

VeriSeq NIPT Assay Software v2 använder statistik som genereras under sekvenseringen för att tillhandahålla en uppskattad fosterfraktion (FFE) för varje prov. FFE är den uppskattade fetala cfDNA-komponenten som registreras av analysen och rapporteras som en avrundad procentsats för varje prov. Den genomsnittliga standardavvikelsen för det här värdet för samtliga prov är 1,3 %. FFE ska inte användas som det enda beslutsunderlaget vid beslut angående uteslutning av prover vid rapportering av resultat.

För beslut angående kromosomrepresentation använder VeriSeq NIPT Assay Software v2 det individuella fosteraneuploiditetstestet (iFACT), vilket ger ett dynamiskt tröskelvärde som anger om systemet har genererat tillräckligt med sekvenstäckning med hänsyn till den uppskattade fosterfraktionen för varje prov. Negativa bestämningar rapporteras endast om provet uppnår iFACT-tröskelvärdet. Om ett prov inte uppnår tröskelvärdet visar QC-bedömningen meddelandet FAILED iFACT (MISSLYCKAD iFACT) och systemet genererar inget resultat.

Utöver iFACT bedömer VeriSeq NIPT Assay Software v2 flera andra QC-mått under analysen. De ytterligare måtten omfattar bedömningar av täckningens enhetlighet på referensgenomregioner och fördelningen av cfDNA-fragmentens längd. QC-bedömningen visar antingen en QC-varning eller ett QC-fel för mätvärden utanför det godtagbara intervallet. I händelse av QC-fel genererar systemet inget provresultat. Om ett prov inte klarar QC-kontrollen kan provet ombearbetas förutsatt att plasmavolymer i bloduppsamlingsröret är tillräcklig.

VeriSeq NIPT Solution v2 genererar data för användning i en slutlig rapport. Det genererar inte en slutlig rapport för patienten. Kunderna ansvarar för utformningen av och innehållet i den slutliga rapport som levereras till patientens läkare. Illumina ansvarar inte för att formuleringen i kundens slutliga rapport är korrekt.



WARNING!

Kontrollera den uppskattade fosterfraktionen för alla prover. Om den uppskattade fosterfraktionen är liknande för alla prover i en körning kan proverna ha blandats, vilket kan påverka resultaten. Kontakta Illuminas tekniska support för hjälp med felsökning.

Prestandaegenskaper

Följande data, som beskrivs i avsnitten Klinisk prestanda och Analysprestanda, genererades genom användning av de protokoll och material som beskrivs i avsnittet Bruksanvisning och börjar med plasma. Alla sekvenseringsdata för det här avsnittet genererades i ett NextSeq 500/550-sekvenseringssystem eller ett NextSeq 550Dx-sekvenseringssystem med följande konfigurationer:

	NextSeq 500/550	NextSeq 550Dx
Programvara i instrumentet	NextSeq control software 4.0	NextSeq systemprogramvara 1.3
Reagenssatsversion	NextSeq 500/550 högproduktivt v2.5 reagenssats med 75 cykler	NextSeq 550Dx högproduktivt v2.5 reagenssats med 75 cykler
Sekvenseringsmetod	2 x 36 paired-end-sekvenskörningar i högeffektsläge	2 x 36 paired-end-sekvenskörningar i högeffektsläge

Klinisk studie

Den kliniska noggrannheten hos VeriSeq NIPT Solution v2 visades genom utvärdering av plasmaprover från kvinnor som var gravida med ett eller två embryon. Prover erhöles från oidentifierade plasmaprover från biobank som tidigare bearbetats från perifera helblodprover. Över 45 000 prover övervägdes för inkludering i studien. Dessa prover hade genomgått tidigare prenatal screening för fetal aneuploidi och partiella deletioner och duplikationer på 7 Mb eller större. Alla prover från påverkade graviditeter och en deluppsättning med på varandra följande prover från opåverkade graviditeter var lämpliga för testning om kliniska resultat fanns tillgängliga och provkriterierna uppfylldes. Totalt 2 335 prover ingick i testanalysuppsättningen. Från denna uppsättning var 2 328 prover från graviditeter med ett embryo och sju prover från tvillinggraviditeter.

Under analysen av fullständiga sekvenseringsdata klarade 28 (1,2 %, 28/2 335) av proven inte QC:n på första försöket:

- 27 iFACT-fel (en XO, 26 opåverkade)
- ett misslyckades på grund av data utanför förväntat intervall.

Befolkningsstatistik och graviditetsegenskaper

Moderns ålder, fosterålder och graviditetstrimester summeras i **Tabell 7** för proverna i screeningen av hela genom, inklusive kända mosaicismprover.

Befolkningsstatistiken utvärderades mellan den grundläggande kohorten och kohorten med hela genom, och ingen statistisk skillnad uppvisades. Befolkningsstatistik och graviditetsegenskaper var likartade oavsett om kända fall av mosaicism inkluderades eller inte.

Tabell 7 Befolkningsstatistik och graviditetsegenskaper

Sammanfattande statistik	Hela genom (inklusive kända fall av mosaicism)
Antal prover	2 307*
Moderns ålder – år	
Medelvärde	35,08
Standardavvikelse	4,04
Median	34,95
25:e percentilen; 75:e percentilen	32,31; 37,79
Lägsta; högsta	20,22; 53,02
Gestationsålder då blodprovet togs – veckor	
Medelvärde	10,93
Standardavvikelse	1,20
Median	10,57
25:e percentilen; 75:e percentilen	10,29; 11,14
Lägsta; högsta	10,00; 27,86
Trimester – n (%)	
< Första (< 14 veckor)	2 252 (98 %)
Andra	54 (2 %)
Tredje (≥ 27 veckor)	1 (0 %)

* De slutliga proverna som presenterades innehöll 7 tvillingpar.

Klinisk prestanda

Resultaten från VeriSeq NIPT Solution v2 jämfördes med de kliniska referensresultaten. Alla studieprover hade kliniska referensresultat (klinisk sanning) avseende fetal aneuploidistatus och partiella deletioner och duplikationer på 7 Mb eller större. Det kliniska referensresultatet för prover som ingick i denna studie berodde på resultatet av kromosomanalys eller en fysisk undersökning av ett nyfött barn med NGS-baserad negativ NIPT-screening. Utbildad studiepersonal klassificerade kliniska referensdata i enlighet med det medicinska kodningsdokumentet från sponsorn.

Metoderna för kromosomanalys inkluderade karyotypbestämning, fluorescerande in situ-hybridisering (FISH), komparativ genomhybridisering och kromosommikroarray (CMA). Kromosomanalys utfördes på perifert blod eller saliv hos det nyfödda barnet eller spädbarnet, prover på konceptionsprodukter (POC), amniocyter, korionvilli, vävnadsprov från placenta eller postnatalt navelsträngsblod.

Mosaicism definieras som förekomsten av två eller flera cellinjer med olika kromosomsammansättning hos en individ. Cellinjerna kommer från samma zygot. Typ och nivå på mosaicism varierar och beror på tidpunkten för mosaicismrelaterade händelser under embryogenes och fosterutveckling. Olika typer av mosaicism förekommer i prenatala diagnoser beroende på fördelningen av onormala kontra normala cellinjer över cytotrofoblast,

mesenkym eller foster.¹⁰ Även om mosaicism kan observeras med alla kromosomavvikelser, är förekomsten av mosaicism i sällsynta trisomier högre än i trisomierna för kromosom 21, 18 och 13 (T21, T18 och T13).¹¹ I prestandautvärderingen inkluderades fall av mosaicism i analys av hela genom, eftersom syftet med denna screeningtyp för den här analysen är att detektera sällsynta autosomala aneuploidier (RAA).

Prestanda för grundläggande screening

För den grundläggande screeningen inkluderar avvikelserna T21, T18, och T13. Totalt ingick 2 243 prover från enkelembryon och tvillingar i analysen. Samtliga sju tvillinggraviditeter detekterades korrekt som T21 och rapporteras inte i nedanstående tabell.

Tabell 8 Känslighet och specificitet hos VeriSeq NIPT Solution v2 för att detektera trisomi 21, 18 och 13 vid en grundläggande screening av graviditeter med ett embryo (inklusive kända fall av mosaicism)

	T21	T18	T13
Känslighet	> 99,9 % (130/130)	> 99,9 % (41/41)	> 99,9 % (26/26)
Dubbelsidig 95 % KI	97,1 %, 100 %	91,4 %, 100 %	87,1 %, 100 %
Specificitet	99,90 % (1 982/1 984)	99,90 % (1 995/1 997)	99,90 % (2 000/2 002)
Dubbelsidig 95 % KI	99,63 %, 99,97 %	99,64 %, 99,97 %	99,64 %, 99,97 %

Analysresultatet från den grundläggande screeningen som visas i **Tabell 8** beräknas exklusive en underuppsättning på 64 prover med RAA, autosomala partiella deletioner eller duplikationer, eller känd mosaicism. De här 64 proverna inkluderade mosaicism i åtta T21 och tre T18. Fem av de här 11 proverna identifierades som påverkade av avvikelsen som detekterades av VeriSeq NIPT Assay Software v2.

Prestanda för screening av hela genom

För screeningen av hela genom inkluderar avvikelser trisomier, monosomier och partiella deletioner eller duplikationer på 7 Mb eller större. Proverna för screening av hela genom innehöll 36 prover med känd mosaicism. Totalt testades 2 307 prover från enkelembryon och tvillingar. För samtliga sju tvillinggraviditeter detekterades kromosom 21-avvikelse korrekt och dessa rapporteras inte i nedanstående tabeller.

Prestanda för screening av hela genom för eventuella avvikelser

Tabell 9 Känslighet och specificitet hos VeriSeq NIPT Solution v2 för att detektera eventuella avvikelser vid screening av hela genom (inklusive kända fall av mosaicism)

	Känslighet	Specificitet
Uppskattning % (n/N)	95,5 % (318/333)	99,34 % (1 954/1 967)
Dubbelsidig 95 % KI	92,7 %, 97,3 %	98,87 %, 99,61 %

Prestanda för screening av hela genom för sällsynt autosomal aneuploidi

Tabell 10 Känslighet och specificitet hos VeriSeq NIPT Solution v2 för sällsynt autosomal aneuploidi (RAA) vid screening av hela genom (inklusive kända fall av mosaicism)

	Känslighet	Specificitet
Uppskattning % (n/N)	96,4 % (27/28)	99,80 % (2 001/2 005)
Dubbelsidig 95 % KI	82,3 %, 99,4 %	99,49 %, 99,92 %

Prestanda för screening av hela genom för partiella deletioner och duplikationer

Tabell 11 Känslighet och specificitet hos VeriSeq NIPT Solution v2 för partiella deletioner eller duplikationer på 7 Mb eller mer för screeningen av hela genom (inklusive kända mosaiker)

	Känslighet	Specificitet
Uppskattning % (n/N)	74,1 % (20/27)	99,80 % (2 000/2 004)
Dubbelsidig 95 % KI	55,3 %, 86,8 %	99,49 %, 99,92 %

Skillnader i resultat mellan grundläggande screening och screening av hela genom

Bedömningsmetoden för vanliga trisomier och aneuploidier av könskromosomer är den samma för både grundläggande screening och screening av hela genom. Den grundläggande screeningen tillämpar endast algoritmen för T21, T18 och T13. Screening av hela genom utvidgar däremot den här metoden för att bedöma för alla trisomier, RAA och partiella deletioner och duplikationer.

Det finns två skillnader mellan resultatrapporteringen för grundläggande screening och screening av hela genom. För det första inkluderas prover med känd mosaicism både för vanliga trisomier, RAA och partiella deletioner och duplikationer i resultatvärden vid screening av hela genom. För det andra går det att välja att rapportera detektionen av en partiell deletion eller duplikation framför en fullständig trisomi vid screening av hela genom. Förekomsten av en fullständig trisomi utöver en partiell deletion eller duplikation kan visas genom att hänvisa till LLR-värdet i den kompletterande rapporten.

Inkludering av mosaicism vid screening av hela genom

Mosaicism listas som en analysens begränsningar. När det förekommer mosaicism minskar signalerna om avvikelser från fostret och det kan därför bli svårare att detektera dem utan att kompromissa med analysens övergripande specificitet. Eftersom mosaicism däremot är mer relevant för utökat innehåll, inkluderades prover med mosaicism i screeningen av hela genom.

Av de 64 prover som inkluderades i screeningen av hela genom men inte i den grundläggande screeningen, identifierades mosaicism i 36 prover med hjälp av kliniska referensdata. Av dessa 36 prover matchades 23 bestämningar klinisk referensdata.

Detektion av partiell deletion eller duplikation jämfört med aneuploidi för hela kromosomen

VeriSeq NIPT Solution v2 har menyalternativ för både grundläggande screening och screening av hela genom. I den grundläggande screeningen rapporteras endast ANOMALY DETECTED (AVVIKELSE DETEKTERAD) när fullständig aneuploidi upptäcks på kromosom 21, 18 eller 13 och om alla kriterier för kvalitetskontroll uppfylls. I screeningen för hela genom detekterar systemet aneuploidi på alla autosomer samt partiella deletioner och duplikationer på minst 7 Mb.

När screening av hela genom används rapporterar systemet i första hand partiella deletioner eller duplikationer, och inte hela kromosombestämningen, om storleken på den partiella deletionen eller duplikationen täcker mindre än eller är lika med 75 % av den kromosom där den detekterade avvikelserna finns. Om regionen för den partiella deletionen eller duplikationen är större än 75 % av kromosomens storlek rapporteras händelsen som fullständig trisomi eller monosomi av hela kromosomen. Därför kan ansenligt stora deletioner och duplikationer som är mindre än 75 % av kromosomens storlek tyda på aneuploidi av hela kromosomen.

För alla prover finns LLR-värdet för klassificering av hela kromosomer i den kompletterande rapporten. LLR-värdet bör granskas med hänsyn till den cutoff som anges i **Bild 2 på sidan 40** innan resultatet tolkas. LLR-värden på kromosomnivå som överskrider cutoff ger ytterligare stöd för en tolkning som överensstämmer med aneuploidi av hela kromosomen.

I den kliniska studien fanns två prover från graviditeter med ett embryo som hade ansenligt stora duplikationer (en på kromosom 21 och en på kromosom 18) som var mindre än 75 % av kromosomens relativa storlek (se **Tabell 12**). Båda händelserna rapporterades som partiell duplikation istället för en fullständig trisomi för aktuell kromosom. LLR-värdet för dessa händelser överskred cutoff, vilket överensstämmer med resultatet fullständig trisomi. Som uppföljning för en positiv NIPT-bestämning, antingen en partiell duplikation eller en fullständig trisomi, ska patienten erbjudas bekräftelsetest genom prenatal diagnos.

Tabell 12 Exempel på stora duplikationshändelser som identifierats i screening av hela genom

	Klinisk sanning	Utfall, hela genom	Avvikelsens storlek (Mb)	% av kromosom	LLR-värde
Prov 1	Trisomi 21, ett embryo	Partiell duplikation på 21	22,50	48,9 %	19,43
Prov 2	Trisomi 18, ett embryo	Partiell duplikation på 18	47,00	60,2	12,99

Se programhandboken för VeriSeq NIPT Solution v2 (dokumentnr 100000067940) för mer information om de kriterier för kvalitetskontroll som används för att rapportera aneuploidieresultat.

Könskromosomer

Könskromosomsresultaten från VeriSeq NIPT Solution v2 jämfördes med det kliniska referensresultatet och sammanfattas i tabellen nedan. Konkordansen beräknades för varje könskromosom inom varje kliniskt referensresultat. Konkordansen beräknades genom att antalet prover där könskromosombestämningsarna i VeriSeq NIPT Solution v2 matchade den kliniska referensklassificeringen, delades med det totala antalet prover med samma kliniska referensklassificering.

Tabell 13 Konkordans för könklassificering av foster*

Könklassificering av foster		Fenotyp enligt fysisk undersökning av nyfödd		Cytogenetiska resultat							
Detekterad	Karyotyp	Kvinnlig	Manlig	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY	Annat**	Saknas
Avvikelse ej detekterad	XX	997	0	21	0	2	0	0	0	0	0
Avvikelse ej detekterad	XY	0	966	0	15	0	0	0	0	0	1
Avvikelse detekterad	XO	0	0	0	0	19	0	0	1	0	0
Avvikelse detekterad	XXX	0	0	0	0	0	17	0	0	1	0
Avvikelse detekterad	XXY	0	0	0	0	0	0	23	0	1	0
Avvikelse detekterad	XYY	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0
Totalt		997	966	21	15	21	17	23	12	2	1
Konkordans (%)		100	100	100	100	90,5	100	100	91,7	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt

* Fem tvillinggraviditeter klassificerades korrekt som förekomst av Y. Två graviditeter klassificerades korrekt som ingen förekomst av Y.

** Andra cytogenetiska resultat var XXXXX och XXYY.

Positivt prediktivt värde och negativt prediktivt värde för VeriSeq NIPT Solution v2

Testets positiva prediktiva värde (PPV) och negativa prediktiva värde (NPV) indikerar om testet kan användas för kliniska beslut kring huruvida ett foster är påverkat av trisomi (prevalens) eller ej, baserat på testets känslighet, specificitet och förtets sannolikhet. Eftersom PPV och NPV beror på prevalens och prevalensen för dessa aneuploidier kan variera mellan olika testpopulationer, har PPV och NPV beräknats för en rad troliga prevalensvärden baserat på de värden för känslighet och specificitet som observerats i den grundläggande screeningen (utan kända fall av mosaicism) av den kliniska noggrannhetsstudien. [Tabell 17](#) baseras på screeningen av hela genom (med kända fall av mosaicism).

Tabell 14 Prevalens för trisomi 21, PPV och NPV i grundläggande screening (exklusive kända fall av mosaicism)

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

Tabell 15 Prevalens för trisomi 18, PPV och NPV i grundläggande screening (exklusive kända fall av mosaicism)

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

Tabell 16 Prevalens för trisomi 13, PPV och NPV i grundläggande screening (exklusive kända fall av mosaicism)

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

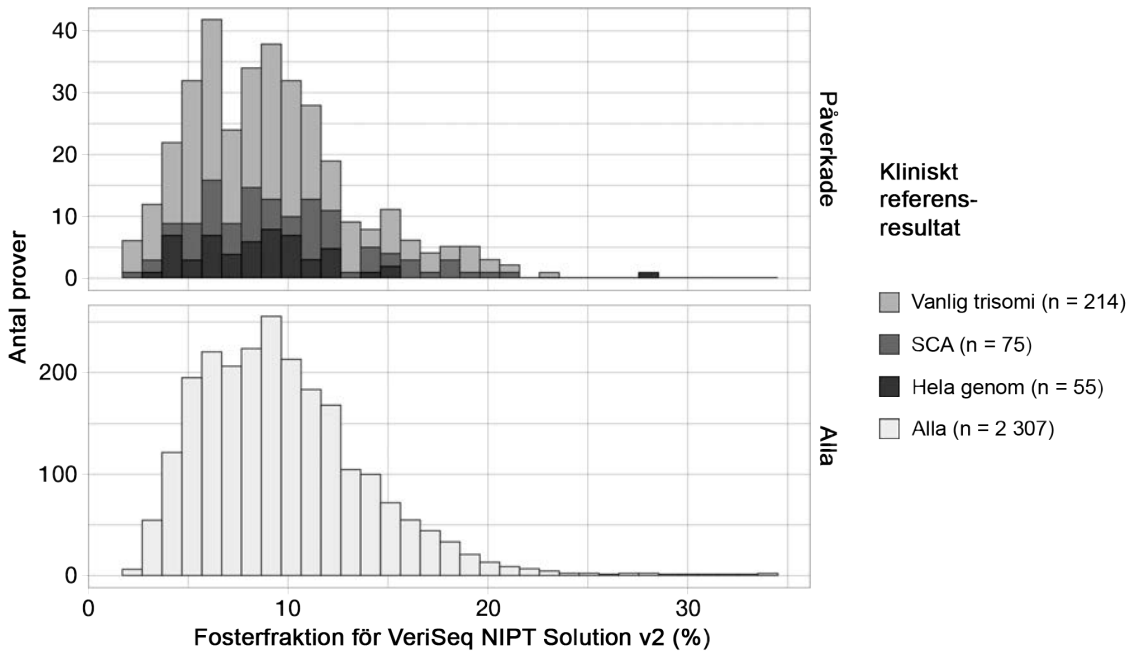
Tabell 17 Prevalens för alla avvikelser, PPV och NPV i screening av hela genom (inklusive kända fall av mosaicism)

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

Fördelning av fosterfraktion

Uppskattad fördelning av fosterfraktion (FF) för VeriSeq NIPT Solution v2 från screeningen av hela genom med mosaicism visas per kliniskt referensresultat i [Bild 1](#).

Bild 1 Fördelning av fosterfraktion



Fem prover hade avvikelser i flera kategorier.

Vanlig trisomi omfattar prover med trisomi 21, 18 och/eller 13.

Hela genom omfattar prover med RAA eller partiella deletioner och/eller duplikationer.

FF-beräkningarna varierade från 2 % till 34 % totalt med en median på 9 % och interkvartilintervall på 6 % till 12 %. Medianvärdet för FF-skattning för vanliga trisomier och händelser som detekteras vid screeningen av hela genom är 8 %, och 9 % för SCA:er. Intervallet av FF-skattningar var konsekvent för alla resultat. Det finns ingen uppenbar förskjutning i fördelningen av FF bland vanliga trisomier, SCA:er, händelser som detekteras under screeningen av hela genom eller alla prover i analysen av hela genom.

Prestanda vid tvillinggraviditeter

Uppskatta prestanda för trisomi 13, 18 och 21 och kromosom Y vid tvillinggraviditeter

På grund av den låga prevalensen av trisomi 21, 18 och 13 vid tvillinggraviditeter fanns endast ett litet antal påverkade tvillingprover tillgängliga för den kliniska studien. För att uppskatta prestandan för VeriSeq NIPT Solution v2 vid tvillinggraviditeter användes *in silico*-modeller baserade på observationer från kliniska prover för att simulera populationer med tvillinggraviditeter. Denna simulering överensstämde med den avsedda användningspopulationen. Fördelningen av fosterfraktion fastställdes från cirka 4 500 tvillingprover och jämfördes med fördelningen av cirka 120 000 prover från enkelembryon. Fördelningen av fosterfraktion beroende på aneuploidistatus fastställdes genom förmodade enkelembryo-bestämningar (1 044 trisomi 21, 307 trisomi 18 och 192 trisomi 13). Genom att kombinera dessa två fördelningar möjliggjordes inferenser för detektion av aneuploidi hos tvillingar. Uppsättningar med tvåägg- och enäggstvillingar simulerades och ett viktat genomsnitt som representerade deras prevalens i den avsedda användningspopulationen togs (2 par tvåäggstvillingar: 1 par enäggstvillingar) för att uppskatta känsligheten. För specificitet simulerades uppsättningar med opåverkade tvillingar.

Fraktionen av varje simulerat prov som påverkades av trisomi (dvs. den påverkade fraktionen) beräknades olika för varje provtyp:

- För enäggstvillingar angavs den påverkade fraktionen för varje prov till 1,0 eftersom trisomi i det här fallet påverkar båda tvillingarna.

- ▶ För tvåäggstvillingar antogs det att endast en tvilling var påverkad (att båda tvåäggstvillingarna skulle påverkas är extremt sällsynt). De påverkade fraktionsvärdena simulerades med hjälp av den kända spridningen av fosterfraktionskvoten med utgångspunkt i kliniska tvillingprover av olika kön. En konservativ infallsvinkel antogs där man förutsatte att den drabbade tvillingen alltid hade den lägsta fosterfraktionen av de två tvillingarna. En korrektionsfaktor tillämpades för att fosterfraktioner i genomsnitt är lägre vid graviditeter med trisomi 13 och 18.
- ▶ För opåverkade tvillingar angavs den påverkade fraktionen för varje prov till noll.

För tvillingar som påverkades av antingen trisomi 18 eller 13 reducerades fosterfraktionen som motsvarade den påverkade fraktionen av provet. Minskningen var proportionell i förhållande till den genomsnittliga minskningen av fosterfraktion som observerats i kliniska data för enkelembryon med trisomi 18 eller 13 jämfört med euploida enkelembryon.

Därefter användes både total fosterfraktion och den påverkade fraktionen av varje simulerat prov för att beräkna en aneuploidipoäng med hjälp av standardalgoritmen i VeriSeq NIPT Solution v2. Känsligheten beräknades genom att fastställa hur ofta aneuploidipoängen för de simulerade drabbade tvillingarna översteg motsvarande cutoff för aneuploidi. På motsvarande sätt beräknades specificiteten genom att fastställa hur ofta aneuploidipoängen för de simulerade opåverkade tvillingarna låg under motsvarande aneuploidibrytpunkt (Tabell 18). 95 % konfidensintervall uppskattades baserat på antalet faktiska kliniska tvillingprover i den ursprungliga datauppsättningen, vilka klassificerades som antingen påverkade eller opåverkade av aktuell trisomi.

För att uppskatta känslighet för kromosom Y i tvillingprover simulerades uppsättningar med XY/XY- och XX/XY-tvillingar. Ett viktat genomsnitt som representerade deras prevalens i den avsedda användningspopulationen togs (1 XY/XY: 1 XX/XY). För att uppskatta specificitet för kromosom Y hos tvillingar simulerades en uppsättning med XX/XX-tvillingar. Totala fosterfraktionsvärdena simulerades enligt den kända fördelningen av fosterfraktion för kliniska tvillingprover.

För XY/XY- och XX/XY-tvillingar uppskattades motsvarande kromosom Y-poäng med hjälp av det kända förhållandet mellan fosterfraktion och kromosom Y-poäng hos kliniska prover för enkelembryon som klassificerats som manliga. För enbart XX/XY-tvillingar simulerades de påverkade (dvs. manliga) fraktionsvärdena med hjälp av den kända fördelningen av fosterfraktionsförhållanden som observerats mellan tvillingar från samma graviditet, enligt bestämning av kliniska tvillingprover med olika kön. Försiktighet iaktogs och den påverkade fraktionen valdes så att den motsvarade den minsta av de båda tvillingarna. För varje simulerat XX/XY-prov multiplicerades kromosom Y-poängen med den påverkade fraktionen.

För XX/XX-tvillingar valdes kromosom Y-poängen ut från de poäng som observerats hos kliniska prover för enkelembryon som klassificerats som kvinnliga. Därefter användes kromosom Y-poängen och den totala fosterfraktionen för att klassificera varje simulerat prov som antingen kromosom Y närvarande eller kromosom Y frånvarande med hjälp av standardalgoritmen i VeriSeq NIPT Solution v2.

Känsligheten beräknades genom att fastställa hur ofta de simulerade XY/XY- eller XX/XY-tvillingarna klassificerades korrekt som kromosom Y närvarande. Specificiteten beräknades genom att fastställa hur ofta de simulerade XX/XX-tvillingarna klassificerades korrekt som kromosom Y frånvarande. 95 % konfidensintervall uppskattades baserat på antalet faktiska kliniska tvillingprover i den ursprungliga datauppsättningen, vilka klassificerades som antingen kromosom Y närvarande eller kromosom Y frånvarande.

Tabell 18 Uppskattning av trisomi 21, 18 och 13 i en simulerad population av tvillinggraviditeter

	Trisomi 21	Trisomi 18	Trisomi 13	Förekomst av Y
Känslighet	96,4 %	95,7 %	93,6 %	> 99,9 %
Dubbelsidig 95 % KI	(86,4 %, 98,9 %)	(68,3 %, 99,4 %)	(64,1 %, 98,9 %)	(99,9 %, > 99,9 %)
Specificitet	99,9 %	> 99,9 %	> 99,9 %	> 99,9 %
Dubbelsidig 95 % KI	(99,8 %, > 99,9 %)	(99,9 %, > 99,9 %)	(99,9 %, > 99,9 %)	(99,7 %, > 99,9 %)

Tabell 18 ger punktberäkningar och beräknade 95 % konfidensintervall för känslighet och specificitet hos VeriSeq NIPT Solution v2 att detektera trisomi 21, 18 och 13 samt förekomsten av Y i en simulerad population av tvillinggraviditeter som överensstämmer med avsedd användningspopulation. Konfidensintervallen uppskattades baserat på antalet QC-godkända kliniska tvillingprover som klassificerats som antingen påverkade eller opåverkade av aktuell trisomi. Känslighetsberäkningen förutsätter att två tredjedelar av de påverkade tvillinggraviditeterna är tvåäggstvillingar med en berörd tvilling, medan en tredjedel av de påverkade tvillinggraviditeterna är enäggstvillingar med båda tvillingarna drabbade.

De uppskattningar som anges i **Tabell 18** avser endast tvillinggraviditeter. På grund av ännu lägre prevalens var data för graviditeter med fler embryon (trillingar eller fler) otillräckliga för att fastställa lämpliga statistiska modeller som kan uppskatta noggrannheten vid detektion av aneuploidi.

Analysprestanda

Precision

I syfte att bedöma och kvantifiera analysprecision omanalyserades data med hjälp av analysprogrammet för VeriSeq NIPT Solution v2-pipeline från två tidigare studier av VeriSeq NIPT Solution:

- ▶ Reproducerbarhetsstudie på olika laboratorier som omfattade tre köringar av tre operatörer på tre olika laboratorier där samma reagensparti användes till totalt nio köringar.
- ▶ Precisionsstudie på ett laboratorium som omfattade tolv köringar på ett och samma laboratorium med hjälp av två ML STAR-enheter, två sekvenseringsinstrument och tre partier av sekvenseringsreagens.

Målet med precisionsstudien var att kvantifiera analysens precision med avseende på trisomi 21 (T21) och kromosom Y samt uppskatta variabiliteten mellan olika instrument, biblioteksprepareringssats och partier av sekvenseringsreagens.

En uppsättning med 5 % fosterfraktion för T21 skapades genom att kombinera cfDNA som extraherats från maternell plasma från gravida kvinnor (med ett foster med T21) och cfDNA som extraherats från plasma från icke-gravida kvinnor. En uppsättning med 10 % fosterfraktion maternellt/manligt (XY-foster) cfDNA skapades också. Provpanelen för varje körning i varje studie inkluderade 4 replikat av uppsättningen med 5 % fosterfraktion T21-påverkade prover och 20 replikat av uppsättningen med 10 % fosterfraktion maternellt/manligt cfDNA. Testen utfördes under tio dagar och omfattade totalt 21 körningar för de två studierna.

T21 och förekomst av kromosom Y valdes för utvärdering baserat på representativiteten hos kliniska tillstånd och komplexiteten hos avvikelsetektering. Eftersom kromosom 21 är den minsta autosomen hos människan har dess storlek en direkt inverkan på känsligheten för detektion av T21, i synnerhet vid de låga fosterfraktioner som används i den här studien. Kromosom Y i den form som förekommer i maternell plasma är uteslutande fetal i sitt ursprung, vilket innebär att analysen lättare kan detektera den.

Observerat medelvärde och standardavvikelser för LLR-värdet för kromosom 21 samt normaliserade kromosomvärden (NCV) för kromosom Y visade att standardavvikelse (SD) för replikat var den största källan till variabilitet. Variation mellan laboratorier, instrument och reagenspartier tillförde obetydlig variabilitet, vilket framgår av skillnaden mellan Total SD and Replikat-SD i **Tabell 19** och **Tabell 20**.

Tabell 19 Sammanfattning av standardavvikelse (SD) vid sekvenseringssvar på flera laboratorier (reproducerbarhet)

Svar	N	Medelvärde	Replikat-SD	Total SD, reproducerbarhet*
Kromosom 21 LLR-värde	36	34,43	11,36	11,36
Kromosom Y NCV	180	190,56	7,96	10,20

* Totalvärdet omfattar variabilitet på grund av laboratorium, operatör, körning, dag och replikat.

Tabell 20 Sammanfattning av svarsprecision vid sekvensering på samma laboratorium

Svar	N	Medelvärde	Replikat-SD	Total SD, samma laboratorium*
Kromosom 21 LLR-värde	48	36,01	9,07	10,25
Kromosom Y NCV	240	198,68	7,63	7,82

* Totalvärdet omfattar variabilitet på grund av sekvenseringsinstrument, reagensparti, operatör, körning, dag och replikat.

Ytterligare en studie utfördes för att jämföra sekvenseringsprecisionen (total standardavvikelse) för VeriSeq NIPT Solution v2 med hjälp av version 2.0 av en flödescell, jämfört med version 2.5. Studien omfattade två typer av flödesceller (v2.0 och v2.5), tre partier av sekvenseringssats, fyra instrumentsystem och två sekvenseringskörningar per kombination i totalt 48 körningar på ett och samma laboratorium. En sekvenseringsuppsättning bereddes från cfDNA-plattor som hade förberetts manuellt. Provpanelen inkluderade 4 replikat av uppsättningen med 5 % fosterfraktion T21-påverkade prover och 20 replikat av uppsättningen med 10 % fosterfraktion maternellt/manligt (XY-foster) cfDNA. Resultaten från studien presenteras i **Tabell 21** och visar att det inte finns någon skillnad i sekvenseringsprecision vid användning av flödescell v2.0 jämfört med flödescell v2.5.

Tabell 21 Sammanfattning av svarsprecision vid sekvensering med flödescell v2.0 jämfört med flödescell v2.5

Svar	Antal observationer per version	v2.0 total SD*	v2.5 total SD*	Statistiskt resultat**
Kromosom 21 LLR-värde	96	9,56	8,44	Statistiskt ekvivalent (p-värde = 0,25)
Kromosom Y NCV	480	7,74	7,38	Statistiskt ekvivalent (p-värde = 0,38)

* Totalvärdet omfattar variabilitet på grund av sekvenseringsinstrument, reagensparti, körning, dag och replikat

** Baserat på F-test för varianslikhet (standardavvikelser i kvadrat)

Korskontamination

Korskontamination bedömdes för arbetsflödet för provberedning i VeriSeq NIPT Solution. Plasmauppsättningar från icke-gravida kvinnor (XX) och vuxna män (XY) testades i ett schackrutigt mönster i formatet med 96 brunnar fördelat på fyra plattor. N = 48 vardera för kvinnliga och manliga prover per platta; totalt 192 kvinnliga och 192 manliga prover. Inga av proven från kvinnor hade täckning av kromosom Y som var statistiskt högre än den uppskattade bakgrunden och visade därför inte på någon korskontamination från prov från män inom samma platta. Ingen detekterbar korskontamination iakttoogs i VeriSeq NIPT Solution.

Potentiellt störande ämnen

Effekten av potentiellt störande ämnen bedömdes i VeriSeq NIPT Solution genom utvärdering av analysens resultat vid förekomst av sådana ämnen.

Albumin, bilirubin, hemoglobin och triglycerider (endogena) tillsattes i uppsättningar med maternell plasma från opåverkade graviditeter med kvinnligt foster (XX). De testades vid två koncentrationer för varje testämne (n = 16 för varje). Det iakttoogs ingen påverkan av analysens resultat.

Tabell 22 Potentiellt störande ämnen (endogena)

Testämne	Låg testkoncentration (mg/mL)	Hög testkoncentration (mg/mL)
Albumin	35	50
Bilirubin	0,01	0,15
Hemoglobin	100	200
Triglycerid	1,5	5

Även naturligt förekommande maternellt genomiskt DNA (gDNA) i plasman kan potentiellt störa analysens resultat, då det kan extraheras tillsammans med fetalt cfDNA. Genomiska DNA-nivåer på 1,6, 3,3 och 4,9 ng per prov (motsvarar 1, 2 och 3 standardavvikelser över genomsnittlig förväntad gDNA-koncentration efter sju dagars lagring av helblod¹²) tillsattes till cfDNA som extraherats från maternell plasma från opåverkade graviditeter med kvinnligt foster (XX). Proven testades sedan i VeriSeq NIPT Solution (n = 16 för varje koncentration). Ingen påverkan av analysens resultat iakttoogs i samband med förhöjda nivåer av gDNA.

Tjugo läkemedelsbaserade potentiellt störande ämnen (exogena) som vanligen används eller ordineras under graviditet testades enligt EP7-A2 (Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline-Second Edition (Interferenstest i klinisk kemi, godkänd riktlinje – Andra utgåvan)). De 20 potentiellt störande ämnena

kombinerades i fyra uppsättningar, tillsattes till maternell plasma från opåverkade graviditeter med kvinnligt foster (XX) och testades i VeriSeq NIPT Solution (N = 16 för varje uppsättning). Ingen påverkan av analysens resultat iaktogs i samband med dessa exogena ämnen.

Tabell 23 Potentiellt störande ämnen (exogena)

Uppsättning 1	Uppsättning 2	Uppsättning 3	Uppsättning 4
Paracetamol	Difenhydramin	Salbutamol	Cetirizin
Cystein	Erytromycin	Bupropion	Dextrometorfan
Bisoprolol	Guaifenesin	Koffein	L-askorbinsyra
Citalopram	Heparin	Sertralin	Metoprolol
Desloratadin	Lidokain	Natriumfluorid	Nadolol

Detekteringsgräns

Detekteringsgränsen (LoD) definieras som den nivå av fosterfraktion som motsvarar 95 % sannolikhet för detektion av ett tillstånd av intresse, t.ex. T21. För att utvärdera LoD för VeriSeq NIPT Solution v2 för en rad vanliga tillstånd utfördes studier och statistiska analyser.

Sannolikheten för detektion av ett tillstånd av intresse i ett påverkat prov som bearbetas av VeriSeq NIPT Solution v2 beror främst på tre faktorer:

- ▶ fosterfraktion
- ▶ sekvenseringsdjup
- ▶ storlek och komplexitet på genomregionen av intresse.

Under förutsättning att sekvenseringsdjupet är konstant är det lättare att detektera en given aberration i ett prov med högre procentandel fosterfraktion än i ett prov med lägre procentandel fosterfraktion. Omvänt är det, under förutsättning att fosterfraktionen är konstant, lättare att detektera en given aberration i ett prov med högre sekvenseringsdjup än i ett prov med lägre sekvenseringsdjup. Slutligen är det svårare att detektera aberrationer i mindre eller mer komplexa genomregioner än aberrationer i större eller mindre komplexa genomregioner, under förutsättning att fosterfraktion och sekvenseringsdjup är konstant.

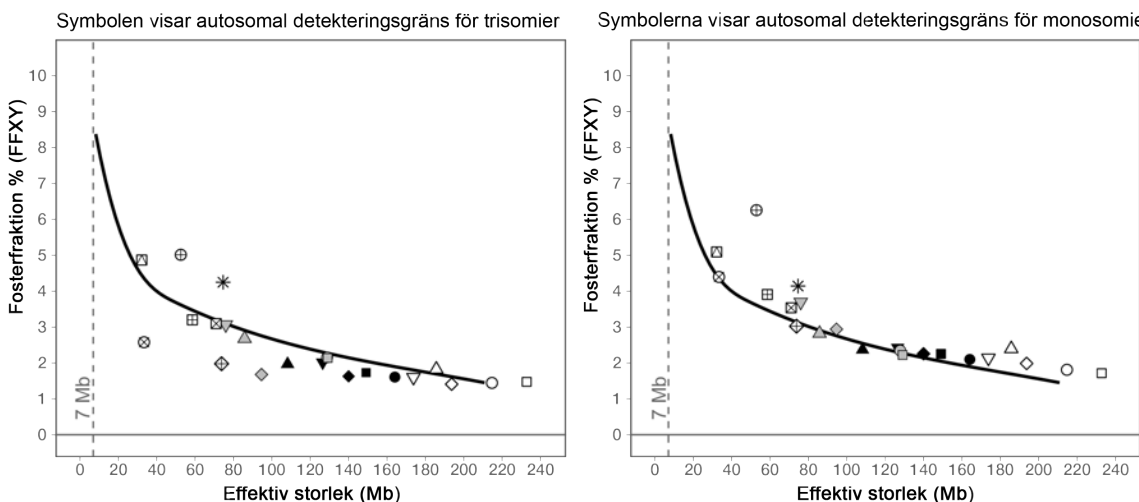
För att fastställa LoD för T21 analyserades prover som innehöll blandningar av T21-provuppsättningar och uppsättningar med opåverkade prover. De två analyttyperna blandades i en titreringsserie för att skapa en uppsättning med sju nivåer av fosterfraktion (0, 2, 3, 4, 5, 6 och 10 %). Varje nivå representerades av totalt 10 replikat.

För att ytterligare öka upplösningen på fosterfraktionsrutnätet för LoD-analysen har data från denna studie förstärkts med data som erhöles från en in silico-spädning. Effekterna av experimentell spädning och titreringsdata simulerades genom kontrollerad blandning av sekvenseringsdata. Data från denna in silico-titrering omfattade en uppsättning med 14 nivåer av fosterfraktion (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 och 4,50 %) med 32 replikat för varje nivå. En probitanalys utfördes på resulterande data för att fastställa LoD för T21.

En statistisk modell som använder fosterfraktion, sekvenseringsdjup och storlek/komplexitet på genom utvecklades oberoende för att förutsäga sannolikheten för detektion av eventuell aberration i ett prov. Denna modell fastställdes utifrån data som motsvarar en uppsättning med 1 405 XY-prover. Som beräknat genom denna modell fastställdes det att LoD för T21 var samstämmigt med den probitbaserade skattning som beskrivs ovan. Denna statistiska modell användes för att uppskatta LoD-värden för aneuploidier på alla autosomer och för partiella deletioner och duplikationer.

Bild 2 visar 95 % sannolikhet för detektion för genomsnittliga regioner efter storlek och autosomala detekteringsgränser för alla trisomier och alla monosomier.

Bild 2 95 % sannolikhet för detektion för genomsnittliga regioner efter storlek för VeriSeq NIPT Solution v2



Kro...	Symbol	Trisomi		Monosomi	
		Cutoff för LLR	LoD (%)	Cutoff för LLR	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

Kro...	Symbol	Trisomi		Monosomi	
		Cutoff för LLR	LoD (%)	Cutoff för LLR	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

Felsökning

Felsökning för VeriSeq NIPT Solution v2

Fel	Möjligt resultat	Tolkning	Rekommenderad åtgärd	Kommentarer
Otillräcklig plasmamängd	QC-fel för prov	Mängden plasma är för liten	Ta om provet.	Baseras på en visuell inspektion.
Blodprovsrörsfel	Blodkomponenterna separeras inte	Provet centrifugerades inte	Kontrollera att centrifugen startar och att röret centrifugeras med rätt kraft. Ta om provet.	
		Provet har förvarats eller transporterats inkorrekt (hemolys av provet)	Ta om provet.	Frusna prov separeras inte. Felaktiga förhållanden vid transport eller förvaring kan leda till hemolys av proverna.

Fel	Möjligt resultat	Tolkning	Rekommenderad åtgärd	Kommentarer
Igensatt prov/trögt flöde	Kontaminerad plasma	Enskilda prov kan sätta igen bindningsplattan om plasmaprovet är starkt kontaminerat	Kontrollera provet. Om plasman i röret är röd eller mjölkfärgad ska provet avbrytas och omtagning begäras. Om provet ser normalt ut ska det oanalyseras.	
	Överflödning	Den visuella inspektionen av varje rör som ska fastställa provets lämplighet var otillräcklig	Ogiltigförklara eventuella prover i närliggande brunnar som påverkas av överflödet.	Kan indikera att provet har transporterats eller förvarats på ett felaktigt sätt före bearbetningen. Du bör utesluta olämpliga prover från bearbetningen.
	Maskinvarufel	Otillräcklig spjälkning av material under extraktion	Oanalysera provet. Om problemet kvarstår för en plattbrunn med andra prover ska du kontakta Illuminas tekniska support.	
QC-fel vid kvantifiering	Underkänd kvantifiering – batchens medelvärde är under minimivärdet	Otillräckligt utbyte vid bearbetning	Upprepa kvantifieringen. Om även det andra försöket underkänns ska du kontakta Illuminas tekniska support.	Att standardkurvas mått överskrids är ett tecken på problem med biblioteksprepareringen.
	Underkänd kvantifiering	Felaktig standardkurva	Upprepa kvantifieringen. Om även det andra försöket underkänns ska du kontakta Illuminas tekniska support.	Vanliga orsaker till fel på standardkurvan inbegriper felaktigt tinade kvantifieringsreagenser, ej enhetliga volymer i brunnarna på grund av spill och nedbrytning av DNA-kvantifieringsreagenser (till exempel på grund av exponering för ljus).
Uppsättningsfel	Det går inte att slutföra uppsättningsprocessen	Uppsättningsanalysen kan inte beräkna korrekta uppsättningsvolymer	Omvärdera måluppsättningens koncentration och upprepa uppsättningsanalysen.	Kan inträffa när alla prover i ett parti har låga kvantifieringsvärden men du har ställt in en hög uppsättningskoncentration (vanligtvis högre än 3–5 pM).

Fel	Möjligt resultat	Tolkning	Rekommenderad åtgärd	Kommentarer
QC-fel vid analys av ett enskilt prov	QC-fel vid sekvensering	Otillräckligt genmaterial ELLER överföringsfel under provhantering ELLER fel på sekvenseringsreagens	Kontrollera provets kommentarer. Kontrollera om det har förekommit liknande resultat för tidigare prov med liknande plattposition. Oanalysera provet.	Resultatet indikerar att provets innehåll antingen är av låg kvalitet eller att det förekommer överföringsfel på ML STAR. Otillräckligt mängd genetiskt material kan bero på otillräckligt cfDNA i plasman eller på att cfDNA orsakar att provet för sekvensering blir för utspätt.
	Lågt FF eller antal icke-exkluderade positioner (NES)	Otillräckliga data har genererats för rättvisande rapportering	Oanalys av plasma.	

Felsökning av VeriSeq NIPT Microlab STAR

Processteg	Felkod	Felmeddelande	Beskrivning	Användaråtgärd
Batch skapas	EM0044	Angivet batch-ID innehåller förbjudna tecken.	VeriSeq NIPT Solution v2 accepterar endast siffror, bokstäver, understreck och bindestreck i alla datafält.	Döp om batchen med ett namn som inte innehåller några förbjudna tecken.
Batch skapas	EM0051	Angivet batch-ID har fler än 26 tecken.	VeriSeq NIPT Solution v2 begränsar batchnamnens längd till högst 26 tecken.	Döp om batchen med ett namn som har färre än 26 tecken.
Batch skapas	EM0076	Det går inte att ansluta till VeriSeq Onsite Server v2.	VeriSeq Onsite Server v2 svarar inte på dataförfrågningar från Workflow Manager.	Kontrollera att: 1. ML STAR är ansluten till nätverket. 2. VeriSeq Onsite Server v2 är påslagen. 3. ML STAR kan ansluta till VeriSeq Onsite Server v2 (ping-begäran). 4. Kontakta Illuminas tekniska support via e-post om ovanstående steg inte löser problemet. 5. Kontrollera om vakuumavfallsflaskan är mer än halvfull. Töm i så fall avfallsflaskan.
Batch skapas	EM0118	Batchen har misslyckats och kan inte bearbetas vidare.	Den angivna batchen har redan misslyckats och kan inte bearbetas ytterligare.	Batchprotokollet på VeriSeq Onsite Server v2 visar att den valda batchen har misslyckats. Ingen vidare bearbetning är tillåten. Skapa en annan batch med önskade prov.

Processteg	Felkod	Felmeddelande	Beskrivning	Användaråtgärd
Batch skapas	Ej tillämpligt	Batchen har redan slutfört bearbetningsprocessen. Vill du köra om uppsättningen?	Angiven batch har bearbetats i uppsättningen. Den enda tillåtna bearbetningen är att köra om uppsättningen.	Välj Re-Pool (Kör om) för att köra om. ELLER avbryt metoden och dubbelkontrollera batchnamnet.
Isolering av plasma	WP0087	Dubletter av provstreckkoder har lästs in.	Prov med identiska streckkoder har lästs in i systemet.	1. Följ uppmaningarna i Workflow Manager för att identifiera vilka prov som är dubletter. 2. Ta bort de berörda proven och märk antingen om dem eller ersätt dem. 3. Läs in proven igen.
Isolering av plasma	EP0102	Prov som anges i provarket lästes inte in.	Prov som var med på provarket var inte med bland de inlästa streckkoderna.	1. Följ uppmaningarna i Workflow Manager för att identifiera vilka prov som saknas. 2. Lägg till de saknade proven till batchen och läs in proven igen ELLER avbryt metoden, redigera provarket efter behov och starta om metoden.
Inläsning av platta	Ej tillämpligt	Venus-streckkodsmaskfel	Workflow Manager upprätthåller rätt samband mellan platta och batch med Venus-streckkodsmasker.	1. Kontrollera plattans position för att bekräfta att plattayouten är korrekt. 2. Kontrollera att platta som lästs in är rätt platta för den angivna batchen.
cfDNA-extraktion	WE0150	Trycket i vakuumkanmaren är för lågt.	Workflow Manager går inte vidare om det vilande vakuumledningstrycket är < 400 torr.	1. Kontrollera om det förekommer veck eller andra hinder i vakuumledningen. 2. Öppna avfallsledningens tryckklämmor för att frigöra trycket och stäng dem sedan helt. 3. Kontrollera att vakuumstyrenheten och -pumpen är påslagna. 4. Kontakta Illuminas tekniska support om problemet kvarstår.
	WE0153	Trycket i vakuumkanmaren är för högt.	Det kan vara fel på systemet om det uppmätta vakuumtrycket är för högt före start av tryckregleringen.	Kontrollera att alla vakuumanslutningar och -ledning sitter fast ordentligt på styrenhetens baksida.

Processteg	Felkod	Felmeddelande	Beskrivning	Användaråtgärd
cfDNA-extraktion	WE0996	Det gick inte att försegla vakuomet.	Systemet lyckas inte skapa en vakuumsförslutning på bindingsplattan.	OBS! Tryck inte på OK innan förseglingsfelet har åtgärdats fullständigt. 1. Kontrollera att bindingsplattan ligger an mot vakuumgrenröret. Använd en behandlad hand för att trycka ned bindingsplattan med hårt tryck. 2. Välj OK för att starta cfDNA-extraktionen. 3. Om felmeddelandet visas fler än tre gånger i rad ska du skicka ett e-postmeddelande till Illuminas tekniska support.
	WM0219	Starta om pumpen manuellt om vakuomet är påslaget.	Vakuomet kan fortsätta vara påslaget efter att en metod har avbrutits under extraktion.	1. Tryck på strömbrytaren på vakuumstyrenheten för att stänga av vakuomet. 2. Vänta i 10 sekunder och tryck sedan på strömbrytaren igen för att slå på vakuomet.
	EE0477	Ett fel inträffade när plattan flyttades. (iSWAP-fel)	Om ett iSWAP-fel uppstår (tappad platta, plattan gick inte att lyfta osv.) kommer systemet att uppmana användaren att slutföra förflyttningen av plattan manuellt.	Kontrollera att plattan fortfarande kan användas (att inget material har spillts). – Avbryt körningen om den inte kan det. – Om den kan det ska du följa anvisningarna för att flytta plattan manuellt.
	EE0519	Skannad streckkod matchar inte den streckkod som angivits för bindingsplattan.	Den inlästa bindingsplattan matchar inte streckkoden på den platta som tagits bort.	Kontrollera att platta som läses in matchar den angivna streckkoden (se spårningsloggen för den förväntade streckkoden).
API	EA0372	Det går inte att ansluta till dataservern.	VeriSeq Onsite Server v2 svarar inte på dataförfrågningar från Workflow Manager.	Kontrollera att: 1. ML STAR är ansluten till nätverket. 2. ML STAR kan ansluta till VeriSeq Onsite Server v2 (ping-begäran). 3. VeriSeq Onsite Server v2 är påslagen.
API	EA0774	Anslutningsfel Det gick inte att validera API:ns serveranslutning.	VeriSeq Onsite Server v2 har slutat svara på dataförfrågningar från Workflow Manager.	Kontrollera att: 1. ML STAR är ansluten till nätverket. 2. ML STAR kan ansluta till VeriSeq Onsite Server v2 (ping-begäran). 3. VeriSeq Onsite Server v2 är påslagen.
	EA0780	403: Ogiltig begäran Den aktuella transaktionen är ogiltig.	Data som skickas bryter systemets arbetsflödeslogik.	Mer information finns i felinformationen. Vanliga orsaker är indata som tar för lång tid att överföra eller bryter mot listan över godkända tecken.

Referenser

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

Revisionshistorik

Dokument	Datum	Ändringsbeskrivning
Dokumentnr 1000000079751 v06	Augusti 2020	<ul style="list-style-type: none"> Adressen till den auktoriserade europeiska representanten har uppdaterats.
Dokumentnr 1000000079751 v05	December 2020	<ul style="list-style-type: none"> Avsnitten "Grundläggande principer", "Varningar och försiktighetsåtgärder" och "Märkning av produkter" har uppdaterats med ytterligare information för att uppfylla föreskrifter. Mindre uppdateringar har gjorts i innehållet i protokollet för att matcha Illuminas nuvarande stil och struktur. Beskrivningen i avsnittet "Analysprestanda" (underavsnittet "Precision") av kromosom 21 som "den näst minsta autosomen hos människan" har ändrats till "den minsta autosomen hos människan". Skyddsangivelser har lagts till i avsnitten "Isolera plasma" (underavsnittet "Förberedelser") och "Tolkning av resultat", angående felaktig användning av behållare och risken för att prover blandas. Nya artikelnummer har lagts till för den nya servermodellen och uppdaterad programvara. Skyddsangivelser har lagts till i protokoll- och felsökningsinformationen för att uppmärksamma och förhindra att prover flödar över. De aktiva ingredienserna i reagensen DNA Quantification Standard (Standard DNA-kvantifiering) i tillbehörssatsen uppdaterades för att stämma överrens med säkerhetsdatabladet. Namngivningskonventionen för Local Run Manager VeriSeq NIPT-modulen uppdaterades för att stämma överrens med annan dokumentation. Revisionshistorik lades till.
Dokumentnr 1000000079751 v04	Oktober 2020	<ul style="list-style-type: none"> Mindre korrigeringar.
Dokumentnr 1000000079751 v03	September 2020	<ul style="list-style-type: none"> Listan över material uppdaterades för att visa specifikationer för laborieutrustning tillsammans med kända kompatibla alternativ.
Dokumentnr 1000000079751 v02	Februari 2020	<ul style="list-style-type: none"> Presentationen av information i avsnittet "Klinisk prestanda" uppdaterades för att bättre förmedla skillnaderna mellan screeningstyperna basic (grundläggande) och genomwide (hela genom). Det nya avsnittet "Skillnader i resultat mellan grundläggande screening och screening av hela genom" lades till. Motsägelsefull information angående om den kompletterande rapporten är valfri eller ej har tagits bort från avsnittet "Grundläggande principer". Namngivningskonventionen för programmet VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 har uppdaterats i hela dokumentet för att vara konsekvent. Adresserna till den australiska sponsorn och Illumina Netherlands har uppdaterats för att återspegla de senaste ändringarna.
Dokumentnr 1000000079751 v01	Augusti 2019	Ett duplicerat steg i avsnittet i Extrahera cfDNA, som orsakat av felaktig publiceringsprogramvara, har tagits bort.
Dokumentnr 1000000079751 v00	Maj 2019	Första utgåvan.

Patent och varumärken

Dokumentet och dess innehåll tillhör Illumina, Inc. och dess dotterbolag ("Illumina") och är endast avsett för användning enligt avtal i samband med kundens bruk av produkterna som beskrivs häri. Allt annat bruk är förbjudet. Dokumentet och dess innehåll får ej användas eller distribueras i något annat syfte och/eller återges, delges eller reproduceras på något vis utan föregående skriftligt tillstånd från Illumina. I och med detta dokument överlåter Illumina inte någon licens som hör till dess patent, varumärke eller upphovsrätt, eller i enlighet med rättspraxis eller liknande tredjepartsrättigheter.

Instruktionerna i detta dokument ska följas till punkt och pricka av kvalificerad och lämpligt utbildad personal för att säkerställa rätt och säker produktanvändning i enlighet med beskrivning häri. Hela innehållet i dokumentet ska läsas och förstås i sin helhet innan produkten (produkterna) används.

UNDERLÅTENHET ATT LÄSA OCH FÖLJA ALLA INSTRUKTIONER HÄRI I SIN HELHET KAN MEDFÖRA SKADA PÅ
PRODUKTEN/PRODUKTERNA, PERSONSKADA, INKLUSIVE SKADA PÅ ANVÄNDAREN/ANVÄNDARNA ELLER ANDRA PERSONER
SAMT SKADA PÅ ANNAN EGENDOM, OCH LEDER TILL ATT EVENTUELL GARANTI FÖR PRODUKTEN/PRODUKTERNA BLIR OGILTIG.

ILLUMINA KAN INTE ÅLÄGGAS NÅGOT ANSVAR SOM UPPKOMMER GENOM FELAKTIG ANVÄNDNING AV PRODUKTERNA SOM
BESKRIVS HÄRI (INKLUSIVE DELAR DÄRI ELLER PROGRAM).

© 2021 Illumina, Inc. Med ensamrätt.

Alla varumärken tillhör Illumina, Inc. eller respektive ägare. Specifik varumärkesinformation finns på
www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktinformation



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 USA
+1 800-8094566
+1 858-2024566 (utanför Nordamerika)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

CE
2797



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

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

Märkning av produkter

En fullständig lista över symbolerna på produktens förpackning och etiketter finns i symbolförklaringen för din sats på support.illumina.com.

En sammanfattning av säkerheten och prestanda finns på <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>, efter lanseringen av Europeiska databasen för medicintekniska produkter (Eudamed), där den är länkad till Basic UDI-DI (0081627002NIPTRP).