores op basis van dekking en de geschatte foetale fractie. Het aannemelijkheidsquotiënt is de waarschijnlijkheid dat er in een monster afwijkingen aanwezig zijn op basis van de waargenomen dekking en foetale fractie versus de waarschijnlijkheid dat er in een monster geen afwijkingen aanwezig zijn gezien dezelfde waargenomen dekking. De geschatte onzekerheid op het gebied van de foetale fractie wordt ook meegenomen in de berekening van deze ratio. Voor daaropvolgende berekeningen wordt het natuurlijke logaritme van de ratio gebruikt. De assaysoftware beoordeelt de LLR voor elk doelchromosoom en elk monster om een bepaling voor aneuploidie te geven.

Tijdens het aanmaken van de batch wordt voor elk monster het type monster (enkelvoudig of tweeling), het screeningstype (basis of genoombreed) en de geslachtschromosoomrapportage (Yes, No en SCA) opgegeven dat/die gewenst is. Samen bepalen deze opties welke informatie voor elk monster wordt gerapporteerd.

Voor alle monstertypen bepaalt het screeningstype welke autosomale anomalieën worden gerapporteerd. Voor het basisscreeningstype worden alleen volledig-chromosoomtrisomievoorvallen gemeld waarbij de chromosomen 13, 18 en 21 betrokken zijn. Voor het genoombrede screeningstype worden volledige of partiële chromosoomdeleties of -duplicaties van een autosomaal chromosoom gerapporteerd. De lengte van de kleinste partiële chromosoomdeletie of -duplicatie die kan worden gerapporteerd is 7 Mb.

Voor monsters van enkelvoudige zwangerschappen kunt u de geslachtschromosoomrapportage uitschakelen. Ook is in te stellen dat aneuploidieën van geslachtschromosomen met of zonder vermelding van het geslacht van euploïde monsters worden gerapporteerd.

Voor tweelingmonsters geldt dat als Yes (ja) is geselecteerd voor geslachtschromosoomrapportage, het resultaat beperkt is tot rapportage van de aan- of afwezigheid van een Y-chromosoom in de bibliotheek. Voor tweelingmonsters kan geen aneuploidie van geslachtschromosomen worden gerapporteerd.

Het resultaat ANOMALY DETECTED (anomalie gedetecteerd) geeft aan dat het monster positief test op een of meer anomalieën, overeenkomstig het geselecteerde screeningstype en de geselecteerde optie voor geslachtschromosoomrapportage. Bij detectie van een anomalie wordt in het rapport een beschrijving van de anomalie in cytogenetische notatie gegeven.

Aan de hand van statistiek die tijdens de sequencing is gegenereerd, geeft VeriSeq NIPT Assay Software v2 voor elk monster een fetal fraction estimation (FFE, schatting foetale fractie). De FFE is de geschatte foetale cfDNA-component die door de assay wordt bepaald en voor elk monster als afgerond percentage wordt gerapporteerd. De gemiddelde standaarddeviatie van deze schatting voor alle monsters is 1,3%. Wanneer resultaten worden gerapporteerd, mag de FFE niet op zichzelf staand worden gebruikt om monsters uit te sluiten.

Om conclusies over chromosomale samenstellingen te trekken, gebruikt de VeriSeq NIPT-assaysoftware v2 de individuele betrouwbaarheidstest voor foetale aneuploidie (iFACT, individualized Fetal Aneuploidy Confidence Test), een dynamische drempelwaardemetriek die aangeeft of het systeem voldoende sequencingdekking heeft gegenereerd, gezien de geschatte foetale fractie van elk monster.

Negatieve uitslagen worden alleen gerapporteerd als het monster aan de iFACT-drempelwaarde voldoet. Als een monster deze drempelwaarde niet haalt, wordt er in de QC-beoordeling FAILED iFACT (iFACT mislukt) weergegeven en genereert het systeem geen resultaat.

De VeriSeq NIPT Assay Software v2 beoordeelt tijdens de analyse naast iFACT verschillende andere QC-metrieken. De aanvullende metrieken zijn beoordeling van de dekkingsuniformiteit van genomische referentieregio's en de verdeling van de cfDNA-fragmentlengtes. De QC-beoordeling geeft alleen een QC-waarschuwing of QC-mislukking weer voor metrieken buiten het aanvaardbare bereik. Als de QC mislukt, genereert het systeem geen resultaat voor het monster. Als de QC van een monster mislukt, kan het monster opnieuw worden verwerkt, mits het bloedafnamebuisje voldoende plasma bevat.

De VeriSeq NIPT Solution v2 genereert gegevens voor een definitief rapport. Er wordt geen definitief rapport voor de patiënt gegenereerd. De klant is verantwoordelijk voor de vormgeving en de inhoud van het definitieve rapport dat de behandelende arts krijgt. Illumina is niet verantwoordelijk voor de nauwkeurigheid van de tekst in het definitieve rapport voor klanten.



LET OP

Controleer de geschatte foetale fractie van alle monsters. Als de schattingen van de foetale fractie voor alle monsters binnen een run ongeveer gelijk zijn, kan er sprake zijn van vermenging van monsters die de resultaten heeft beïnvloed. Neem contact op met de technische ondersteuning van Illumina voor hulp bij het oplossen van problemen.

Werkingeigenschappen

De volgende gegevens in de paragrafen Klinische prestaties en Analytische prestaties zijn gegenereerd door gebruikmaking van de protocollen en materialen als genoemd in de Gebruiksaanwijzing vanaf plasma. Alle sequencinggegevens voor deze paragraaf zijn gegenereerd met een NextSeq 500/550-sequencingstelsel of een NextSeq 550Dx-sequencingstelsel met de volgende configuraties:

	NextSeq 500/550	NextSeq 550Dx
Op het instrument geïnstalleerde software	NextSeq-besturingssoftware 4.0	NextSeq-besturingssoftware 1.3
Versie reagenskit	NextSeq 500/550-reagenskit met hoge output v2.5 (75 cycli)	NextSeq 550Dx-reagenskit met hoge output v2.5 (75 cycli)
Sequencingmethode	2x36 paired-end sequencing-run in hoge outputmodus	2x36 paired-end sequencing-run in hoge outputmodus

Klinisch onderzoek

De klinische nauwkeurigheid van de VeriSeq NIPT Solution v2 werd aangetoond door beoordeling van plasmamonsters afkomstig van zwangere vrouwen met een enkelvoudige zwangerschap of een tweelingzwangerschap. De monsters werden verkregen uit anoniem opgeslagen plasmamonsters uit perifere volbloedmonsters die eerder waren verwerkt. Meer dan 45.000 monsters werden onderzocht op geschiktheid voor opname in het onderzoek. Deze monsters waren eerder prenataal gescreend op foetale chromosomale aneuploidieën en partiële deleties en duplicaties van 7 Mb of meer. Alle monsters van de aangedane zwangerschappen en een subset van opeenvolgende monsters van niet-aangedane zwangerschappen kwamen voor onderzoek in aanmerking indien er klinische resultaten waren en aan de monstercriteria werd voldaan. In totaal bevatte de testanalyse-set 2335 monsters. In deze set waren 2328 monsters afkomstig van enkelvoudige zwangerschappen en waren zeven monsters afkomstig van tweelingzwangerschappen.

Van deze monsters mislukte bij 28 (1,2%, 28/2335) monsters de QC van de assay bij de eerste run tijdens de analyse van de voltooide sequencinggegevens:

- 27 gevallen van mislukte iFACT (één XO, 26 niet aangedaan);
- één fout vanwege gegevens buiten verwacht bereik.

Demografische gegevens en kenmerken zwangerschap

In **Tabel 7** worden de leeftijd van de moeder, de zwangerschapsduur en het trimester van de zwangerschap weergegeven voor de monsters in de genoombrede screening, inclusief bekende mozaïekmonsters.

De demografische gegevens van de basis- en genoombrede cohorten bleken na beoordeling geen statistisch verschil te vertonen. De demografische gegevens en de zwangerschapskenmerken waren vergelijkbaar, inclusief of exclusief bekende mozaïeken.

Tabel 7 Demografische gegevens en kenmerken zwangerschap

Overzicht statistiek	Genoombreed (inclusief bekende mozaïeken)
Aantal monsters	2307*
Leeftijd moeder – jaren	
Gemiddeld	35,08
Standaarddeviatie	4,04
Mediaan	34,95
25e percentiel, 75e percentiel	32,31, 37,79
Minimum, maximum	20,22, 53,02
Zwangerschapsduur op het moment van bloedafname - weken	
Gemiddeld	10,93
Standaarddeviatie	1,20
Mediaan	10,57
25e percentiel, 75e percentiel	10,29, 11,14
Minimum, maximum	10,00, 27,86
Zwangerschapstrimester – n (%)	
< Eerste (<14 weken)	2.252 (98%)
Tweede	54 (2%)
Derde (≥ 27 weken)	1 (0%)

* De gepresenteerde definitieve monsters bevatten 7 tweelingen.

Klinische prestaties

De resultaten als verkregen met de VeriSeq NIPT Solution v2 werden vergeleken met de klinische referentienormresultaten. Alle onderzoeksmonsters hadden klinische referentienormuitkomsten (klinische waarheid) die gerelateerd waren aan foetale chromosomale aneuploidie en partiële deleties en duplicaties van 7 Mb of meer. Het klinische referentienormresultaat voor de monsters in dit onderzoek hing af van de resultaten van de chromosoomanalyse of een lichamelijk onderzoek bij pasgeborenen met een NGS-gebaseerde negatieve NIPT-screening. Getraind onderzoekspersoneel classificeerde de klinische referentienormgegevens in overeenstemming met het document voor medische codering van de sponsor.

Als methoden voor de chromosoomanalyse werden onder meer karyotypering, fluorescentie-in-situhybridisatie (FISH) of op chromosomale microarray (CMA) gebaseerde vergelijkende genomhybridisatie gebruikt. Er werden chromosoomanalyses gedaan met perifeer bloed of speeksel van pasgeborenen of zuigelingen, monsters van conceptieproducten (POC), amniocyten, chorionvlokken, placentaweefsels of postnataal navelstrengbloed.

Mosaïcisme wordt gedefinieerd als de aanwezigheid van twee of meer cellijnen met een verschillende chromosoomsamenstelling bij een persoon. De cellijnen zijn afkomstig van dezelfde zygoöt. Het type en de omvang van mosaïcisme varieert en is afhankelijk van het moment tijdens de embryogenese en de foetale ontwikkeling waarop er mozaïekvorming optreedt. In prenatale diagnoses komen verschillende typen

mosaïcisme voor, afhankelijk van de verdeling van abnormale versus normale cellijnen over cytotrofoblast, mesenchym of de foetus.¹⁰ Hoewel mosaïcisme bij elke chromosoomafwijking kan worden aangetroffen, is de prevalentie van mosaïcisme bij zeldzame trisomieën hoger dan bij de trisomieën van de chromosomen 21, 18 en 13 (T21, T18 en T13).¹¹ In de prestatiebeoordeling zijn mozaïekgevallen in de genoombrede analyse opgenomen, omdat dit screeningstype voor deze assay tot doel heeft zeldzame autosomale aneuploïdieën (RAA's) te detecteren.

Prestaties basisscreening

De anomalieën voor de basisscreening omvatten T21, T18 en T13. In de analyse waren in totaal 2243 monsters afkomstig van enkelvoudige zwangerschappen en tweelingzwangerschappen opgenomen. Alle zeven tweelingzwangerschappen werden correct gedetecteerd als T21 en worden niet vermeld in de volgende tabel.

Tabel 8 Gevoeligheid en specificiteit van de VeriSeq NIPT Solution v2 met betrekking tot de detectie van trichosomieën 21, 18 en 13 in een basisscreening voor enkelvoudige zwangerschappen (exclusief bekende mozaïeken)

	T21	T18	T13
Gevoeligheid	>99,9% (130/130)	>99,9% (41/41)	>99,9% (26/26)
2-zijdig 95%-BI	97,1%, 100%	91,4%, 100%	87,1%, 100%
Specificiteit	99,90% (1982/1984)	99,90% (1995/1997)	99,90% (2000/2002)
2-zijdig 95%-BI	99,63%, 99,97%	99,64%, 99,97%	99,64%, 99,97%

De assayprestaties in de basisscreening zoals weergegeven in Tabel 8 zijn berekend met uitsluiting van een subset van 64 monsters met RAA's, autosomale partiële deleties of duplicaties, of bekend mosaïcisme. Van deze 64 monsters waren er acht T21- en drie T18-mozaïek. Bij vijf van deze 11 monsters werd vastgesteld dat de anomalie aanwezig was die door de VeriSeq NIPT Assay Software v2 werd gedetecteerd.

Prestaties genoombrede screening

Voor de genoombrede screening omvat elke anomalie trisomieën, monosomieën en partiële deleties of duplicaties van 7 Mb of meer. De monsters voor het genoombrede onderzoek bevatten 36 monsters met bekend mosaïcisme. In totaal werden 2307 monsters afkomstig van enkelvoudige zwangerschappen en tweelingzwangerschappen getest. Alle zeven tweelingzwangerschappen werden correct gedetecteerd als een chromosoom 21-anomalie en worden niet vermeld in de volgende tabellen.

Prestaties genoombrede screening voor elke anomalie

Tabel 9 Gevoeligheid en specificiteit van de VeriSeq NIPT Solution v2 voor de detectie van elke anomalie in de genoombrede screening (inclusief bekende mozaïeken)

	Gevoeligheid	Specificiteit
Schatting % (n/N)	95,5% (318/333)	99,34% (1954/1967)
2-zijdig 95%-BI	92,7%, 97,3%	98,87%, 99,61%

Prestaties genoombrede screening voor zeldzame autosomale aneuploïdie

Tabel 10 Gevoeligheid en specificiteit van de VeriSeq NIPT Solution v2 voor zeldzame autosomale aneuploïdie (Rare Autosomal Aneuploidy (RAA)) in de genoombrede screening (inclusief bekende mozaïeken)

	Gevoeligheid	Specificiteit
Schatting % (n/N)	96,4% (27/28)	99,80% (2001/2005)
2-zijdig 95%-BI	82,3%, 99,4%	99,49%, 99,92%

Prestaties genoombrede screening voor partiële deleties en duplicaties

Tabel 11 Gevoeligheid en specificiteit van de VeriSeq NIPT Solution v2 voor partiële deleties en duplicaties van 7 Mb of meer in de genoombrede screening (inclusief bekende mozaïeken)

	Gevoeligheid	Specificiteit
Schatting % (n/N)	74,1% (20/27)	99,80% (2000/2004)
2-zijdig 95%-BI	55,3%, 86,8%	99,49%, 99,92%

Verschillen in prestaties tussen de basis- en de genoombrede screening

De basis- en de genoombrede screening hebben dezelfde scoremethode voor veel voorkomende trisomieën en aneuploïdieën van geslachtschromosomen. Bij de basisscreening wordt het algoritme alleen toegepast op T21, T18 en T13. De genoombrede screening is echter een uitbreiding van deze methodologie en beoordeelt alle trisomieën en RAA's en partiële duplicaties en deleties.

Er zijn twee verschillen in de beschreven prestatierapportage tussen de basis- en de genoombrede screening. Ten eerste werden voor de genoombrede screening monsters met bekend mosaïcisme voor zowel veel voorkomende trisomieën als RAA's en partiële deleties en duplicaties meegenomen voor de prestatimetrie. Ten tweede kan de genoombrede screening eerder de detectie van een partiële duplicatie of deletie rapporteren dan een volledige trisomie. De aanwezigheid van een volledige trisomie naast een partiële duplicatie of deletie is af te leiden uit de LLR-score in het aanvullende rapport.

Opname van mozaïeken in de genoombrede screening

Mosaïcisme wordt beschouwd als een beperking van deze assay. Bij aanwezigheid van mosaïcisme is het foetale signaal van een anomalie verzwakt en is het dus mogelijk moeilijker te detecteren zonder de algehele specificiteit van de assay te verstoren. Omdat mosaïcisme echter relevanter is voor een breder beeld, werden monsters met mosaïcisme opgenomen in de genoombrede screening.

Van de 64 monsters die in de genoombrede screening waren opgenomen maar niet in de basisscreening, werd van 36 monsters vastgesteld dat zij mosaïcisme vertoonden volgens de klinische referentienorm. Van deze 36 monsters kwamen er 23 overeen met de klinische referentienorm.

Detectie partiële deletie of duplicatie versus aneuploïdie gehele chromosoom

De VeriSeq NIPT Solution v2 heeft in het menu een optie voor een basisscreening of een genoombrede screening. In de basisscreening wordt het resultaat ANOMALY DETECTED (anomalie gedetecteerd) alleen gemeld bij de detectie van een volledige aneuploïdie op chromosomen 21, 18 of 13 en als aan alle kwaliteitscontrolemeetwaarden wordt voldaan. In de genoombrede screening detecteert het systeem aneuploïdie in alle autosomen en partiële deleties en duplicaties van ten minste 7 Mb.

Bij gebruik van de genoombrede screening geeft het systeem er voorrang aan een partiële deletie of duplicatie te rapporteren boven betrokkenheid van het hele chromosoom als de omvang van de partiële deletie of duplicatie minder dan of gelijk is aan 75% van het chromosoom waarop het voorval wordt gedetecteerd. Als de gedetecteerde partiële deletie- en duplicatieregio meer dan 75% van het chromosoom uitmaakt, wordt het voorval gerapporteerd als een volledige trisomie of monosomie van het gehele chromosoom. Aanzienlijk grote deleties en duplicaties die minder dan 75% van het chromosoom uitmaken, kunnen daarom een aanwijzing zijn voor een aneuploïdie van het gehele chromosoom.

Voor alle monsters is de LLR-score voor de classificatie van het gehele chromosoom te vinden in het aanvullende rapport. De LLR-score moet worden getoetst aan de gespecificeerde grenswaarde in [Afbeelding 2 op pagina 42](#) alvorens het resultaat te interpreteren. Als LLR-scores op chromosoomniveau de grenswaarde overschrijden, betekent dit verdere ondersteuning van een interpretatie die consistent is met een aneuploïdie van het gehele chromosoom.

In het klinische onderzoek hadden twee monsters van enkelvoudige zwangerschappen aanzienlijk grote duplicaties (één op chromosoom 21 en één op chromosoom 18) die minder dan 75% van de relatieve grootte van het chromosoom uitmaakten (zie [Tabel 12](#)). Beide voorvallen werden voor dat chromosoom gerapporteerd als een partiële duplicatie en niet als een volledige trisomie. De LLR-scores voor deze voorvallen lagen boven de

grenswaarde die consistent is met een positieve uitslag voor een volledige trisomie. Voor een melding van een partiële duplicatie of een volledige trisomie bestaat de vervolgbehandeling voor een melding van positieve NIPT erin dat de patiënt een bevestigingstest via prenatale diagnose krijgt.

Tabel 12 Voorbeelden van in de genoombrede screening geïdentificeerde voorvallen van grote duplicaties

	Klinische waarheid	Resultaat genoombrede systeem	Grootte anomalie (Mb)	% van chromosoom	LLR-scores
Monster 1	Trisomie 21 enkelvoudige zwangerschap	Partiële duplicatie op 21	22,50	48,9%	19,43
Monster 2	Trisomie 18 enkelvoudige zwangerschap	Partiële duplicatie op 18	47,00	60,2	12,99

Zie voor aanvullende informatie over de kwaliteitscontrolemetriek waarmee aneuploïderesultaten worden gerapporteerd de *VeriSeq NIPT Solution v2-softwarehandleiding (documentnr. 1000000067940)*.

Geslachtschromosomen

De VeriSeq NIPT Solution-geslachtschromosoomresultaten werden vergeleken met de klinische referentienormresultaten en staan in de volgende tabel vermeld. Het percentage concordantie werd voor elk geslachtschromosoom binnen elk klinisch referentienormresultaat berekend. Het percentage concordantie werd berekend als het aantal monsters waarin het VeriSeq NIPT Solution v2-geslachtschromosoomresultaat overeen kwam met de klinische referentienormclassificatie, gedeeld door het totaal aantal monsters met dezelfde klinische referentienormclassificatie.

Tabel 13 Percentage concordantie voor de foetale geslachtsclassificatie*

Foetale geslachtsclassificatie		Fenotype op basis van het lichamelijk onderzoek van de pasgeborene		Cytogenetische resultaten							
Gedetecteerd	Karyotype	Vrouwelijk	Mannelijk	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY	Overig**	Ontbreekt
Geen anomalie gedetecteerd	XX	997	0	21	0	2	0	0	0	0	0
Geen anomalie gedetecteerd	XY	0	966	0	15	0	0	0	0	0	1
Anomalie gedetecteerd	XO	0	0	0	0	19	0	0	1	0	0
Anomalie gedetecteerd	XXX	0	0	0	0	0	17	0	0	1	0
Anomalie gedetecteerd	XXY	0	0	0	0	0	0	23	0	1	0
Anomalie gedetecteerd	XYY	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0
Totaal		997	966	21	15	21	17	23	12	2	1
Percentage concordantie		100	100	100	100	90,5	100	100	91,7	Niet van toepassing	Niet van toepassing

* Vijf tweelingzwangerschappen werden correct geclassificeerd als Y aanwezig. Twee zwangerschappen werden correct geclassificeerd als Y niet aanwezig.

** Overige cytogenetische resultaten waren XXXXX en XXYY.

Positieve voorspellende waarde en negatieve voorspellende waarde van de VeriSeq NIPT Solution v2

De positieve voorspellende waarde (PVW) en de negatieve voorspellende waarde (NVW) van de test bieden informatie over het nut van de test bij klinische besluitvorming op basis van testgevoeligheid, -specificiteit en de pretestwaarschijnlijkheid dat een foetus trisomie heeft (prevalentie). Omdat de PVW en NVW afhankelijk zijn van prevalentie en de prevalentie van deze aneuploidieën onder de verschillende proefpersoonpopulaties kan variëren, werden de PVW en NVW berekend voor een reeks plausibele prevalentiewaarden op basis van de gevoeligheids- en specificiteitswaarden als waargenomen in de basisscreening (zonder bekende mozaïeken) van het klinische nauwkeurigheidsonderzoek. Tabel 17 is gebaseerd op de genoombrede screening (met bekende mozaïeken).

Tabel 14 Prevalentie trisomie 21, PVW en NVW in basisscreening (exclusief bekende mozaïeken)

Prevalentie (%)	PVW (%)	NVW (%)
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 Prevalentie trisomie 18, PVW en NVW in basisscreening (exclusief bekende mozaïeken)

Prevalentie (%)	PVW (%)	NVW (%)
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 Prevalentie trisomie 13, PVW en NVW in basisscreening (exclusief bekende mozaïeken)

Prevalentie (%)	PVW (%)	NVW (%)
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 Elke anomalieprevalentie, PVW en NVW in genoombrede screening (inclusief bekende mozaïeken)

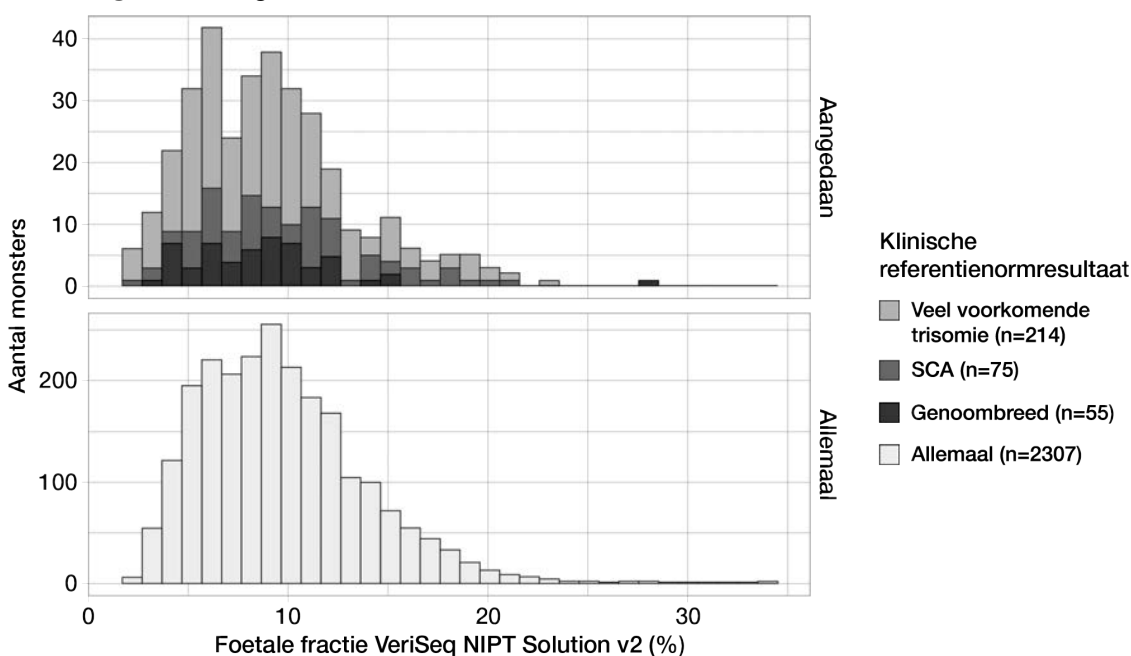
Prevalentie (%)	PVW (%)	NVW (%)
0,01	1,42	>99,99
0,02	2,81	>99,99
0,05	6,74	>99,99

Prevalentie (%)	PVW (%)	NVW (%)
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

Verdeling foetale fractie

Afbeelding 1 toont de verdeling van de schattingen van de foetale fractie (FF) van de VeriSeq NIPT Solution v2 van de genoombrede screening met mozaïeken per uitkomstcategorie van de klinische referentienorm.

Afbeelding 1 Verdeling foetale fractie



5 monsters hadden anomalieën in meerdere categorieën.
 Veel voorkomende trisomie waren monsters met trisomie 21, 18 en/of 13.
 Genoombreed waren monsters met RAA of partiele deleties en/of duplicaties.

De FF-schattingen liepen in totaal uiteen van 2% tot 34%, met een mediaan van 9% en een interkwartiel (IQ) bereik van 6% tot 12%. De mediane FF-schatting voor veel voorkomende trisomieën en voorvallen die door de genoombrede screening zijn gedetecteerd, bedraagt 8% en voor SCA's 9%. Het bereik van de FF-schattingen was consistent voor alle uitkomsten. Er is geen duidelijke verschuiving in de verdeling van FF tussen veel voorkomende trisomieën, SCA's, door de genoombrede screening gedetecteerde voorvallen of alle monsters in de genoombrede analyse.

Prestaties bij tweelingzwangerschappen

Schatting van prestaties voor trisomie 13, 18 en 21 en chromosoom Y bij tweelingzwangerschappen

Omdat tweelingzwangerschappen met trisomie 21, 18 en 13 minder vaak voorkomen, was er slechts een beperkt aantal aangedane tweelingmonsters beschikbaar voor het klinische onderzoek. Om de prestaties van de VeriSeq NIPT Solution v2 voor tweelingzwangerschappen te schatten, werden er *in-silico* modellen gebaseerd

op observaties van klinische monsters gebruikt om populaties tweelingzwangerschappen te simuleren. Deze simulatie was consistent met de beoogde gebruikspopulatie. De distributie van de foetale fractie werd bepaald aan de hand van ongeveer 4.500 tweelingmonsters en vergeleken met de distributie van ongeveer 120.000 enkelvoudige monsters. De distributie van de foetale fractie afhankelijk van de aneuploïdiestatus werd bepaald aan de hand van vermoedelijke enkelvoudige bepalingen (1044 maal trisomie 21, 307 maal trisomie 18 en 192 maal trisomie 13). De aneuploïdiedetectie bij tweelingen kon worden afgeleid door het samenvoegen van de twee distributies. Er werden paren dizygotische en monozygotische tweelingen gesimuleerd en er werd een gewogen gemiddelde genomen ter representatie van de prevalentie in de beoogde gebruikspopulatie (2 dizygotisch; 1 monozygotisch) om de sensitiviteit in te schatten. Er werden sets niet-beïnvloede tweelingen gesimuleerd voor het inschatten van de specificiteit.

De fractie van ieder gesimuleerd monster met de trisomie (d.w.z. de aangedane fractie) werd voor iedere monstercategorie op een andere manier berekend:

- ▶ De beïnvloede fractie voor monozygotische tweelingen werd voor ieder monster ingesteld op 1,0, omdat de trisomie in deze situatie beide baby's beïnvloedt.
- ▶ Er werd voor dizygotische tweelingen vanuit gegaan dat slechts één baby werd beïnvloed (het is uiterst zeldzaam dat beide dizygotische baby's worden beïnvloedt). Beïnvloede fractiewaarde werden gesimuleerd met behulp van de bekende distributie van de foetale fractieratio's die zijn bepaald aan de hand van monsters van tweelingen met verschillende geslachten. Er werd gekozen voor een conservatieve aanpak waarbij er vanuit werd gegaan dat, van de twee baby's, de beïnvloede baby altijd de laagste foetale fractie had. Er werd een correctiefactor toegepast, omdat de foetale fractie in zwangerschappen met trisomie 13 en 18 over het algemeen lager is.
- ▶ De beïnvloede fractie voor ieder monster van niet-beïnvloede tweelingen werd ingesteld op nul.

Voor tweelingen met trisomie 18 of 13 was de foetale fractie die overeenkwam met de aangedane fractie van het monster verminderd. De afname was evenredig met de gemiddelde afname van de foetale fractie die in klinische gegevens werd waargenomen bij enkelvoudige zwangerschappen met trisomie 18 of 13 tegenover enkelvoudige euploïdiezwangerschappen.

Zowel de totale foetale fractie als de aangedane fractie van ieder gesimuleerd monster werden vervolgens gebruikt om een aneuploïdiescore te berekenen aan de hand van het standaard VeriSeq NIPT Solution v2-algoritme. De gevoeligheid werd berekend door te bepalen hoe vaak de aneuploïdiescores van de gesimuleerde aangedane tweelingen boven de overeenkomstige aneuploïdiegrenswaarde lagen. De specificiteit werd overeenkomstig berekend door te bepalen hoe vaak de aneuploïdiescores van de gesimuleerde niet-aangedane tweelingen onder de overeenkomstige aneuploïdiegrenswaarde lagen (Tabel 18). Er werden betrouwbaarheidsintervallen van 95% geschat op basis van het aantal werkelijke klinische tweelingmonsters in de oorspronkelijke gegevensset, die werden geclassificeerd als aanwezigheid of afwezigheid van de desbetreffende trisomie.

Om een schatting te maken van de chromosoom Y-gevoeligheid in tweelingmonsters werden sets van XY/XY- en XX/XY-tweelingen gesimuleerd. Er werd een gewogen gemiddelde genomen dat hun prevalentie in de beoogde gebruikspopulatie vormt (1 XY/XY: 1 XX/XY). Voor een schatting van de chromosoom Y-specificiteit bij tweelingen werd een set van XX/XX-tweelingen gesimuleerd. De totale waarden van de foetale fractie werden gesimuleerd aan de hand van de bekende verdeling van de foetale fractie in klinische tweelingmonsters.

Voor XY/XY- en XX/XY-tweelingen werden de corresponderende chromosoom Y-scores geschat onder gebruikmaking van de bekende relatie tussen foetale fractie en chromosoom Y-scores in klinische monsters van enkelvoudige zwangerschappen die als mannelijk waren geclassificeerd. Alleen voor XX/XY-tweelingen werden de waarden van de aangedane (d.w.z. mannelijke) foetale fractie gesimuleerd onder gebruikmaking van de bekende verdeling van de verhoudingen van de foetale fractie tussen tweelingen van dezelfde zwangerschap, zoals bepaald uit klinische monsters van tweelingen met verschillende geslachten. Er werd een voorzichtige aanpak gevolgd waarbij de aangedane fractie zodanig werd gekozen dat deze correspondeerde met de kleinste van de twee tweelingen. Voor elk gesimuleerd XX/XY-monster werd de chromosoom Y-score vermenigvuldigd met de aangedane fractie.

Voor XX/XX-tweelingen werden de chromosoom Y-scores geselecteerd uit de scores die werden waargenomen in klinische monsters van enkelvoudige zwangerschappen die als vrouwelijk waren geclassificeerd. Vervolgens werd met behulp van het standaard VeriSeq NIPT Solution v2-algoritme op basis van de chromosoom Y-score en de totale foetale fractie elk gesimuleerd monster geclassificeerd als chromosoom Y aanwezig of chromosoom Y afwezig.

De gevoeligheid werd berekend door te bepalen hoe vaak de gesimuleerde XY/XY- of XX/XY-tweelingen correct werden geclassificeerd als chromosoom Y aanwezig. De specificiteit werd berekend door te bepalen hoe vaak de gesimuleerde XX/XX- tweelingen correct werden geclassificeerd als chromosoom Y afwezig. Er werden betrouwbaarheidsintervallen van 95% geschat op basis van het aantal werkelijke klinische tweelingmonsters in de oorspronkelijke gegevensset, die werden geclassificeerd als chromosoom Y aanwezig of chromosoom Y afwezig.

Tabel 18 Schattingen voor trisomie 21, 18 en 13 in een gesimuleerde populatie tweelingzwangerschappen

	Trisomie 21	Trisomie 18	Trisomie 13	Aanwezigheid van Y
Gevoeligheid	96,4%	95,7%	93,6%	>99,9%
2-zijdig 95%-BI	(86,4%, 98,9%)	(68,3%, 99,4%)	(64,1%, 98,9%)	(99,9%; >99,9%)
Specificiteit	99,9%	>99,9%	>99,9%	>99,9%
2-zijdig 95%-BI	(99,8%, >99,9%)	(99,9%; >99,9%)	(99,9%; >99,9%)	(99,7%, >99,9%)

Tabel 18 vermeldt puntschattingen en geschatte 95%-betrouwbaarheidsintervallen voor de gevoeligheid en specificiteit van de VeriSeq NIPT Solution v2 met betrekking tot de detectie van trisomie 21, 18, 13 en de aanwezigheid van Y in een gesimuleerde populatie tweelingzwangerschappen die overeenkwamen met de beoogde gebruikspopulatie. Betrouwbaarheidsintervallen werden geschat op basis van het aantal tweelingmonsters dat de QC haalde en werd beïnvloed of niet werd beïnvloed door de desbetreffende trisomie. De sensitiviteitsberekening gaat ervan uit dat twee derde van de beïnvloede tweelingzwangerschappen dizygotisch met één beïnvloede baby zijn, terwijl een derde van de beïnvloede zwangerschappen monozygotisch met twee beïnvloede baby's zijn.

De schattingen in Tabel 18 hebben alleen betrekking op tweelingzwangerschappen. De gegevens voor zwangerschappen met meer dan drie baby's waren, omdat deze minder vaak voorkomen, onvoldoende om geschikte statistische modellen te bepalen voor het schatten van de nauwkeurigheid van de aneuploidiedetectie.

Analytische prestaties

Precisie

Om de precisie van de assay te beoordelen en te kwantificeren, werden gegevens van twee eerdere onderzoeken van de VeriSeq NIPT Solution onderworpen aan een heranalyse met behulp van de analysepijplijnsoftware voor de VeriSeq NIPT Solution v2:

- ▶ Het multi-site reproduceerbaarheidsonderzoek dat bestond uit drie runs door drie operatoren op drie locaties met gebruikmaking van één partij reagens voor in totaal negen runs.
- ▶ Het intralaboratoriumprecisie-onderzoek dat bestond uit 12 runs op één locatie met gebruikmaking van twee ML STARS, twee sequencinginstrumentensystemen en drie partijen sequencingreagens.

Het precisieonderzoek had tot doel de precisie van de assay met betrekking tot trisomie 21 (T21) en chromosoom Y te kwantificeren en de variabiliteit tussen verschillende instrumenten, bibliotheekvoorbereidingskits en partijen sequencingreagens te schatten.

Door cfDNA, geëxtraheerd uit maternaal plasma van zwangere vrouwen (met een foetus met T21) te combineren met cfDNA, geëxtraheerd uit plasma van niet-zwangere vrouwen, werd een T21-pool met een foetale fractie van 5% gecreëerd. Daarnaast werd er een pool met maternaal-mannelijk cfDNA (XY-foetus) met een foetale fractie van 10% gecreëerd. Het monsterpanel voor elk onderzoek voor elke run omvatte 4 replicaten

van de monsterpool met T21, met een foetale fractie van 5% en 20 replicaten van de pool met maternaal-mannelijk cfDNA, met een foetale fractie van 10%. De testen vonden plaats over een periode van tien dagen, met in totaal 21 runs voor de twee onderzoeken samen.

Voor de beoordeling werden T21 en de aanwezigheid van chromosoom Y gekozen omdat dit representatieve klinische aandoeningen zijn en de detectie van de anomalie complex is. Als het kleinste menselijke autosoom heeft de grootte van chromosoom 21 een directe invloed op de gevoeligheid van de T21-detectie, vooral wanneer de foetale fracties laag zijn, zoals in dit onderzoek. Aangezien chromosoom Y aanwezig is in maternaal plasma, is het uitsluitend van foetale oorsprong en is het derhalve gemakkelijker detecteerbaar met de assay. Uit de waargenomen gemiddelde deviatie en standaarddeviatie voor de LLR-score voor chromosoom 21 en de gestandaardiseerde chromosomale waarden (NCV) voor chromosoom Y bleek dat de standaarddeviatie (SD) van de replicaten de grootste bron van variabiliteit was. Variatie tussen locaties, instrumenten en reagenspartijen verhoogde de variabiliteit in insignificante mate, blijkt uit het verschil tussen totale SD en SD van replicaten in [Tabel 19](#) en [Tabel 20](#).

Tabel 19 Overzicht van standaarddeviatie (SD) sequencingrespons, meerdere locaties (reproduceerbaarheid)

Respons	N	Gemiddeld	Replicaten-SD	Totale reproduceerbaarheid SD*
Chromosoom 21 LLR-score	36	34,43	11,36	11,36
Chromosoom Y-NCV	180	190,56	7,96	10,20

* Totaal omvat variabiliteit door locatie, operator, run, dag en replicaat.

Tabel 20 Overzicht van precisie sequencingrespons tussen laboratoria

Respons	N	Gemiddeld	Replicaten-SD	Totale SD, tussen laboratoria*
Chromosoom 21 LLR-score	48	36,01	9,07	10,25
Chromosoom Y-NCV	240	198,68	7,63	7,82

* Totaal omvat variabiliteit door sequencinginstrument, reagenspartij, operator, run, dag en replicaat.

Er werd een aanvullend onderzoek uitgevoerd om de sequencingprecisie van de VeriSeq NIPT Solution v2 (totale standaarddeviatie) met gebruikmaking van versie 2.0 van een stroomcel te vergelijken met die van versie 2.5. Het onderzoek omvatte twee typen stroomcellen (v2.0 en v2.5), drie sequencingkitpartijen, vier instrumentsystemen en twee sequencingruns per combinatie, met in totaal 48 runs op één locatie. Eén sequencingpool werd geprepareerd uit cfDNA-platen die handmatig waren geprepareerd. Het monsterpanel omvatte 4 replicaten van de monsterpool met T21, met een foetale fractie van 5% en 20 replicaten van de pool met maternaal-mannelijk cfDNA (XY-foetus), met een foetale fractie van 10%. De resultaten van het onderzoek zijn weergegeven in [Tabel 21](#) en bevestigen dat stroomcel v2.0 en stroomcel v2.5 niet verschillen in sequencingprecisie.

Tabel 21 Overzicht van sequencingresponsprecisie stroomcel v2.0 versus stroomcel v2.5

Respons	Aantal waarnemingen per versie	v2.0 totale SD*	v2.5 totale SD*	Statistisch resultaat**
Chromosoom 21 LLR-Rscore	96	9,56	8,44	Statistisch equivalent (p-waarde=0,25)
Chromosoom Y-NCV	480	7,74	7,38	Statistisch equivalent (p-waarde=0,38)

* Totaal omvat variabiliteit door sequencinginstrument, reagenspartij, run, dag, replicaat.

**Gebaseerd op F-test voor gelijkheid van varianties (standaarddeviaties in het kwadraat).

Kruisverontreiniging

De VeriSeq NIPT Solution-monstervoorbereidingworkflow werd beoordeeld op kruisverontreiniging. Er werden plasmapools van niet-zwangere vrouwen (XX) en volwassen mannen (XY) getest op 4 platen met elk 96 monsterputjes in een dambordpatroon. N=48 elk voor vrouwelijke en mannelijke monsters per plaat; in totaal

192 vrouwelijke en 192 mannelijke monsters. Geen van de vrouwelijke monsters vertoonde een Y-chromosoomdekking die statistisch gezien hoger was dan de geschatte achtergrond, hetgeen aantoont dat er geen sprake is van kruisverontreiniging van mannelijke monsters binnen dezelfde plaat. Er is geen detecteerbare kruisverontreiniging in de VeriSeq NIPT Solution waargenomen.

Mogelijk storende stoffen

De impact van mogelijk storende stoffen werd beoordeeld voor de VeriSeq NIPT Solution door beoordeling van de prestaties van de assay in aanwezigheid van dergelijke stoffen.

Albumine, bilirubine, hemoglobine en triglyceriden (endogeen) werden toegevoegd aan maternale plasmapools van niet-aangedane vrouwelijke (foetus XX) zwangerschappen. Voor elke teststof werden ze in twee concentraties getest (n=16 voor elk). Er werd geen storing in de prestaties van de assay gezien.

Tabel 22 Mogelijk storende stoffen (endogeen)

Teststof	Lage testconcentratie (mg/ml)	Hoge testconcentratie (mg/ml)
Albumine	35	50
Bilirubine	0,01	0,15
Hemoglobine	100	200
Triglyceride	1,5	5

Ook van nature voorkomend maternaal genomisch DNA (gDNA) in het plasma kan de assayprestaties verstoren, omdat dit samen met het foetale cfDNA kan worden geëxtraheerd. Genomische DNA-waarden van 1,6, 3,3 en 4,9 ng per monster (overeenkomend met 1, 2 en 3 standaarddeviaties boven de gemiddelde verwachte gDNA-concentratie na 7 dagen volbloedopslag¹² werden toegevoegd aan cfDNA, geëxtraheerd uit maternaal plasma van niet-aangedane vrouwelijke (foetus XX) zwangerschappen. De monsters werden vervolgens getest in de VeriSeq NIPT Solution (n=16 voor elke concentratie). Er werd geen storing in de prestaties van de assay gezien in aanwezigheid van verhoogde concentraties gDNA.

Twintig mogelijk storende stoffen (exogeen) op basis van geneesmiddelen die vaak worden gebruikt of voorgeschreven tijdens een zwangerschap werden getest volgens EP7-A2 (Storingstest in klinische chemie; goedgekeurde richtlijnen-tweede editie). De 20 mogelijk storende stoffen werden gecombineerd in vier pools, toegevoegd aan maternaal plasma van niet-aangedane vrouwelijke (foetus XX) zwangerschappen en getest in de VeriSeq NIPT Solution (N=16 voor elke pool). Er werd in aanwezigheid van deze exogene stoffen geen storing in de prestaties van de assay gezien.

Tabel 23 Mogelijk storende stoffen (exogeen)

Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 4
Paracetamol	Difeenhydramine	Albuterol	Cetirizine
Acetylcysteïne	Erytromycine	Bupropion	Dextromethorfan
Bisoprolol	Guafenesine	Cafeïne	L-ascorbinezuur
Citalopram	Heparine	Sertraline	Metoprolol
Desloratadine	Lidocaïne	Natriumfluoride	Nadolol

Detectielimiet

De detectielimiet (LOD) wordt gedefinieerd als de grootte van de foetale fractie waarbij de detectiekans van een te bestuderen aandoening, zoals T21, 95% is. Om de LOD van de VeriSeq NIPT Solution v2 voor diverse veel voorkomende aandoeningen te kunnen bepalen, werden onderzoeken en statistische analyses uitgevoerd.

De detectiekans van een te bestuderen aandoening in een aangedaan monster dat wordt verwerkt door de VeriSeq NIPT Solution v2 hangt hoofdzakelijk af van drie factoren:

- ▶ foetale fractie;
- ▶ sequencingdiepte;

- ▶ grootte en complexiteit van de te bestuderen genoomregio.

Uitgaande van een constante sequencingdiepte is een bepaalde aberratie gemakkelijker te detecteren in een monster met een hogere procentuele foetale fractie dan in een monster met een lagere procentuele foetale fractie. Omgekeerd is het zo dat, uitgaande van een constante foetale fractie, een bepaalde aberratie gemakkelijker te detecteren is in een monster met een hogere sequencingdiepte dan in een monster met een lagere sequencingdiepte. Ten slotte zijn aberraties in kleinere of complexere genoomregio's moeilijker te detecteren dan aberraties in grotere of minder complexe genoomregio's, uitgaande van een constante foetale fractie en sequencingdiepte.

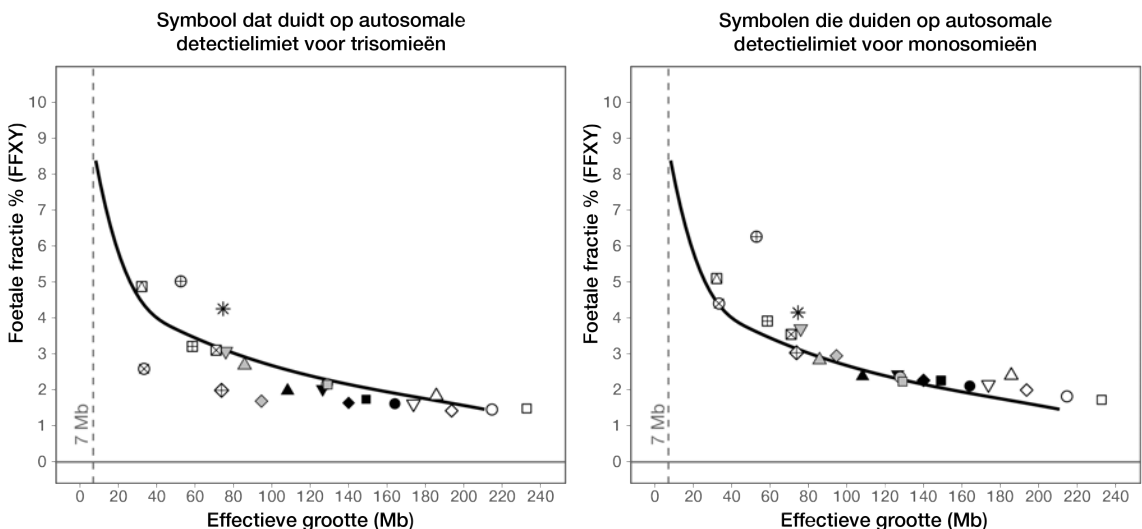
Om de LOD voor T21-detectie te bepalen, werden monsters geanalyseerd die bestonden uit mengsels van gepoolde T21-monsters en gepoolde niet-aangedane monsters. De twee typen analyten werden in een titratiereeks gemengd om zo een set van zeven foetale-fractiepercentages (0, 2, 3, 4, 5, 6 en 10%) te krijgen. Voor elk percentage waren er in totaal 10 replicaten.

Om de resolutie van het foetale-fractieraster voor de LOD-analyse verder te verhogen, werden de gegevens van dit onderzoek aangevuld met gegevens verkregen uit een in-silicoverdunning. De effecten van experimentele verdunning en titratie werden gesimuleerd door het gecontroleerd mengen van sequencinggegevens. De gegevens van deze in-silicotitratie bestreken een set van 14 foetale-fractiepercentages (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 en 4,50%), waarbij er voor elk percentage 32 replicaten waren. Met de resulterende gegevens werd een probit-analyse gedaan om de LOD voor T21 te bepalen.

Onafhankelijk daarvan werd op basis van foetale fractie, sequencingdiepte en genoomgrootte/-complexiteit een statistisch model ontwikkeld om de detectiekans van een aberratie in een monster te voorspellen. Dit model werd opgesteld aan de hand van de gegevens van een set van 1405 XY-monsters. De met dit model voorspelde LOD voor T21 bleek concordant te zijn met de hierboven beschreven probit-gebaseerde schatting. Met dit statistische model werden LOD-waarden geschat voor aneuploidieën in alle autosomen en voor partiële deleties en duplicaties.

Afbeelding 2 toont de 95%-detectiekans voor gemiddelde regio's op basis van grootte en de autosomale detectielimieten voor alle trisomieën en alle monosomieën.

Afbeelding 2 95%-detectiekans voor gemiddelde regio's op basis van grootte voor de VeriSeq NIPT Solution v2



Chr	Symbool	Trisomie		Monosomie	
		LLR-grenswaarde	LoD (%)	LLR-grenswaarde	LoD (%)
1	○	7	1.44	13.2	1.80
2	□	9	1.47	13.6	1.71
3	◇	5	1.41	13.8	1.99
4	△	7	1.82	15.2	2.39
5	▽	7.6	1.60	17	2.14
6	●	7.3	1.60	15.4	2.09
7	■	6.6	1.73	14	2.25
8	◆	5.8	1.63	14.8	2.25
9	▲	8	1.97	13.6	2.37
10	▼	8.8	2.01	14.7	2.42
11	⊙	12.2	2.14	15.7	2.35

Chr	Symbool	Trisomie		Monosomie	
		LLR-grenswaarde	LoD (%)	LLR-grenswaarde	LoD (%)
12	▣	11.6	2.14	12.8	2.22
13	◇	3	1.68	16.5	2.94
14	▲	12.7	2.68	14.7	2.82
15	▽	9.8	3.07	16.4	3.69
16	⊠	10.7	3.10	15.3	3.54
17	*	16.8	4.25	15.7	4.14
18	⊕	3	1.98	11.3	3.02
19	⊕	15.5	5.01	27.5	6.26
20	⊞	10.6	3.20	18.2	3.91
21	⊗	2.5	2.58	13.2	4.40
22	⊠	13.5	4.87	15.3	5.09

Problemen oplossen

Oplossen van problemen met de VeriSeq NIPT Solution v2

Foutmodus	Mogelijk resultaat	Interpretatie	Aanbevolen actie	Opmerkingen
Insufficient input plasma (Onvoldoende input plasma)	QC monster mislukt	Onvoldoende plasmavolume	Neem een nieuw monster.	Gebaseerd op visuele inspectie van het plasmavolume.
Blood tube failure (Fout bloedbuisje)	Geen scheiding van bloed in lagen	Het monster is niet gecentrifugeerd	Controleer of de centrifuge is gestart en of het busje met de juiste kracht is gecentrifugeerd. Neem een nieuw monster.	
		Onjuiste opslag of onjuist transport van het monster (hemolyse van monster)	Neem een nieuw monster.	Bevroren monsters scheiden niet. Onjuiste transport- of opslagomstandigheden kan hemolyse van monsters tot gevolg hebben.

Foutmodus	Mogelijk resultaat	Interpretatie	Aanbevolen actie	Opmerkingen
Sample clog / Slow flow (Verstopping door monster / trage flow)	Verontreiniging plasma	Individuele monsters kunnen de bindingsplaat doen verstopen als er sprake is van aanzienlijke verontreiniging in het plasmamonster	Inspecteer het monster; als het resterende plasma in het buisje rood of melkachtig is, moet het monster worden geannuleerd en moet er een nieuw monster worden genomen. Als het monster er normaal uitziet, moet het monster opnieuw worden getest.	
	Overlopen van monster	Onvoldoende visuele inspectie van elk buisje op geschiktheid van het monster.	Verklaar alle monsters in de nabije monsterputjes die door het overlopen zijn aangetast, ongeldig.	Kan duiden op onjuiste transport- of opslagomstandigheden van het monster voorafgaand aan de verwerking. U dient ongeschikte monsters uit te sluiten van verwerking.
	Hardwarestoring	Onvoldoende verwerking van het materiaal tijdens extractie	Test het monster opnieuw. Als het probleem bij de monsterputjes ook met andere monsters blijft optreden, moet u contact opnemen met de afdeling technische ondersteuning van Illumina.	
Quantification QC failure (QC kwantificering mislukt)	Mislukte kwantificeringsrun - Batchmediaan onder het minimum	Onvoldoende opbrengst procedure	Herhaal de kwantificering. Als deze herhaalde test opnieuw mislukt, moet u contact opnemen met de technische ondersteuning van Illumina.	Overschrijding van de standaardcurvemetrieken duidt op een probleem met het voorbereiden van de bibliotheek.
	Mislukte kwantificeringsrun	Mislukte standaardcurve	Herhaal de kwantificering. Als deze herhaalde test opnieuw mislukt, moet u contact opnemen met de technische ondersteuning van Illumina.	Veel voorkomende oorzaken van mislukte standaardcurve zijn onder meer niet goed ontdooide kwantificeringsreagentia, inconsistente volumes in putjes als gevolg van morsen en degradatie van DNA kwantificeringsreagens (bijvoorbeeld door blootstelling aan licht).
Pooling Failure (Pooling mislukt)	Pooling monster niet voltooid	Pooling Analysis (Poolinganalyse) is niet in staat de juiste poolvolumes te berekenen	Beoordeel de beoogde poolconcentratie opnieuw en herhaal de poolinganalyse.	Kan zich voordoen wanneer alle monsters in een partij lage kwantificeringswaarden hebben terwijl er een hoge poolconcentratie is ingesteld (gewoonlijk hoger dan 3 tot 5 pm).

Foutmodus	Mogelijk resultaat	Interpretatie	Aanbevolen actie	Opmerkingen
Individual Sample Analysis QC failure (QC individuele monsteranalyse mislukt)	QC-sequencing mislukt	Onvoldoende genetische input OF onjuiste overbrenging tijdens monsterhantering OF fout sequencingreagens	Controleer de monsterannotatie. Controleer of de resultaten van eerdere monsters in de betreffende plaatpositie vergelijkbaar zijn. Test het monster opnieuw.	Duidt op een slechte monsterinput of op een onjuiste overbrenging op de ML STAR. Onvoldoende genetisch materiaal kan het resultaat zijn van onvoldoende celvrij DNA in het plasma of van celgebaseerd DNA met oververdunding van het monster voor sequencing tot gevolg.
	Lage waarde voor FF of Non-Excluded Sites (NES, niet-uitgesloten locaties)	Onvoldoende gegevens gegenereerd voor een nauwkeurig resultaat	Test het monster afkomstig van plasma opnieuw.	

Problemen met de VeriSeq NIPT Microlab STAR oplossen

Processtap	Foutcode	Foutmelding	Omschrijving	Oplossing door de gebruiker
Batchcreatie	EM0044	The Batch ID entered contains forbidden characters. (De ingevoerde batch-ID bevat verboden karakters.)	De VeriSeq NIPT Solution v2 accepteert alleen cijfers, letters, onderstrepingstekens en verbindingstreepjes voor alle gegevensvelden.	Geef de batch een andere naam zonder speciale tekstkarakters.
Batchcreatie	EM0051	The Batch ID is greater than 26 characters in length. (De batch-ID is langer dan 26 karakters.)	De VeriSeq NIPT Solution v2 beperkt de lengte van batchnamen tot 26 karakters of minder.	Geef de batch een andere naam met minder dan 26 karakters.
Batchcreatie	EM0076	Unable to connect to VeriSeq on-site server v2. (Kan geen verbinding maken met de on-site server VeriSeq v2.)	De on-site server VeriSeq v2 reageert niet op gegevensaanvragen van de workflowmanager.	Controleer of: 1. de ML STAR met het netwerk is verbonden; 2. de on-site server VeriSeq v2 is ingeschakeld; 3. de ML STAR verbinding kan maken met de on-site server VeriSeq v2 (via een ping-verzoek). 4. Als bovengenoemde stappen het probleem niet oplossen, moet u een e-mail sturen naar de technische ondersteuning van Illumina. 5. De vacuümafvalfles om te zien of hij meer dan halfvol is. Zo ja, leeg dan de afvalfles.

Processtap	Foutcode	Foutmelding	Omschrijving	Oplossing door de gebruiker
Batchcreatie	EM0118	This batch has been failed and cannot be further processed. (Deze batch is mislukt en kan niet verder worden verwerkt.)	De gespecificeerde batch is al mislukt en kan niet verder worden verwerkt.	Uit het batchrecord op de on-site server VeriSeq v2 blijkt dat de geselecteerde batch is mislukt. Verdere verwerking is niet toegestaan. Maak een nieuwe batch met de gewenste monsters.
Batchcreatie	N.v.t.	This batch has already completed processing. Would you like to repool? (Deze batch is klaar met de verwerking. Wilt u opnieuw poolen?)	De betreffende batch is verwerkt middels pooling. De enige toegestane verwerking is opnieuw poolen.	Selecteer Re-Pool (opnieuw poolen) om opnieuw te poolen. OF Staak de methode en controleer de batchnaam nogmaals.
Plasma-isolatie	WP0087	Duplicate sample barcodes loaded. (Duplicaat-monsterstreepjescodes geladen.)	Er zijn monsters met identieke streepjescodes op het systeem geladen.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Volg de prompts van de workflowmanager om vast te stellen welke monsters duplicaten zijn. 2. Verwijder deze monsters en relabel of verplaats ze. 3. Laad de monsters opnieuw.
Plasma-isolatie	EP0102	Samples specified in the Sample Sheet were not loaded. (Monsters gespecificeerd in het monsterformulier zijn niet geladen.)	De monsters van het monsterformulier zijn geen onderdeel van de geladen streepjescodes.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Volg de prompts van de workflowmanager om vast te stellen welke monsters ontbreken. 2. Voeg de ontbrekende monsters toe aan de batch en herlaad de monsters. OF Breek de methode af, pas het monsterformulier aan als nodig en start de methode opnieuw.
Laden plaat	N.v.t.	Venus Barcode Mask Error (Fout Venus-streepjescodemasker)	De workflowmanager past een correcte plaat-met-batch-associatie toe op basis van Venus-streepjescodemaskers.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Controleer of de plaatsing van de plaat correct is. 2. Controleer of de geladen plaat de juiste plaat is voor de betreffende batch.

Processtap	Foutcode	Foutmelding	Omschrijving	Oplossing door de gebruiker
cfDNA-extractie	WE0150	Pressure in the vacuum chamber is too low. (Druk in de vacuümkamer is te laag.)	De workflowmanager gaat niet verder als de gemeten rustdruk in de vacuümlijn <400 Torr is.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Controleer op knikken of andere obstructies in de vacuümlijn. 2. Open de ontgrendelingsclips op de afvallijn, laat ontluchten en sluit de ontgrendelingsclips op de lijn weer volledig. 3. Controleer of de vacuümregelaar en de pomp zijn ingeschakeld. 4. Neem contact op met de technische ondersteuning van Illumina als het probleem blijft optreden.
	WE0153	Pressure in the vacuum chamber is too high. (Druk in de vacuümkamer is te hoog.)	Als de gemeten vacuümdruk te hoog is voordat de drukregeling start, werkt het systeem mogelijk niet goed.	Controleer aan de achterzijde van de regelaar of alle vacuümaansluitingen en lijnen goed vastzitten.
	WE0996	Vacuum failed to seal. (Vacuüm niet afgesloten.)	Het systeem kan geen volledig vacuüm maken op de bindingsplaat.	<p>OPMERKING Selecteer alleen OK als de afsluitingsstoring volledig is verholpen.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Controleer of de bindingsplaat helemaal tegen het vacuümspruitstuk aan zit. Druk met een gehandschoende hand met kracht op de bindingsplaat. 2. Selecteer OK om verder te gaan met cfDNA-extractie. 3. Als deze foutmelding vaker dan drie keer verschijnt tijdens een run, moet u een e-mail sturen naar de technische ondersteuning van Illumina.
	WM0219	If Vacuum is on, manually rest the pump. (Als vacuüm ingeschakeld is, moet de pomp handmatig worden gestopt.)	Het vacuüm kan ingeschakeld blijven nadat een methode tijdens extractie is afgebroken.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Druk op de vacuümregelaar op de aan-uittoets om het vacuüm af te sluiten. 2. Wacht 10 seconden en druk nogmaals op de aan-uittoets om het vacuüm weer in te schakelen.

Processtap	Foutcode	Foutmelding	Omschrijving	Oplossing door de gebruiker
cfDNA-extractie	EE0477	An error has occurred while moving a plate. (Er is een fout opgetreden tijdens het verplaatsen van een plaat.) (iSWAP fout)	Als er sprake is van een iSWAP-fout (plaat gevallen, niet kunnen oprapen, etc.), vraagt het systeem de gebruiker de plaatverplaatsing handmatig uit te voeren.	Controleer of de plaat kan worden hersteld (geen gemorst materiaal). - Als dit niet het geval is, moet de run worden afgebroken. - Als dit wel het geval is, volg dan de getoonde instructies om de plaatverplaatsing handmatig uit te voeren.
	EE0519	Scanned barcode does not match binding plate barcode on record. (De gescande streepjescode komt niet overeen met de geregistreerde streepjescode van de bindingsplaat.)	De geladen bindingsplaat komt niet overeen met de streepjescode van de verwijderde plaat.	Controleer of de geladen plaat overeenkomt met de geregistreerde streepjescode (raadpleeg het sporenlogboek voor de verwachte streepjescode).
API	EA0372	Unable to connect to the data server. (Kan geen verbinding maken met de gegevensserver.)	De on-site server VeriSeq v2 reageert niet op gegevensaanvragen van de workflowmanager.	Controleer of: 1. de ML STAR met het netwerk is verbonden; 2. de ML STAR verbinding kan maken met de on-site server VeriSeq v2 (via een ping-verzoek). 3. de on-site server VeriSeq v2 is ingeschakeld.
	EA0774	Connection Error (Verbindingsfout) The API server connection failed to validate. (De verbinding met de API-server is niet gevalideerd.)	De on-site server VeriSeq v2 reageert niet meer op gegevensaanvragen van de workflowmanager.	Controleer of: 1. de ML STAR met het netwerk is verbonden; 2. de ML STAR verbinding kan maken met de on-site server VeriSeq v2 (via een ping-verzoek). 3. de on-site server VeriSeq v2 is ingeschakeld.
	EA0780	403: Invalid Request (Ongeldig verzoek) The current transaction is not valid. (De huidige transactie is niet geldig.)	De verzonden gegevens zijn in strijd met de workflowlogica.	Raadpleeg de foutgegevens voor meer informatie. Veel voorkomende oorzaken zijn invoeren die te lang zijn of die in strijd zijn met de lijst met toegestane karakters.

Referenties

- 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.* 4e editie. 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.* januari 2015; 45 (1): 16-26. doi: 10.1002/uog.14636.
- 4 American College of Obstetricians and Gynecologists. Screening for fetal aneuploidy. Practice Bulletin nr. 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.* 11 april 2017. 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.* nov. 2015; 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.

Revisiegeschiedenis

Document	Datum	Omschrijving van wijziging
Documentnr. 1000000078751 v06	augustus 2021	Bijwerkt adres gemachtigd vertegenwoordiger voor de EU.
Documentnr. 1000000078751 v05	december 2020	<ul style="list-style-type: none"> • De hoofdstukken Principes van de procedure, Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen en Productlabeling zijn bijgewerkt met aanvullende verduidelijkingen in reactie op verzoeken in verband met regelgeving. • Kleine aanpassingen aan de inhoud van het protocol om deze in overeenstemming te brengen met de huidige stijl en organisatie van Illumina. • In het hoofdstuk Precisie van Analytische prestaties is de beschrijving van chromosoom 21 als "op één na kleinste menselijke autosoom" gecorrigeerd en luidt nu "kleinste menselijk autosoom". • Aan de hoofdstukken Plasma isoleren Voorbereiden en Interpretatie van de resultaten zijn voorzorgsmaatregelen toegevoegd in verband met onjuist gebruik van reservoirs en risico's van vermenging van monsters. • Nieuwe server- en softwareonderdeelnummers zijn toegevoegd in verband met de uitgifte van nieuwe servermodel- en softwareonderdeelnummers. • Er zijn aan het protocol voorzorgsmaatregelen toegevoegd, en informatie over het oplossen van problemen in verband met het overlopen van monsterputjes en het voorkomen daarvan. • De werkzame bestanddelen in het reagens DNA-kwantificeringsnorm in de accessoiredoos zijn aangepast aan het veiligheidsinformatieblad. • De naamgevingsconventies van de Local Run Manager VeriSeq NIPT-module zijn bijgewerkt om redenen van consistentie met andere documentatie. • Revisiegeschiedenis toegevoegd.
Documentnr. 1000000078751 v04	oktober 2020	<ul style="list-style-type: none"> • Kleine correcties.
Documentnr. 1000000078751 v03	september 2020	<ul style="list-style-type: none"> • De materiaallijst is bijgewerkt met de specificaties van de laboratoriumbenodigdheden, samen met bekende compatibele opties.
Documentnr. 1000000078751 v02	februari 2020	<ul style="list-style-type: none"> • De presentatie van informatie over klinische prestaties is bijgewerkt om beter duidelijk te maken wat de verschillen zijn tussen basis- en genoombrede screening. • Aan het hoofdstuk Verschillen in prestaties tussen de basis- en de genoombrede screening zijn nieuwe verschillen toegevoegd. • Uit het hoofdstuk Principes van de procedure is tegenstrijdige informatie over de optie van het aanvullende rapport verwijderd. • De naamgevingsconventie van de VeriSeq NIPT-workflowmanager v2-software is om stilistische consistentie in het hele document bijgewerkt. • De adreslabels van Illumina Australië en Illumina Nederland zijn bijgewerkt in verband met recente wijzigingen.
Documentnr. 1000000078751 v01	augustus 2019	De verdubbeling van een stap in Extraheren cfDNA is verwijderd. De oorzaak hiervan was een fout in de publicatiesoftware.
Documentnr. 1000000078751 v00	mei 2019	Eerste uitgave.

Octrooien en handelsmerken

Dit document en de inhoud ervan zijn eigendom van Illumina, Inc. en haar dochterondernemingen ('Illumina'), en zijn alleen bedoeld voor contractueel gebruik door haar klanten in verband met het gebruik van de hierin beschreven producten en voor geen enkel ander doel. Dit document en de inhoud ervan mogen niet worden gebruikt of gedistribueerd voor welk ander doel dan ook en/of op een andere manier worden gecommuniceerd, geopenbaard of gereproduceerd zonder de voorafgaande schriftelijke toestemming van Illumina. Illumina geeft door middel van dit document geen licenties onder haar patent, handelsmerk, auteursrecht of gewoonterechten noch soortgelijke rechten van derden door.

De instructies in dit document moeten strikt en uitdrukkelijk worden opgevolgd door gekwalificeerd en voldoende opgeleid personeel om een correct en veilig gebruik van de hierin beschreven producten te waarborgen. Alle inhoud van dit document moet volledig worden gelezen en begrepen voordat dergelijke producten worden gebruikt.

HET NIET VOLLEDIG LEZEN EN UITDRUKKELIJK OPVOLGEN VAN ALLE INSTRUCTIES IN DIT DOCUMENT KAN RESULTEREN IN SCHADE AAN DE PRODUCTEN, LETSEL AAN PERSONEN (INCLUSIEF GEBRUIKERS OF ANDEREN) EN SCHADE AAN ANDERE EIGENDOMMEN. BIJ HET NIET VOLLEDIG LEZEN EN UITDRUKKELIJK OPVOLGEN VAN ALLE INSTRUCTIES IN DIT DOCUMENT VERVALLEN ALLE GARANTIES DIE VAN TOEPASSING ZIJN OP HET PRODUCT.

ILLUMINA IS OP GEEN ENKELE MANIER AANSPRAKELIJK VOOR GEVOLGEN VAN EEN ONJUIST GEBRUIK VAN DE PRODUCTEN DIE HIERIN WORDEN BESCHREVEN (INCLUSIEF DELEN DAARVAN OF SOFTWARE).

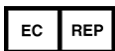
© 2021 Illumina, Inc. Alle rechten voorbehouden.

Alle handelsmerken zijn het eigendom van Illumina, Inc. of hun respectievelijke eigenaren. Ga naar www.illumina.com/company/legal.html voor meer informatie over specifieke handelsmerken.

Contactgegevens



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, Californië 92122 VS
+1 800 809 ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (buiten Noord-Amerika)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

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

Productlabeling

Raadpleeg voor een volledige uitleg van symbolen die mogelijk worden weergegeven op de verpakkingen en labels van de producten het symbooloverzicht voor uw kit via support.illumina.com.

Een Samenvatting van veiligheid en prestaties (SSP) is te vinden op <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>. Start daarvoor de Europese database voor medische hulpmiddelen (Eudamed) en gebruik de Basic UDI-DI (0081627002NIPTRP).