

# Indlægsseddel til VeriSeq NIPT Solution

KUN TIL IN VITRO-DIAGNOSTIK

## Tilsigtet brug

VeriSeq NIPT Solution er en *in vitro*-diagnostisk test, der anvendes til at udføre en sekventeringsbaseret screeningstest med henblik på detektion af føtale aneuploidier i maternelle perifere helblodsprøver fra gravide kvinder efter 10. gestationsuge. VeriSeq NIPT giver oplysninger om aneuploidistatus vedrørende følgende kromosomer: 21, 18, 13, X og Y. Dette produkt må ikke anvendes som eneste grundlag for diagnosticering eller beslutningstagen om det videre graviditetsforløb.

VeriSeq NIPT Solution omfatter: VeriSeq NIPT Workflow Manager til VeriSeq NIPT Microlab STAR, VeriSeq NIPT Sample Prep Kits og VeriSeq Onsite Server med VeriSeq NIPT Assay Software.

## Resumé og forklaring af analysen

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

Føtal aneuploidi på kromosom 21, 18, 13, X og Y kan detekteres med en høj præcisionsgrad med en ikke-invasiv prænatal test (NIPT - noninvasive prenatal testing) ved hjælp af helgenomsekventering af cellefrit DNA (cfDNA) indhentet fra maternel plasma efter 10. gestationsuge. I en nylig metaanalyse af flere kliniske studier blev der rapporteret om følgende vægtede samlede detektionsrater og specificiteter for trisomi 21 og trisomi 18 ved enkeltbarnsgraviditeter: trisomi 21 hhv. 99,2 % og 99,91 % og trisomi 18 hhv. 96,3 % og 99,87 %.<sup>5</sup>

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

Helt specifik støtter følgende organisationer op om at tilbyde NIPT til alle gravide kvinder: International Society for Prenatal Diagnosis, American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) /Society for Maternal Fetal Medicine (SMFM), American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) og European Society of Human Genetics/American Society of Human Genetics.<sup>6</sup> Rådgivning inden testen, informeret samtykke og diagnostisk test med henblik på bekræftelse af et positivt cfDNA-screeningsresultat er anbefalet.<sup>7</sup>

Et studie tyder på, at brug af NIPT som en primær screening i forbindelse med alle graviditeter kunne resultere i en reduktion på 89 % i antallet af invasive procedurer med henblik på bekræftelse.<sup>8</sup>

Nærværende VeriSeq NIPT Solution er en ikke invasiv *in vitro*-diagnostisk (IVD) test, der anvender helgenomsekventering af cfDNA-fragmenter, der er udledt af maternelle perifere helblodprøver fra gravide kvinder efter 10. gestationsuge med henblik på detektion af føtal aneuploidi på kromosom 21, 18, 13 X og Y.

## Procedureprincipper

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

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

- ▶ Prøveindsamling – Der indsamles 7–10 ml maternelt perifert helblod i et cellefrit Streck-blodprøverør, der forhindrer cellelysis og genomisk kontaminering og stabiliserer helblodet ved rumtemperatur.
- ▶ Plasmaisolering – Inden for 5 dage efter indsamlingen (eller inden for 10 dage i tilfælde af opbevaring ved 4 °C) isoleres plasmaet fra det materielle perifere helblod ved hjælp af almene centrifugeringsteknikker. VeriSeq NIPT Microlab STAR opsuger og fordeler plasma i en dybbrøndsplade med 96 brønde med henblik på efterfølgende behandling.
- ▶ cfDNA-ekstraktion – Oprensning af cfDNA fra plasma opnås via adsorption på en bindingsplade, afvaskning af bindingspladen for at fjerne kontaminerende stoffer og eluering.
- ▶ Biblioteksklargøring – De oprensede cfDNA-fragmenter gennemgår en end repair-proces for at konvertere 5'- og 3'-overhæng til stumpe ender. Dernæst tilføjes der et deoxyadenosinnukleotid til 3'-enderne for at skabe et enkeltbase-overhæng. Indeksede adaptere indeholdende et enkeltbase-3' deoxythymidin-overhæng bliver så ligeret til de behandlede cfDNA-fragmenter. Det ligerede DNA bliver oprenset ved brug af fast fase-perler til revers immobilisering. Hver prøve i et sæt med 48 eller 96 prøver får en unik indeksert adapter. Adapterne tjener 2 formål:
  - ▶ Indeksere muliggør prøveidentifikation i forbindelse med efterfølgende sekventering.
  - ▶ Indeksadaptere indeholder sekvenser, der muliggør fastholdelse af biblioteket på den faste overflade af en sekventeringsflowcelle med henblik på clustergenerering og efterfølgende sekventering.
- ▶ Kvantificering – Biblioteksproduktet bliver kvantificeret ved brug af et fluorescerende farvestof med koncentrationsbestemmelse ved sammenligning med en DNA-standardkurve.
- ▶ Oprettelse af bibliotekspuljer og sekventering – Batchbibliotekerne med 48 prøver bliver samlet i puljer i tilpassede mængder for at minimere variation i dækningen. Batchpuljerne med 48 prøver bliver så sekventeret ved brug af et next-generation-sekventeringsinstrument med følgende specifikationer: kapacitet til 2x36 paired end-læsninger, kompatibilitet med indeksadapterne i VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, kemi baseret på 2 farvestoffer og automatisk oprettelse af .BCL-filer (rådata fra sekventeringsinstrumentet). VeriSeq NIPT Solution inkluderer ikke sekventeringsudstyr og materialer.
- ▶ Analyse – Nukleotidbasebestemmelsen sker direkte på baggrund af signalintensitetsmålinger i løbet af sekventeringen. Den sekundære analyse består af:
  - ▶ Demultiplexing af aflæsningerne ved brug af indekssekvenserne
  - ▶ Tilknytning af sekvenserne til et humant referencegenom
  - ▶ Beregning af antallet af unikke læsninger i hvert område (bin) på 100 kb.
  - ▶ Normalisering af dækningen på et subkromosalt niveau
- ▶ Der anvendes oplysninger fra paired end-læsningen til at vurdere dækningen (antallet af unikke læsninger på linje med referencen pr. prøve) og længden af de individuelle fragmenter i prøven. Den føtale fraktion i hver prøve bliver estimeret på baggrund af dækningsprofilering, størrelsesfordeling og kopiantal på kromosom X. Slutteligt bliver disse statistiske input anvendt til at fastlægge over- eller underrepræsentation af kromosom 21, 18, 13, X og Y. Resultaterne bliver opsummeret i en rapport med angivelse af "aneuploidy detected" ("aneuploidi detekteret") eller "no aneuploidy detected" ("ingen aneuploidi detekteret") for hvert målkromosom i prøver, der lever op til kvalitetskontrollens målinger. Rapporten indeholder også et føtalt fraktionsestimat for hver prøve.

## Procedurens begrænsninger

- ▶ VeriSeq NIPT Solution er en screeningstest og bør betragtes i sammenhold med andre kliniske fund og testresultater. Der bør ikke træffes beslutninger om det videre forløb, herunder afslutning af graviditeten, alene på baggrund af resultaterne af NIPT-screeningen.<sup>7</sup>
- ▶ Analysen kræver maternelle perifere helblodprøver fra gravide kvinder efter 10. gestationsuge.
- ▶ Testresultaterne kan være påvirket af visse maternelle og føtale faktorer, inklusive men ikke begrænset til:
  - ▶ Nylig maternel blodtransfusion
  - ▶ Maternel organtransplantation
  - ▶ Maternel kirurgisk indgreb
  - ▶ Maternel immunbehandling eller stamcellebehandling
  - ▶ Maternel malignitet
  - ▶ Maternel mosaicisme
  - ▶ Mosaicisme begrænset til placenta
  - ▶ Fosterdød
  - ▶ Forsvindende tvilling
  - ▶ Føtal partiel trisomi eller partiel monosomi
  - ▶ Føtal mosaicisme
- ▶ Evidens, der støtter sensitivitet og specificitet for testen, dækker enkeltbarns- og tvillingegraviditeter. Denne brugervejledning indeholder ikke sensitivitets- eller specificitetsdata for graviditeter med trillinger eller derover.
- ▶ VeriSeq NIPT Solution rapporterer om følgende:
  - ▶ Overrepræsentation af kromosom 21, 18 og 13
  - ▶ Følgende kønskromosomale aneuploidier: XO, XXX, XXY og XYY
- ▶ VeriSeq NIPT Solution er ikke beregnet til detektion af polyploidi, såsom triploidi.
- ▶ VeriSeq NIPT Solution-testen leder efter specifikke kromosomale abnormiteter. Resultatet No Aneuploidy Detected (Ingen aneuploidi detekteret) udelukker ikke muligheden for kromosomale abnormiteter i de testede kromosomer. Desuden udelukker et negativt resultat ikke muligheden for, at graviditeten er forbundet med andre kromosomale abnormiteter, genetiske sygdomme eller fosterskader (f.eks. neuralrørsdefekter).

## Produktkomponenter

VeriSeq NIPT Solution består af:

- ▶ VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (48 prøver) (delnr. 15066801)
- ▶ VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (96 prøver) (delnr. 15066802)
- ▶ VeriSeq Onsite Server (delnr. 15076164)
  - ▶ VeriSeq NIPT Assay Software, forudinstalleret på VeriSeq Onsite Server
- ▶ VeriSeq NIPT Microlab STAR (delnr. Hamilton Company Reno: 95475-01 (115V) & 95475-02 (230V), Hamilton Company Bonaduz: 806288)
  - ▶ VeriSeq NIPT Workflow Manager, forudinstalleret på VeriSeq NIPT Microlab STAR

## Reagenser

### Medfølgende reagenser

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

## VeriSeq NIPT Sample Prep, Extraction Box

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

Reagensnavn på mærkat	Antal beholdere i kit	Mærkatvolumen	Aktive stoffer	Opbevaring
Lysis Buffer	1	100 ml	Guanidinhydrochlorid i vandig bufferopløsning	15 °C til 30 °C
Wash Buffer I	1	125 ml	Guanidinhydrochlorid og 2-propanol i vandig bufferopløsning	15 °C til 30 °C
Wash Buffer II	1	25 ml	Vandig bufferopløsning indeholdende salte	15 °C til 30 °C
Elution Buffer	1	30 ml	Vandig bufferopløsning	15 °C til 30 °C
Proteinase Buffer	1	35 ml	Glycerol i vandig bufferopløsning	15 °C til 30 °C
Proteinase K	3	75 mg	Lyofiliseret Proteinase K	15 °C til 30 °C

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

Reagensnavn på mærkat	Antal beholdere i kit	Mærkatvolumen	Aktive stoffer	Opbevaring
Lysis Buffer	1	100 ml	Guanidinhydrochlorid i vandig bufferopløsning	15 °C til 30 °C
Wash Buffer I	1	125 ml	Guanidinhydrochlorid og 2-propanol i vandig bufferopløsning	15 °C til 30 °C
Wash Buffer II	2	25 ml	Vandig bufferopløsning indeholdende salte	15 °C til 30 °C
Elution Buffer	1	30 ml	Vandig bufferopløsning	15 °C til 30 °C
Proteinase Buffer	1	35 ml	Glycerol i vandig bufferopløsning	15 °C til 30 °C
Proteinase K	4	75 mg	Lyofiliseret Proteinase K	15 °C til 30 °C

## VeriSeq NIPT Sample Prep, Library Prep Box

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

Reagensnavn på mærkat	Antal beholdere i kit	Mærkatvolumen	Aktive stoffer	Opbevaring
End Repair Mix	1	2,72 ml	DNA-polymerase og dNTP'er i vandig bufferopløsning	-25 °C til -15 °C
A-Tailing Mix	1	910 µl	DNA-polymerase og dATP i vandig bufferopløsning	-25 °C til -15 °C
Ligation Mix	1	233 µl	DNA-ligase i vandig bufferopløsning	-25 °C til -15 °C
Hybridization Buffer	1	12 ml	Vandig bufferopløsning	-25 °C til -15 °C
VeriSeq NIPT DNA Adapter Plate	1	I/T	Oligonukleotider i vandig bufferopløsning	-25 °C til -15 °C

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

Reagensnavn på mærkat	Antal beholdere i kit	Mærkatvolumen	Aktive stoffer	Opbevaring
End Repair Mix	1	2,72 ml	DNA-polymerase og dNTP'er i vandig bufferopløsning	-25 °C til -15 °C
A-Tailing Mix	2	910 µl	DNA-polymerase og dATP i vandig bufferopløsning	-25 °C til -15 °C
Ligation Mix	2	233 µl	DNA-ligase i vandig bufferopløsning	-25 °C til -15 °C
Hybridization Buffer	1	12 ml	Vandig bufferopløsning	-25 °C til -15 °C
VeriSeq NIPT DNA Adapter Plate	1	I/T	Oligonukleotider i vandig bufferopløsning	-25 °C til -15 °C

## VeriSeq NIPT Sample Prep, Accessory Box

Tabel 5 VeriSeq NIPT Accessory Box, delnr. 15066811

Reagensnavn på mærkat	Antal beholdere i kit	Mærkatvolumen	Aktive stoffer	Opbevaring
DNA Binding Plate	1	I/T	Mikroplade i propylen med membran i modificeret silikone	2 °C til 8 °C
Resuspension Buffer	1	35 ml	Vandig bufferopløsning	2 °C til 8 °C
Sample Purification Beads	1	10 ml	Paramagnetiske fastfase-perler i vandig bufferopløsning	2 °C til 8 °C
DNA Quantification Reagent	1	294 µl	DNA-interkalerende farvestof i DMSO	2 °C til 8 °C
DNA Quantification Standard	1	110 µl	dsDNA-standard, ikke-specifik DNA og natriumazid i vandig bufferopløsning	2 °C til 8 °C

## VeriSeq NIPT Sample Prep, Workflow Tubes and Labels

Tabel 6 Workflow Tubes and Labels, delnr. 15071543

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

## Reagenser, der ikke medfølger

### Nødvendige reagenser, der ikke medfølger

- ▶ DNase-/RNase-frit vand
- ▶ Ethanol, 100 % (200 proof) til molekylærbiologi

- ▶ Nødvendige sekventeringsreagenser og brugsartikler til next-generation-sekventeringssystemet (NGS-systemet).

### Valgfri reagenser, der ikke medfølger

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

## Opbevaring og håndtering

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

## Udstyr og materialer

### Nødvendigt udstyr og nødvendige materialer, som ikke medfølger

#### Nødvendigt udstyr, som ikke medfølger

Udstyr	Leverandør
Enkeltkanalspipetter, 20 µl	Almen laboratorieleverandør
Enkeltkanalspipetter, 200 µl	Almen laboratorieleverandør
Enkeltkanalspipetter, 1.000 µl	Almen laboratorieleverandør
Pipettehjælper	Almen laboratorieleverandør
Køleskab, 2 °C til 8 °C	Almen laboratorieleverandør
Fryser, -25 °C til -15 °C	Almen laboratorieleverandør
Mikrocentrifuge	Almen laboratorieleverandør
Vortexblander	Almen laboratorieleverandør
Centrifuge og rotoenhed til blodprøverør	

Udstyr	Leverandør
<b>Anbefalet:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Allegra 6 Series Centrifuge, 1600 g</li> <li>• Allegra Centrifuge GH-3.8 Rotor with buckets (centrifugerotor med spande)</li> <li>• Allegra Centrifuge Bucket Covers, set of two (låg til spande, sæt med to)</li> <li>• Allegra Centrifuge Adapter Assembly, 16 mm, set of four (adapterenhed, 16 mm, sæt med fire)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Beckman Coulter, artikelnr. 366830 (120 V)</li> <li>• Beckman Coulter, artikelnr. 360581</li> <li>• Beckman Coulter, artikelnr. 360585</li> <li>• Beckman Coulter, artikelnr. 359150</li> </ul>
<b>Tilsvarende:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kølet centrifuge med kapacitet til 1600 x g med indstillingsmuligheden "ingen bremse"</li> <li>• Svingende spand-rotor med spande</li> <li>• Spand-indsatser, kapacitet til 48 eller 96 rør, minimumsdybde 76 mm</li> <li>• Indsatsadaptere til understøttelse af 16 x 100 mm-blodprøverør</li> </ul>	Almen laboratorieleverandør
<b>Centrifuge og rotoenhed til mikroplader</b>	
<b>Anbefalet:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sorvall Legend XTR Centrifuge</li> <li>• HIGHPlate 6000 Microplate Rotor (mikropladerotor)</li> <li>• En af følgende supportbaser til mikroplader: <ul style="list-style-type: none"> <li>• MicroAmp 96-Well Support Base (supportbase til 96 brønde)</li> <li>• 96-Well PCR Plate Carrier (holder til PCR-plade med 96 brønde)</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Thermo Fisher Scientific, katalognr. 75004521 (120 V) eller katalognr. 75004520 (230 V)</li> <li>• Thermo Fisher Scientific, katalognr. 75003606</li> <li>• Thermo Fisher Scientific, katalognr. 4379590</li> <li>• Thermo Fisher Scientific, katalognr. AB-0563/1000</li> </ul>
<b>Tilsvarende:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Centrifuge med kapacitet til 5600 x g</li> <li>• Svingende pladerotor med holdere til plader med 96 brønde, minimumsdybde 76,5 mm</li> <li>• Supportbase til mikroplader</li> </ul>	Almen laboratorieleverandør
<b>En af følgende mikropladelæsere (fluorometer) med SoftMax Pro v6.2.2 eller højere:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Gemini XPS</li> <li>• SpectraMax M2</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Molecular Devices, delnr. XPS</li> <li>• Molecular Devices, delnr. M2</li> </ul>
<b>SpectraMax High-Speed USB, Serial Adapter (serieadapter)</b>	Molecular Devices, delnr. 9000-0938
<b>Termocykler med følgende specifikationer:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Opvarmet låg</li> <li>• Temperaturinterval: 4 °C til 98 °C</li> <li>• Temperaturpræcision: ± 2 °C</li> <li>• Minimal temperaturændringshastighed: 2 °C pr. sekund</li> <li>• Kompatibel med Twin.tec PCR Plate 96-well, full skirt (Twin.rec PCR-plade, 96 brønde, fuldt skørt)</li> </ul>	Almen laboratorieleverandør
<b>VeriSeq NIPT Microlab STAR</b>	Hamilton, delnr. 95475-01 (115 V) eller delnr. 95475-02 (230 V)
<b>Next-generation-sekventeringssystem (NGS-system) med følgende egenskaber:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 x 36 bp paired end-sekventering</li> <li>• Kompatibel med dobbeltindeksadapterne i VeriSeq NIPT Sample Prep</li> <li>• Automatisk oprettelse af .BCL-filer</li> <li>• Kemi baseret på to farvestoffer</li> <li>• 400 millioner paired end-læsninger pr. kørsel</li> <li>• Kompatibel med VeriSeq NIPT Assay Software</li> </ul>	Instrumentleverandør
<b>VeriSeq OnSite Server</b>	Illumina, delnr. 15076164

## Valgfrit udstyr, medfølger ikke

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

## Nødvendige materialer, som ikke medfølger

Materiale	Leverandør
1000 µl Conductive Non-Sterile Filter Tips (Konduktive ikke-sterile filterspidser, 1000 µl )	Hamilton, delnr. 235905
300 µl Conductive Non-Sterile Filter Tips (Konduktive ikke-sterile filterspidser, 1000 µl )	Hamilton, delnr. 235903
50 µl Conductive Non-Sterile Filter Tips (Konduktive ikke-sterile filterspidser, 1000 µl )	Hamilton, delnr. 235948
Deep-Well Reservoir (Dybbrøndsreservoir)	Corning Axygen, produktnr. RES-SW96-HP-SI
MagNA Pure LC Medium Reagent Tub 20, 20 ml (Reagenskar, 20 ml)	Roche, produktnr. 3004058001
Deep-Well Plate 96, 2 ml (Dybbrøndsplade 96, 2 ml)	Hamilton, artikelnr. 951033600
Low Volume 384 Well Black Flat Bottom Polystyrene Microplate (Polystyrenmikroplade, lav volumen, 384 brønde, sort, flad bund)	Corning, produktnr. 3820
Twin.tec PCR Plate 96-well, full-skirt (Twin.tec PCR-plade, 96 brønde, fuldt skørt)	Eppendorf, delnr. 30129512
En af følgende forseglingsfolier: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Microseal 'F' Foil</li> <li>• Foil seals</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bio-Rad, katalognr. MSF1001</li> <li>• Beckman Coulter, artikelnr. 538619</li> </ul>
Cell-Free DNA BCT CE	Streck, katalognr. 218997
Push Caps (Trykhætter)	Sarstedt, bestillingsnr. 65.802
2 ml-rør med skruehætte	Almen laboratorieleverandør
20 µl filterspidser til 20 µl pipettor	Almen laboratorieleverandør
200 µl filterspidser til 200 µl pipettor	Almen laboratorieleverandør
1000 µl filterspidser til 1000 µl pipettor	Almen laboratorieleverandør
Serologiske pipetter, 25 ml	Almen laboratorieleverandør
Serologiske pipetter, 10 ml	Almen laboratorieleverandør
Anbefalet: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Deconex® SOLARSEPT</li> <li>• Deconex® 61 DR</li> </ul>	Borer Chemie AG
Tilsvarende: <ul style="list-style-type: none"> <li>• En alkoholbaseret, hurtigtvirkende desinfektionsspray</li> <li>• En opløsning med desinficerende rensmiddel</li> </ul>	Almen laboratorieleverandør



## Valgfri materialer, som ikke medfølger

Materiale	Leverandør
Rør, skruehætte, 10 ml	Sarstedt, bestillingsnr. 60.551
Rør, skruehætte, 50 ml	Almen laboratorieleverandør

## Indhentning, transport og opbevaring af prøver



### FORSIGTIG

Alle prøver skal håndteres som potentielt infektiøse stoffer.

- 1 Der skal anvendes helblodsprøver à 7–10 ml, der er indsamlet i Streck Cell-Free DNA BCT. Må ikke nedfryses.
- 2 Opbevar blodprøverørerne ved 4 °C op inden for 5 dage efter indhentning, og gennemfør plasmaisolering inden for 10 dage.
- 3 Helblod skal transporteres i overensstemmelse med alle gældende forordninger vedrørende transport af ætiologiske stoffer.

## Advarsler og forsigtighedsregler

- ▶ Denne analyse indeholder proteinase K. Inhalation, indtagelse, hudkontakt og øjenkontakt kan resultere i personskader. Anvend den i et område med god ventilation iført beskyttende beklædning, og undgå indånding af støv. Alle beholdere og ikke anvendt indhold skal bortskaffes i henhold til gældende nationale sikkerhedsstandarder
- ▶ Denne analyse indeholder guanidiniumchlorid. Inhalation, indtagelse, hudkontakt og øjenkontakt kan resultere i personskader. Anvend den i et område med god ventilation iført beskyttende beklædning. Alle beholdere og ikke anvendt indhold skal bortskaffes i henhold til gældende nationale sikkerhedsstandarder
- ▶ Denne analyse indeholder 2-propanol, som er et brandfarligt kemikalie. Må ikke opbevares i nærheden af varme og åben ild. Inhalation, indtagelse, hudkontakt og øjenkontakt kan resultere i personskader. Anvend den i et område med god ventilation iført beskyttende beklædning. Alle beholdere og ikke anvendt indhold skal bortskaffes i henhold til gældende nationale sikkerhedsstandarder
- ▶ For at forhindre dannelse af skadelige gasser må affald fra cfDNA-ekstraktion (indeholder guanidinthiocyanat) ikke bortskaffes sammen med affald indeholdende blegemiddel (natriumhypochlorit).
- ▶ Alle prøver skal håndteres som potentielt infektiøse stoffer.
- ▶ Overhold laboratoriets rutinemæssige forholdsregler. Må ikke pipetteres med munden. Der må ikke indtages mad og drikke eller ryges i arbejdsområderne. Anvend engangshandsker og laboratoriekittel i forbindelse med håndtering af prøver og analysereagenser. Vask hænderne grundigt efter håndtering af prøver og analysereagenser.
- ▶ Brug ikke analysekomponenterne efter den udløbsdato, der er angivet på analyseæskens etiket. Byt ikke om på analysekomponenter fra forskellige analysepartier. Analysepartiet (lot-/batchnummer) er angivet på analyseæskens etiket Opbevar analysekomponenterne ved de anviste temperaturer.
- ▶ For at forhindre nedbrydning af prøver eller reagenser skal det tilsikres, at alle natriumhypochloritdampe som følge af rengøring er fuldstændigt forsvundet, inden protokollen påbegyndes.
- ▶ Manglende overholdelse af de beskrevne fremgangsmåder kan resultere i fejlagtige resultater eller betydeligt nedsat prøve kvalitet.

## Noter til fremgangsmåde

### Forebyggelse af kontaminering

- ▶ Anvend nye spidser og nye engangslaboratorieartikler.
- ▶ Bland prøver med en pipette. Brug af aerosolbestandige spidser reducerer risikoen for overførselskontaminering og krydskontaminering fra prøve til prøve. Centrifuger efter vortex-blanding.
- ▶ På grund af risikoen for kontaminering skal der udvises ekstrem forsigtighed for at sikre, at brøndindholdet bliver helt nede i brønden. Undgå at plaske med indholdet.
- ▶ Følg gældende forordninger vedrørende korrekt laboratoriepraksis og -hygiejne i forbindelse med håndtering af blod og blodderivater.

### Rengøring af dækket på VeriSeq NIPT Microlab STAR

- ▶ Kontrollér, at dækket er rent, inden brug. Den ugentlige vedligeholdelse skal gennemføres mindst én gang om ugen. Følg nedenstående rengøringsvejledning.
- ▶ Rengør alle holdere med en alkoholbaseret, hurtigtvirkende desinfektionsspray (Deconex® SOLARSEPT eller tilsvarende), og lad dem tørre. Hvis de er meget snavsede, skal de efterfølgende lægges i blød i en opløsning med desinficerende rensmiddel (Deconex® 61 DR rensesvæske eller tilsvarende).
- ▶ Åbn skærmen på forsiden, og tør dækket over med en klud, der er vædet i Deconex® SOLARSEPT (eller tilsvarende). Det er særligt vigtigt at kontrollere, at glideklodserne er rene.
- ▶ Fjern CVS-manifolden, og rengør manifolden, tætningen og de indvendige kamre i CVS med en klud. Tøm spidsaffaldet fra CORE 96-hovedet og den uafhængige kanal.
- ▶ Fjern spidsudskubningspladen på spidsaffaldsstationen tilknyttet den uafhængige kanal, og rengør den: Spray Deconex® SOLARSEPT (eller tilsvarende) direkte på overfladen, og tør den over. Træk en ny plastikpose over rammen, og sæt den på plads igen. Sæt den rene spidsudskubningsplade på plads igen.
- ▶ Spray Deconex® SOLARSEPT (eller tilsvarende) direkte på overfladen af affaldsboksen og -skakten tilknyttet CORE 96-hovedet og rengør med en klud.
- ▶ Væd en fnugfri klud eller vatpind med 70 % ethanol. Tør laserscannervinduet på stregkodelæseren over. Rengør alle brøndene på CPAC-pladeadapteren med den samme klud eller vatpind. Hvis du bruger en klud, skal du trykke kluden ned i hver brønd på adapteren med bagenden af en kuglepen, så du er sikker på, at brøndens inderside bliver rengjort korrekt.
- ▶ Rengør de uafhængige kanaler:
  - ▶ Rengør spidsudskubningsmuffen (den ydre del af pipettekanalerne) på de uafhængige kanaler med en fnugfri klud, der er gennemvædet med Deconex® SOLARSEPT (eller tilsvarende). (Se *Hamilton Microlab STAR Reference Guide #15070074*).
  - ▶ Rengør stopdisken og O-ringene på pipettehovedet (ydre del af pipettekanalerne) med en fnugfri klud, der er gennemvædet med Deconex® SOLARSEPT (eller tilsvarende).
- ▶ Rengør CORE 96-hovedet:
  - ▶ Rengør kabinettet på 96-hovedet og bunden af stopdiskene med den samme fnugfri klud gennemvædet med Deconex® SOLARSEPT (eller tilsvarende).
  - ▶ Ved hjælp af samme klud eller en afrevet strimmel af en klud gennemvædet med Deconex® SOLARSEPT (eller tilsvarende) skal du rengøre rundt om siderne på pipettekanalerne på 96-hovedet, ligesom du ville gøre med tandtråd, så O-ringene bliver rengjort. Gentag denne procedure på alle pipettekanalerne på 96-hovedet.
- ▶ Spray for- og sideskærmen med Deconex® SOLARSEPT (eller tilsvarende), og tør efter.
- ▶ Rengør Autoload-beskyttelsesbåndet med en klud, der er gennemvædet med Deconex® SOLARSEPT (eller tilsvarende), og tør efter uden at bruge unødigt kraft.

**BEMÆRK!**

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

## Kvalitetskontrol

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

**BEMÆRK!**

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

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

## Brugervejledning

### Tips og teknikker

Medmindre der er et sikkert stoptidspunkt i protokollen, skal du straks fortsætte til næste trin.

#### Påsætning af stregkoder på plader

- Stregkoder til plader med fuldt skørt starter med PL.
- Stregkoder til dybbrøndsplader starter med DW.
- Sæt stregkoderne på siden af pladerne med fuldt skørt og dybbrøndspladerne ved siden af kolonne 12.
- Anbring pladerne med stregkoderne mod højre for at muliggøre den automatiserede scanning.

#### Påføring og fjernelse af forsegling på pladen

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

#### VeriSeq NIPT Microlab STAR

- ▶ Udfør og dokumentér den påkrævede vedligeholdelse i henhold til producentens vejledning inden brug.
- ▶ Overvåg ML STAR på de automatiserede trin. Hold øje med beskeder og operatørinstruktioner på softwaregrænsefladen VeriSeq NIPT Workflow Manager.
- ▶ Lad skærmen på forsiden være på plads under driften.
- ▶ Hold dækket ryddet for alle genstande under driften.
- ▶ På trinnene med pladevaakum:
  - ▶ Hvis du bliver bedt om det via VeriSeq NIPT Workflow Manager, skal du manuelt hjælpe med at danne forseglingen mellem pladen og vakuummanifolden.
  - ▶ I tilfælde af en fejl på udstyret skal du manuelt slukke og tænde for vakuomet, når du bliver bedt om det via Workflow Manager-softwaren.
- ▶ Lad systemet fjerne spidserne fra adapteren automatisk. Fjern ikke spidserne manuelt.

- ▶ Fjern brugte reagenser og brugsartikler, når du bliver bedt om det via Workflow Manager.
- ▶ Tøm dagligt vakuumaffaldsbeholdere. Den første beholder må aldrig være mere end halvt fyldt. Hvis vakuumaffaldet løber over, kan det beskadige vakuumpumpen.

## Behandling af blodprøver

### Fremgangsmåde

- 1 Centrifuger blodprøverne med påsat stregkode ved  $1600 \times g$  i 10 minutter ved  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  med deaktiveret bremse.
- 2 Vent, til centrifugen stopper helt, og tag så prøverørene op.  
Påbegynd plasmaisolering senest 15 minutter efter centrifugering. Hvis der går mere end 15 minutter, skal centrifugeringen gentages.
- 3 Kontrollér, at prøverne i hvert rør er velegnede, herunder kontrol af følgende:
  - ▶ Prøvevoluminen er som forventet.
  - ▶ Prøven har separeret korrekt under centrifugeringen.
  - ▶ Plasmaniveauet er mindst 1,5 ml over buffy coat-laget.
  - ▶ Prøven er ikke markant hæmoliseret (dvs. plasmaen er ikke dybrød).
  - ▶ Prøven er ikke lipæmisk (plasmaen er eksempelvis ikke uklar hvid eller mælkeagtig).
  - ▶ Prøven indeholder ingen koagler.



#### FORSIGTIG

Prøver, der har været opbevaret eller håndteret forkert, kan være uegnede. Hvis uegnede prøver bliver kørt igennem arbejdsgangen, kan de tilstoppe bindingspladen i forbindelse med ekstraktion, hvilket fører til prøveoverløb til nærliggende brønde.

- 4 Tag hætteerne af rørene, og sæt dem i rørholderne. Overfør alle prøver og eventuelle plasmakontroller for batchen.

## Plasmaisolering

### Klargøring

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



#### FORSIGTIG

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

### Fremgangsmåde

- 1 Åbn AppLauncher, og klik på VeriSeq NIPT Method.
- 2 Indtast batch-ID og brugernavn, og klik så på OK.  
Batch-ID'et må højst indeholde 26 tegn. Anvend kun tal, bogstaver, understregningstegn ( \_ ) og bindestreger (-).  
For eksempel: 2025-10-16\_Batch3.
- 3 Klik på New Batch (Ny batch). Afvent initiering, og klik så på OK for at begynde plasmaisoleringen.
- 4 Foretag en af følgende handlinger.
  - Hvis du vil overføre et eksisterende prøveark, skal du vælge det prøveark, der er knyttet til batchen, og herefter klikke på OK.
  - Hvis du vil fortsætte uden at vælge et prøveark, skal du klikke på No Sample Sheet (Ingen prøveark).
 Du finder yderligere oplysninger om oprettelse af et prøveark i *VeriSeq NIPT Solution Software Guide (dokumentnr. 1000000001949)*.

**BEMÆRK!**

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

- 5 Vælg batchstørrelsen, og klik så på OK.
- 6 Vælg antallet af NTC'er (No Template Controls), og klik så på OK.
- 7 Kontrollér, at alle strekkoder er korrekt påsat, og overfør prøverne, spidserne og pladerne (med strekkoden mod højre) til holderen. Klik på OK efter hver meddelelse om overførsel.

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

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

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

- 14 Vælg afkrydsningsfeltet Intermediate Plasma plate has been spun (Pladen Intermediær Plasma er blevet centrifugeret), og klik så på OK.
- 15 Overvåg ML STAR, mens den udfører de automatiserede trin.
- 16 Når du får besked derom via Workflow Manager, skal du kontrollere, at der ikke er nogen forhindringer på overførselsdækket på ML STAR, så ML STAR kan rydde holderne. Klik så på Unload (Ryd) for at rydde dækket.
- 17 Når du får besked derom via Workflow Manager, skal du tømme holderne og dækket.
- 18 Fjern dybbrøndspladen Final Plasma.
- 19 Gennemse pladen for følgende:
  - ▶ Konsistente voluminer i hver brønd. Den forventede volumen er cirka 900 µl.
  - ▶ Synlige cellepellets
  - ▶ Markant hæmolyse

Hvis du bemærker en synlig cellepellet eller markant hæmolyse, skal du ugyldiggøre den berørte prøve ved afslutningen af plasmaisoleringen eller via Batch Manager. Du finder yderligere oplysninger om Batch Manager i *VeriSeq NIPT Solution Software Guide (dokumentnr. 100000001949)*.
- 20 Når du bliver bedt om det via Workflow Manager, skal du klikke på OK.
- 21 Indtast kommentarer om de berørte brønde, og klik så på OK.
- 22 Foretag en af følgende handlinger.
  - Hvis du vil fortsætte til cfDNA-ekstraktion, skal du klikke på Yes (Ja).
  - Hvis du vil stoppe, skal du klikke på Exit (Afslut).

#### SIKKERT STOPTIDSPUNKT

Hvis du stopper, skal du forsegle pladen Final Plasma og opbevare den ved 2 °C til 8 °C i op til 7 dage.

## cfDNA-ekstraktion

### Klargøring

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

Artikel	Opbevaring	Instruktioner
Dybbrøndspladen Final Plasma fra <i>Plasmaisolering</i> på side 12.	2 °C til 8 °C	Lad den stå i 30 minutter, hvis den har været på køl, så den når rumtemperatur. Tag forseglingen af dybbrøndspladen Final Plasma inden brug.
Proteinase K	15 °C til 30 °C	Tilsæt langsomt 3,75 ml Proteinase Buffer til hvert reagenshætteglas. <ul style="list-style-type: none"> <li>• Klargør 3 hætteglas til 48 prøver.</li> <li>• Klargør 4 hætteglas til 96 prøver.</li> </ul> Sæt hættene på hætteglasset, og bland det på vortexblander indtil fuldstændig genopslæmning. Saml klargjort reagens fra alle hætteglas i et reagenskar.
Wash Buffer II	15 °C til 30 °C	Tilsæt 100 ml 100 % EtOH til hver reagensflaske. <ul style="list-style-type: none"> <li>• Klargør 1 flaske til 48 prøver.</li> <li>• Klargør 2 flasker til 96 prøver.</li> </ul> Vend op og ned for at blande indholdet. Udfyld afkrydsningsfeltet på flasken.

- 3 Mærk 1 ny plade med fuldt skørt Intermediær, og sæt en pladestregkode på den.
- 4 Mærk 1 ny plade med fuldt skørt cfDNA-eluering, og sæt en pladestregkode på den.
- 5 Mærk 1 ny dybbrøndsplade Intermediær ekstraktion, og sæt en dybbrøndspladestregkode på den.
- 6 Sæt en pladestregkode på pladen DNA-binding.
- 7 Klargør en 70 % EtOH-rengøringsopløsning (70 % EtOH, 30 % DNase-/RNase-frit vand) til rengøring af vakuumsystemet.

- 8 Klargør vakuumsystemet.
  - a Tag vakuummanifolden af, og rengør den med 70 % EtOH.
  - b Tøm vakuumaffaldsbeholderen.
  - c Kontrollér, at vakuumsystemet på ML STAR er tændt.

### Fremgangsmåde

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

Prøvebatchstørrelse	Holder-type	Spor	Artikel	Placeringssted
48	Spids	1-6	1000 µl-spids	1, 2
		7-12	300 µl-spids	1
96	Spids	1-6	1.000 µl-spids	1, 2, 3, 4
		7-12	300 µl-spids	1

- 3 Overfør optalte spidser til spidsholderne som følger.

Prøvebatchstørrelse	Holder-	Spor	Artikel	Placeringssted
48, 96	Spids	49-54	1000 µl-spids	1
			300 µl-spids	2
			50 µl-spids	3

- 4 Indtast placeringen af den første og den sidste spids på hvert spidsstativ, og klik så på OK.
- 5 Scan stregkoderne på Extraction Box.
- 6 Indtast brugernavn eller initialer på den person, der har klargjort reagenser, og klik så på OK.
- 7 Scan stregkoderne på Accessory Box.
- 8 Indtast brugernavn eller initialer på den person, der har klargjort reagenser, og klik så på OK.
- 9 Kontrollér, at stregkoderne er sat på, tag forseglingen af dybbrøndspladen Final Plasma, hvis relevant, og overfør pladerne (med stregkoden mod højre) til plade-holderen, som følger, og klik så på OK.

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

- 10 Kontrollér, at der er påsat en stregkode på DNA-bindingspladen, klik så på OK.
- 11 Til batchstørrelsen med 48 prøver afskæres en forsegling i halv bredde, der lægges over de ubrugte kolonner 7-12 på pladen, inden den overføres til vakuummanifolden.
- 12 Overfør pladen DNA-binding til vakuummanifolden med stregkoden vendende mod højre, og klik så på OK.

## 13 Overfør reagensrørene til reagensholderen, som anført nedenfor, og klik så på OK.

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

## 14 Overfør de anviste reagenser til dybbrøndsreservoirene, og overfør så reservoirene til dybbrøndsholderne, som følger, og klik så på OK.

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

## 15 Vent, til den automatiserede reagensvolumenkontrol er gennemført.

## 16 Kontrollér, at vakuumaffaldsbeholderen ikke er mere end halvt fyldt (tømning anbefales), og klik så på OK.

## 17 Kontrollér placeringen af alle holdere, laboratorieartikler og reagenser, og klik så på OK på skærmen Extraction Deck Verification (Verifikation af ekstraktionsdæk).

## 18 Overvåg ML STAR på de automatiserede trin.

## 19 Efter det sidste vakuumtrin skal du centrifugere pladen DNA-binding og derefter klikke på OK.

- Fjern pladen DNA-binding, og rengør bundens overflade med 70 % EtOH.
- Forsøgl eventuelle utildækkede brønde på DNA-bindingspladen, og placer den på den tomme dybbrøndsplade Final Plasma.
- Centrifuger samlingen af pladerne DNA-binding/Final Plasma ved 5600 × g i 10 minutter med aktiveret bremse.

## 20 Gennemfør vakuumrengøringen under centrifugeringen af pladen DNA-binding.

- Vent på, at den automatiserede affaldstømning bliver gennemført.
- Rengør vakuummanifolden og indersiden af vakuumsystemet med 70 % EtOH, og sæt så vakuummanifolden på plads igen.
- Vælg afkrydsningsfeltet Manifold is on Vacuum (Manifold er på vakuum) for at starte overførslen af elueringspladen på vakuummanifolden, og klik så på OK.

## 21 Fjern vakuummanifolden, og klik så på OK.

## 22 Efter centrifugering: Fjern forseglingen fra de brønde på pladen DNA-binding, der indeholder prøver, og anbring pladen DNA-binding på pladen cfDNA-eluering. Pladen cfDNA-eluering er på vakuummanifolden. Overfør pladen DNA-binding med stregekoden vendende mod højre, og klik så på OK.



23 Overvåg ML STAR på de automatiserede trin.



**FORSIGTIG**

Prøveoverløb, der ikke bliver detekteret af systemet, skal ugyldiggøres manuelt, før nærliggende brønde bliver kontamineret.

- 24 Efter inkubationstrinnet skal du vælge afkrydsningsfeltet *Plates are assembled as indicated* (Plader er samlet som anvist), hvorved du bekræfter, at samlingen af pladerne DNA-binding/cfDNA-eluering befinder sig på en supportbase (hvis centrifugen kræver det).
- 25 Forseg de utildækkede brønde på pladen DNA-binding, og centrifuger ved 5600 × g i 2 minutter med aktiveret bremse, og klik derefter på OK.
- 26 Kontrollér, at pladen cfDNA-eluering har konsistente volumener i hver brønd. Den forventede volumen er cirka 55 µl.
- 27 Forsegl og gem cfDNA-elueringspladen med henblik på biblioteksklargøring.
- 28 Når du får besked derom af Workflow Manager, skal du kontrollere, at der ikke er nogen forhindringer på overførselsdækket på ML STAR, så ML STAR kan rydde holderne. Klik så på Unload (Ryd) for at rydde dækket.
- 29 Tag alle holderne ud, og rengør ML STAR-dækket, og klik så på OK.
- 30 Indtast kommentarer om de berørte brønde, og klik så på OK.
- 31 Foretag en af følgende handlinger:
  - Klik på Yes (Ja) for at fortsætte til Klargør biblioteker.
  - Klik på Exit (Afslut) for at stoppe.

**SIKKERT STOPTIDSPUNKT**

Hvis du stopper, skal du forsegle pladen cfDNA-eluering og opbevare den ved -25 °C til -15 °C i op til 7 dage.

## Klargøring af biblioteker

### Klargøring

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

Artikel	Opbevaring	Instruktioner
End Repair Mix	-25 °C til -15 °C	Optø ved rumtemperatur. Bland på vortexblander.
A-Tailing Mix	-25 °C til -15 °C	Optø ved rumtemperatur. Bland på vortexblander, og centrifugér så kortvarigt.
Ligation Mix	-25 °C til -15 °C	Optø ved rumtemperatur. Bland på vortexblander, og centrifugér så kortvarigt.
Resuspension Buffer	2 °C til 8 °C	Bland på vortexblander. Sæt til køleopbevaring igen efter brug.
Hybridization Buffer	-25 °C til -15 °C	Optø ved rumtemperatur. Bland på vortexblander. Sæt til køleopbevaring igen efter brug.
VeriSeq NIPT DNA Adapter Plate	-25 °C til -15 °C	Optø ved rumtemperatur. Bland på vortexblander. Centrifugér ved 1000 × g i 20 sekunder. Påfør en pladestregkode
Sample Purification Beads	2 °C til 8 °C	Lad den stå i 30 minutter, så den opnår rumtemperatur. Bland grundigt på vortexblander inden hver brug. Bland på vortexblander eller ved at vende den op og ned, indtil alle perler er opslæmmet, og blandingen er homogen.
80 % EtOH	2 °C til 8 °C	Klargør ny. Bland 40 ml 100 % EtOH og 10 ml DNase-/RNase-frit vand. Vend op og ned for at blande indholdet.
Pladen cfDNA-eluering fra <i>cfDNA-ekstraktion på side 14.</i>	-25 °C til -15 °C	Kontrollér, om relevant, at pladen ikke har været opbevaret i mere end 7 dage, og optø ved rumtemperatur. Bland på vortexblander ved 1500 o/m i 1 minut. Centrifugér ved 1000 × g i 20 sekunder.

- 3 Mærk 1 ny plade med fuldt skørt Biblioteker, og påfør en pladestregkode.
- 4 Kontrollér, at temperaturstyringen på ML STAR er tændt.

### Enzymfortynding

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

Prøvebatchstørrelse	A-Tailing Mix	Resuspension Buffer
48	900 µl	1200 µl
96	1800 µl	2400 µl

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

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

## Fremgangsmåde

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

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

- 9 Hvis du stoppede protokollen efter cfDNA-ekstraktionen, skal du overføre de optalte spids

Prøvebatchstørrelse	Holder-	Spor	Artikel	Placeringssted
48, 96	Spids	49–54	1000 µl-spids	1
			300 µl-spids	2
			50 µl-spids	3

- 10 Indtast placeringen af den første spids på hvert spidsstativ, og klik så på OK.
- 11 Kontrollér, at stregkoderne er påsat, og overfør pladerne (med stregkoden mod højre) til pladeholderen, som anført nedenfor, og klik så på OK.

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

- 12 Overfør dybbrøndsholderen, som anvist nedenfor, og klik så på OK.

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

## 13 Overfør reagensrørene til reagensholderen, som anført nedenfor, og klik så på OK.

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

- 14 Kontrollér, at holderne, laboratorieartiklerne og reagenserne er overført som anvist, og klik så på OK på skærmen Library Deck Verification (Verifikation af biblioteksdæk).
- 15 Vent, til den automatiserede reagensvolumenkontrol er gennemført.
- 16 Overvåg ML STAR på de automatiserede trin.
- 17 Når du får besked derom via Workflow Manager, skal du kontrollere, at der ikke er nogen forhindringer på overførselsdækket på ML STAR, så ML STAR kan rydde holderne. Klik så på Unload (Ryd) for at rydde dækket.
- 18 Kontrollér, at pladen Biblioteker har konsistente voluminer i hver brønd.
- 19 Forsegl og gem pladen Biblioteker.
- 20 Tag holderne ud, rengør dækket, og klik så på OK.
- 21 Indtast kommentarer om de berørte brønde, og klik så på OK.
- 22 Foretag en af følgende handlinger:
- Hvis du vil fortsætte til kvantificering af biblioteker, skal du klikke på Yes (Ja).
  - Hvis du vil stoppe, skal du klikke på Exit (Afslut).

**BEMÆRK!**

Fortsæt til kvantificering med det samme, medmindre du sætter til opbevaring på et sikkert stoptidspunkt.

**SIKKERT STOPTIDSPUNKT**

Hvis du stopper, skal du forsegle pladen Biblioteker inden opbevaring. Bibliotekspladen er stabil i op til 7 dage i alt ved -25 °C til -15 °C.

## Kvantificering af biblioteker

## Klargøring

## 1 Klargør følgende reagenser:

Artikel	Opbevaring	Instruktioner
DNA Quantification Reagent	2 °C til 8 °C	Beskyttet mod lys. Optø ved rumtemperatur. Bland på vortexblander, og centrifuger så kortvarigt.
DNA Quantification Standard	2 °C til 8 °C	Bland på vortexblander, og centrifuger så kortvarigt.
Pladen Biblioteker fra <i>Klargøring af biblioteker på side 18</i>	-25 °C til -15 °C	Kontrollér, om relevant, at pladen ikke har været opbevaret i mere end 7 dage, og optø ved rumtemperatur. Bland på vortexblander. Centrifuger ved 1000 x g i 20 sekunder.
Resuspension Buffer	2 °C til 8 °C	Bland på vortexblander.

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

## Fremgangsmåde

- 1 Klik på OK for at starte kvantificering. Hvis VeriSeq NIPT Method ikke allerede er åben:

- a Åbn AppLauncher, og klik på VeriSeq NIPT Method.
- b Indtast batch-ID og brugernavn, og klik så på OK.

- 2 Scan strekkoderne på Accessory Box.

- 3 Indtast brugernavn eller initialer på den person, der har klargjort reagenser, og klik så på OK.

- 4 Overfør spidserne til spidsholderne, som angivet nedenfor, og klik så på OK.

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

- 5 Kontrollér, at strekkoderne er påsat, tag forseglingen af pladen Biblioteker, og overfør pladerne (med strekkoden mod højre) til Multiflex-holderen, som angivet nedenfor, og klik så på OK.

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

- 6 Overfør reagensrørene uden hætter til rørholderen, som anvist nedenfor, og klik så på OK.

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

- 7 Overfør reagensrørene til reagensholderen, som anført nedenfor, og klik så på OK.

Prøvebatchstørrelse	Holder-	Spor	Artikel	Placeringssted
48, 96	Reagens	47	Nye reagensrør	1
			16 ml Resuspension Buffer	2

- 8 Hvis du stoppede protokollen efter biblioteksklæringprocessen, skal du overføre de optalte spidser til spidsholderne som følger.

Prøvebatchstørrelse	Holder-	Spor	Artikel	Placeringssted
48, 96	Spids	49-54	1000 µl-spids	1
			300 µl-spids	2
			50 µl-spids	3

- 9 Indtast placeringen af den første og den sidste spids på hvert spidsstativ, og klik så på OK.

- 10 Kontrollér, at holderne, laboratorieartiklerne og reagenserne er overført som anvist, og klik så på OK på skærmen Quant Deck Verification (Verifikation af kvantifikationsdæk).

- 11 Vent, til den automatiserede reagensvolumenkontrol er gennemført.

- 12 Overvåg ML STAR på de automatiserede trin.
- 13 Når du får besked derom via Workflow Manager, skal du kontrollere, at der ikke er nogen forhindringer på overførselsdækket på ML STAR, så ML STAR kan rydde holderne. Klik så på Unload (Ryd) for at rydde dækket.
- 14 Tag pladen Biblioteker ud.
  - a Kontrollér, at der er konsistente voluminer i alle brønde på pladen.
  - b Forsegl pladen Biblioteker, og opbevar den ved rumtemperatur, indtil den fluorometriske dataanalyse er gennemført.
- 15 Tag de resterende plader med 96 brønde ud, og kontrollér, at der er konsistente voluminer i alle brønde. Synlige fejl i voluminerne kan være tegn på problemer på pipetteringsstrinnene.
- 16 Tag pladen med 384 brønde ud, og kontrollér, at der er væske i de relevante brønde.
  - a Forsegl pladen med en folieforsegling.
  - b Centrifuger ved  $1000 \times g$  i 20 sekunder.
  - c Inkuber ved rumtemperatur i 10 minutter, beskyttet mod lys.
- 17 Tag alle holderne ud, og rengør ML STAR-dækket, og klik så på OK.
- 18 Efter inkubation skal du fjerne folieforseglingen og overføre pladen med 384 brønde til mikropladelæseren. Kontrollér, at A1 er i øverste venstre hjørne, og klik på Read (Læs).
- 19 Eksportér dataene som XML, som følger:
  - a Højreklik på Barcode (Stregkode), vælg rename (omdøb), scan stregkoden på pladen Kvantificering, og klik så på OK.
  - b Klik på plade-ikonet i øverste venstre hjørne, og vælg så Export (Eksportér) i menuen.
  - c Vælg afkrydsningsfeltet Expt1 (Eksport 1), angiv outputformat XML, og klik på OK.
  - d Angiv stien til output-filen og filnavnet, og klik så på Save (Gem).

**BEMÆRK!**

Sørg for, at filplaceringen er tilgængelig for Hamilton computeren. Brug ikke mellemrum i filnavnet eller stinavnet.

## Analyse

- 1 Indtast fluorometer-ID'et på skærmen Scanner Information (Scanneroplysninger) på ML STAR.
- 2 Indtast kommentarer om fluorometerkørslen, og klik så på OK.
- 3 Gå til den .XML-quantificeringsfil, der indeholder de fluorometriske data, og klik så på OK.
- 4 Gennemse analyseresultaterne vedrørende standardkurve og prøvekoncentration, og klik så på OK.
- 5 Hvis du skal køre pladen igen, skal du klikke på Rescan (Scan igen).

**BEMÆRK!**

Prøver er tids- og lysfølsomme. Hvis det er nødvendigt med at scanne igen, skal det gøres med det samme.

- 6 Indtast kommentarer om de berørte brønde, og klik så på OK.
- 7 Vurder resultaterne, og fortsæt som følger.
  - ▶ Hvis resultaterne lever op til specifikationen, skal du fortsætte til puljebiblioteker.
  - ▶ Hvis resultaterne ikke lever op til specifikationen, afbryder systemet metoden. Gentag kvantificeringsprocedurene. Start med *Klargøring på side 20*.
- 8 Foretag en af følgende handlinger:
  - Hvis du vil fortsætte til oprettelse af bibliotekspuljer, skal du klikke på Yes (Ja).
  - Hvis du vil stoppe, skal du klikke på Exit (Afslut).

**SIKKERT STOPTIDSPUNKT**

Hvis du stopper, skal du forsegle pladen Biblioteker inden opbevaring. Bibliotekspladen er stabil i op til 7 dage i alt ved -25 °C til -15 °C.

**Oprettelse af bibliotekspuljer****Klargøring****1 Klargør følgende reagenser:**

Artikel	Opbevaring	Instruktioner
Hybridization Buffer	-25 °C til -15 °C	Optø ved rumtemperatur. Bland på vortexblander. Sæt til køleopbevaring igen efter brug.
Biblioteksplade fra <i>Kvantificeringsprocedure Fremgangsmåde på side 21.</i>	-25 °C til -15 °C	Optø ved rumtemperatur i tilfælde af forudgående køleopbevaring. Bland på vortexblander ved 1500 o/m i 1 minut. Centrifuger ved 1000 x g i 20 sekunder.

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

3 Gem følgende denatureringsprogram på termocykleren med opvarmet låg.

- ▶ Vælg funktionen til præopvarmning af låget, og indstil til 102 °C.
- ▶ Indstil reaktionsvoluminen til 50 µl.
- ▶ Indstil temperaturændringshastigheden til 4 °C pr. sekund.
- ▶ Inkuber ved 96 °C i 10 minutter og herefter ved 0 °C i 5 sekunder.
- ▶ Hold på 4 °C.

**Fremgangsmåde**

1 Placer Pladen Biblioteker på den forudprogrammerede termocykler, og kør denatureringsprogrammet.

2 Klik på OK for at starte oprettelsen af bibliotekspuljer. Hvis VeriSeq NIPT Method ikke allerede er åben:

- a Åbn AppLauncher, og klik på VeriSeq NIPT Method.
- b Indtast batch-ID og brugernavn, og klik så på OK.

3 Vælg puljekoncentrationen, og klik så på OK.

Den tilstræbte clusterdensitet er 220–260 k/mm<sup>2</sup>. Juster om nødvendigt puljekoncentrationen for at opnå den tilstræbte clusterdensitet.

4 Udfør en af følgende handlinger, når du bliver bedt om det via Workflow Manager.

- Hvis du vil overføre et prøveark, skal du vælge det prøveark, der er knyttet til batchen, og herefter klikke på Load (Overfør).
- Hvis du vil anvende systemets standardværdier for resterende prøvetyper eller kønsrapportering, skal du klikke på Use Default (Anvend standard) for hver indstilling.

Du finder yderligere oplysninger om oprettelse af et prøveark i *VeriSeq NIPT Assay Software Guide* (dokumentnr. 1000000001949).

5 Klik på Start for at igangsætte timeren for denatureringspladen.

6 Overfør spidserne til spidsholderne, som anvist nedenfor.

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

- 7 Overfør pladen Denatureret Bibliotek (med strekkoden mod højre) til Multiflex-holderen, som angivet nedenfor, og klik så på OK.

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

- 8 Overfør puljerørene til rørholderen, som anvist nedenfor, og klik så på OK.

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

- 9 Overfør reagensrørene til reagensholderen, som anført nedenfor, og klik så på OK.

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

- 10 Overfør spidserne til spidsholderne, som anvist nedenfor.

Prøvebatchstørrelse	Holder-	Spor	Artikel	Placeringssted
48, 96	Spids	49-54	1000 µl-filterspidser	1
			300 µl-filterspidser	2
			50 µl-filterspidser	3

- 11 Indtast placeringen af den første og den sidste spids på hvert spidsstativ, og klik så på OK.
- 12 Kontrollér, at holderne, laboratorieartiklerne og reagenserne er overført som anvist, og klik så på OK på skærmen Pooling Deck Verification (Verifikation af puljedæk).
- 13 Overvåg ML STAR på de automatiserede trin.
- 14 Når du får besked derom via Workflow Manager, skal du kontrollere, at der ikke er nogen forhindringer på overførselsdækket på ML STAR, så ML STAR kan rydde holderne. Klik så på Unload (Ryd) for at rydde dækket.
- 15 Tag rørholderen ud. Sæt hætter på alle puljerør, bland på vortexblander, og centrifuger så kortvarigt.
- 16 Sekventer bibliotekerne så hurtigt som muligt efter puljeoprettelse. Opbevar pladen Biblioteker ved 25 °C til 15 °C i op til 7 dage, så det er muligt at oprette nye puljer, om nødvendigt. Bibliotekspladen er stabil i op til 7 dages kumulativ opbevaring ved -25 °C til -15 °C.
- 17 Klik på OK.
- 18 Indtast kommentarer om de berørte brønde, og klik så på OK.
- 19 Klik på OK på skærmen Pooling Complete (Puljeoprettelse fuldført).

#### SIKKERT STOPTIDSPUNKT

Hvis du stopper, skal du sætte hætter på puljerørene og opbevare dem ved -25 °C til -15 °C i op til 7 dage.



## Klargøring af pulje til sekventering

### Klargøring

#### 1 Klargør følgende reagenser:

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

#### 2 Klargør next-generation-sekventeringssystemet med følgende indstillinger:

- Paired-end run with 36 x 36 cycle reads (Paired end-kørsel med 36 x 36 cykluslæsninger).
- Dual indexing with 8-cycle index reads (Dobbelt indeksering med 8-cyklussers indeksslæsninger).
- Run Name the same as Pool Name (Kørselsnavn det samme som puljenavn).



#### BEMÆRK!

Ukorrekte kørselskonfigurationer bliver afvist af analysesoftwarens og kan kræve omsekventering.

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

### Fremgangsmåde

- Tilføj buffer og bibliotekspulje direkte til sekvensprøvekassetten, som anvist nedenfor.
  - ▶ 900 µl Hybridization Buffer
  - ▶ 450 µl Pulje B
  - ▶ Bland ved pipettering
- Fortsæt til sekventering ved brug af et next-generation-sekventeringssystem i henhold til producentens instruktioner.
- Bekræft, at kørselskonfigurationen er korrekt, når du bliver bedt om det.
- Gentag proceduren for Pulje B, hvis relevant.

## Analyse af sekventeringsdata

Når sekventeringen er gennemført, bliver sekventeringsdataene automatisk sendt til VeriSeq NIPT Assay Software med henblik på analyse og generering af en rapport. Rapporten omfatter klassifikationer for hver prøve i batchen samt en vurdering af alle QC-målinger af kørslen. Analyseprocessen fra gennemførelse af sekventeringen til de endelige resultater tager cirka 4 timer for en batch med 48 prøver. Du kan finde detaljerede oplysninger om dataanalysen og output-filen i *VeriSeq NIPT Solution Software Guide (dokumentnr. 1000000001949)*.

## Tolkning af resultater

VeriSeq NIPT Solution anvender en algoritme, der er baseret på adskillige datainput, herunder sekventeringsdækning, sekventeringslæsningskvalitet og estimeret føtal fraktion, for at bestemme den føtale kromosomrepræsentation.

VeriSeq NIPT Assay Software genererer automatisk et resultat, som enten angiver ANEUPLOIDY DETECTED (ANEUPLOIDI DETEKTERET) eller NO ANEUPLOIDY DETECTED (INGEN ANEUPLOIDI DETEKTERET), vedrørende kromosom 21, 18 og 13 for hver patientprøve. Resultatet ANEUPLOIDY DETECTED (ANEUPLOIDI DETEKTERET) angiver, at prøven er screenet positiv for trisomi i det givne kromosom.

Der bliver automatisk genereret resultater vedrørende fostrets kønskromosomale status, som også kan rapporteres, hvis det ønskes (valgfrit). Hvis der ikke bliver detekteret nogen kønskromosomal aneuploidi, vil rapporten angive NO ANEUPLOIDY DETECTED (INGEN ANEUPLOIDI DETEKTERET) med vedhæftning af

kønsklassifikationen: XX (prøven viser pigefoster) eller XY (prøven viser drengfoster). Kønskromosomale aneuploidier bliver rapporteret som ANEUPLOIDY DETECTED (ANEUPLOIDI DETEKTERET) med vedhæftning af den aneuploidi, der er blevet detekteret: XXX, XXY, XYY eller XO (monosomi X). I sjældne tilfælde falder de kønskromosomale værdier uden for det rapporterbare interval, og systemet genererer så resultatet SEX CHROMOSOMES NOT REPORTABLE (IKKE-RAPPORTERBARE KØNSKROMOSOMER). Der kan stadig rapporteres resultater vedrørende autosomal aneuploidi for disse prøver.

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

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

Udover iFACT vurderer VeriSeq NIPT Assay Software adskillige andre QC-målepunkter i løbet af analysen. Øvrige målepunkter omfatter vurderinger af dækningsuniformiteten på referencegenomiske områder (DATA OUTSIDE OF EXPECTED RANGE) (DATA UDEN FOR FORVENTET OMRÅDE) og fordelingen af cfDNA-fragmentlængder (FRAGMENT SIZE DISTRIBUTION OUTSIDE OF EXPECTED RANGE) (FORDELING AF FRAGMENTSTØRRELSER UDEN FOR FORVENTET OMRÅDE). QC-vurderingen viser enten et QC-embem eller en QC-fejl for målepunkter uden for det acceptable område. I tilfælde af mislykket QC genererer systemet ikke noget resultat for prøven. I tilfælde af mislykket QC er det muligt at behandle en anden afmålt portion plasma under forudsætning af, at der er tilstrækkelig plasma i blodprøveret.



#### FORSIGTIG

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

## Ydelsesegenskaber

Nedenstående data i afsnittene Klinisk ydeevne og Analytisk ydeevne er genereret ved hjælp af de protokoller og materialer, der er beskrevet i *Brugervejledning*, startende med plasma. Alle sekventeringsdata i dette afsnit er genereret på sekventeringssystemet Illumina NextSeq 500/550 med følgende konfigurationer:

- NextSeq control software v2.1.0.31
- NexSeq 500/550 High Output Kit v2 (75-cyklus) sekventeringsreagenskit
- 2x36 paired end-sekventeringskørsel med højt output

## Klinisk studie

Der er påvist klinisk præcision af VeriSeq NIPT Solution i forhold til de udfald, der blev fastlagt ved brug af en klinisk referencestandard. Denne evaluering blev foretaget ved hjælp af plasmaprøver fra gravide kvinder med enkeltbarnsgraviditeter, der fik foretaget prænatal screening for føtale kromosomale aneuploidier. Prøverne blev indhentet fra anonymiserede deponerede plasmaprøver frembragt fra perifere helblodsprøver.

I alt 3.107 prøver blev testet. Ud af disse prøver opnåede 21 (0,68 %; 21/3.107) prøver mislykket analyse-QC i første kørsel under analysen af de færdigbehandlede sekventeringsdata:

- ▶ 11 mislykkede iFACT
- ▶ 8 havde data uden for det forventede område
- ▶ 2 havde fordeling af fragmentstørrelser uden for det forventede område.

## Demografi og graviditetskarakteristika

Moderens alder, etnicitet, gestationsalder og graviditetstrimester er opsummeret i **Tabel 7**.

Tabel 7 Demografi og graviditetskarakteristika

(N = 3086)	
<b>Moderens alder – år</b>	
Gennemsnit	36,8
Standardafvigelse	3,6
Median	36,7
25. percentil; 75. percentil	35,3; 38,8
Minimum; maksimum	18,2; 51,6
<b>Race/etnicitet – n (%)<sup>a</sup></b>	
Hvid eller kaukasier	981 (32 %)
Sort eller afroamerikaner	231 (7 %)
Hispano eller latinamerikaner	1.079 (35 %)
Asiat	706 (23 %)
Indianer	4 (0,1 %)
Multipel	58 (2 %)
Ukendt <sup>b</sup>	27 (1 %)
<b>Gestationsalder ved blodprøvetagning - uger</b>	
Gennemsnit	12,2
Standardafvigelse	2,8
Median	11
25. percentil; 75. percentil	10; 13
Minimum; maksimum	10; 25
<b>Graviditetstrimester – n (%)</b>	
Første (<14 uger)	2.520 (82 %)
Andet	566 (18 %)
Tredje (≥ 27 uger)	0 (0 %)

<sup>a</sup> Dette forsøg blev udført i USA.  
<sup>b</sup> Rapporteret som "ukendt".

## Klinisk ydeevne ved enkeltbarnsgraviditeter

Alle studieprøver havde udfald med en klinisk referencestandard (klinisk "sandhed") relateret til aneuploidistatus, der var baseret på en læges eller genetisk rådgivers vurdering af cytogenetisk test eller resultater i forbindelse med nyfødtundersøgelse. Prøver var kvalificerede til testning, hvis der blev registreret kliniske udfald vedrørende føtal aneuploidistatus på kromosom 21, 18, 13 eller føtale kønsudfald, herunder føtal skønnskromosomal aneuploidi (SCA) (monosomi X, XX, XXY eller XYY). I prøvesættet havde 3.057 prøver kliniske referencedata vedrørende autosomale aneuploidier og 3.082 havde kliniske referencedata vedrørende SCA. De resultater, der blev rapporteret af VeriSeq NIPT Solution, blev sammenlignet med udfaldene med den kliniske referencestandard.

## Krydstabulering af resultater med VeriSeq NIPT Solution i forhold til udfald med kliniske referencestandard vedrørende trisomi 21, trisomi 18 og trisomi 13.

Krydstabulering af resultaterne med VeriSeq NIPT Solution (rækker) i forhold til udfaldene med den kliniske referencestandard (kolonner) er angivet i en række 2 x 2-tabeller. Der var ingen tilfælde af krydsrapportering af autosomale aneuploidier (VeriSeq NIPT Solution detekterede f.eks. ikke trisomi 18 i en prøve, der havde et udfald med trisomi 21).

Tabel 8 Krydstabulering af trisomi 21-resultater

Resultat med VeriSeq NIPT Solution	Udfald med klinisk referencestandard <sup>a</sup>		
	Trisomi 21-afficeret	Ikke trisomi 21-afficeret	I alt
Kromosom 21-aneuploidi detekteret	90	1	91
Ingen kromosom 21-aneuploidi detekteret	1	2965	2966
I alt	91	2966	3057

<sup>a</sup> Den kliniske referencestandard blev fastsat ved hjælp af cytogenetisk test eller nyfødtundersøgelse.

Tabel 9 Krydstabulering af trisomi 18-resultater

Resultat med VeriSeq NIPT Solution	Udfald med klinisk referencestandard <sup>a</sup>		
	Trisomi 18-afficeret	Ikke trisomi 18-afficeret	I alt
Kromosom 18-aneuploidi detekteret	18	3	21
Ingen kromosom 18-aneuploidi detekteret	2	3034	3036
I alt	20	3037	3057

<sup>a</sup> Den kliniske referencestandard blev fastsat ved hjælp af cytogenetisk test eller nyfødtundersøgelse.

Tabel 10 Krydstabulering af trisomi 13-resultater

Resultat med VeriSeq NIPT Solution	Udfald med klinisk referencestandard <sup>a</sup>		
	Trisomi 13-afficeret	Ikke trisomi 13-afficeret	I alt
Kromosom 13-aneuploidi detekteret	8	4	12
Ingen kromosom 13-aneuploidi detekteret	0	3045	3045
I alt	8	3049	3057

<sup>a</sup> Den kliniske referencestandard blev fastsat ved hjælp af cytogenetisk test eller nyfødtundersøgelse.

## Følsomhed og specificitet af VeriSeq NIPT Solution vedr. detektion af trisomi 21, 18 og 13

Tabel 11 Følsomhed og specificitet af VeriSeq NIPT Solution vedr. detektion af trisomi 21, 18 og 13

	Trisomi 21	Trisomi 18	Trisomi 13
<b>Følsomhed</b>	98,9 % (90/91)	90,0 % (18/20)	100,0 % (8/8)
2-sidet 95 % CI <sup>a</sup>	(94,0 %;99,8 %)	(69,9 %;97,2 %)	(67,6 %;100,0 %)
<b>Specificitet</b>	>99,9 % (2965/2966)	99,9 % (3034/3037)	99,9 % (3045/3049)
2-sidet 95 % CI <sup>a</sup>	(99,8 %;100,0 %)	(99,7 %;100,0 %)	(99,7 %;99,9 %)

<sup>a</sup> CI (konfidensinterval) er udregnet med Wilsons metode.

Følsomhed og specificitet af VeriSeq NIPT Solution i prøver med føtale fraktionsestimater  $\leq 4\%$  og  $> 4\%$ . Prøverne i ydelsesanalyserne har estimerede føtale fraktioner i intervallet  $<1\%$  til  $30\%$ . Detektionen af føtale aneuploidier i maternel cfDNA er til dels afhængig af den føtale fraktion i hver prøve, så analysens ydeevne kan være nedsat ved lavere føtale fraktioner. Visse NIPT-metodologier anvender et striks skæringspunkt for føtal fraktion<sup>9,10,11,12</sup>, hvor  $4\%$  anses for den nederste detektionsgrænse.<sup>9,10,11</sup> Nedenstående tabeller viser ydeevnen af VeriSeq NIPT Solution ved føtale fraktionsestimater under eller lig med  $4\%$  og over  $4\%$ . Resultaterne af det kliniske studie viser, at VeriSeq NIPT Solution kan detektere føtal aneuploidi ved føtale fraktioner på  $4\%$  eller derunder.

Tabel 12 Følsomhed og specificitet i prøver med føtalt fraktionsestimat  $\leq 4\%$

	Trisomi 21	Trisomi 18	Trisomi 13
Følsomhed	90,9 % (10/11)	80,0 % (4/5)	I/T (0/0)
2-sidet 95 % CI*	(62,3 %, 98,4 %)	(37,6 %, 96,4 %)	I/T
Specificitet	99,7 % (329/330)	100,0 % (336/336)	99,7 % (340/341)
2-sidet 95 % CI*	(98,3 %, 99,9 %)	(98,9 %, 100 %)	(98,4 %, 99,9 %)

\*CI er udregnet ved Wilsons metode.

Tabel 13 Følsomhed og specificitet i prøver med føtalt fraktionsestimat  $> 4\%$

	Trisomi 21	Trisomi 18	Trisomi 13
Følsomhed	100,0 % (80/80)	93,3 % (14/15)	100 % (8/8)
2-sidet 95 % CI*	(95,4 %;100,0 %)	(70,2 %;98,8 %)	(67,6 %;100,0 %)
Specificitet	100,0 % (2636/2636)	99,9 % (2698/2701)	99,9 % (2705/2708)
2-sidet 95 % CI*	(99,9 %;100,0 %)	(99,7 %;100 %)	(99,7 %;100 %)

\*CI er udregnet ved Wilsons metode.

#### Detektion af kønskromosomale aneuploidier

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

Tabel 14 Procentvis konkordans vedrørende føtal kønsskikning

Resultat af føtal kønsskikning med VeriSeq NIPT Solution	Udfald med klinisk referencestandard									
	Udfald ved nyfødtundersøgelse [Ingen cytogenetiske resultater]		Cytogenetiske resultater							Andet <sup>a</sup>
	Hunkøn	Hankøn	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYX		
Procentvis konkordans	99,9 % (1371/ 1373)	99,9 % (1420/ 1422)	97,4 % (147/ 151)	100,0 % (118/ 118)	100,0 % (6/6)	80,0 % (4/5)	100,0 % (5/5)	100,0 % (1/1)	Ikke relevant	

<sup>a</sup> 1 prøve blev 49,XXXXY-klassificeret af VeriSeq NIPT Solution som "kunne ikke rapportere kønskromosomer"

## Positiv prædiktiv værdi og negativ prædiktiv værdi af VeriSeq NIPT Solution ang. detektering af trisomi 21, 18 og 13 for en række prævalenser

Testens positive prædiktive værdi (PPV) og negative prædiktive værdi (NPV) giver oplysninger om testens evne til at tjene som grundlag for kliniske beslutninger på baggrund af testens følsomhed og specificitet og sandsynligheden inden testen for, at et foster er afficeret med trisomi (prævalens). Da PPV og NPV afhænger af prævalensen, og prævalensen af disse aneuploidier kan variere mellem forskellige populationer, blev PPV og NPV beregnet på baggrund af den følsomhed og specificitet, der blev observeret i studiet af klinisk præcision vedrørende trisomi 21, 18 og 13. Tabellen nedenfor opsummerer PPV og NPV for en række plausible prævalensværdier.

Tabel 15 Positiv prædiktiv værdi og negativ prædiktiv værdi af VeriSeq NIPT Solution ang. detektering af trisomi 21, 18 og 13 for en række prævalenser

Aneuploidi	Prævalens	PPV	NPV
Trisomi 21	0,05 %	59,48 %	100,00 %
	0,10 %	74,60 %	100,00 %
	0,20 %	85,47 %	100,00 %
	0,50 %	93,65 %	99,99 %
	1,00 %	96,74 %	99,99 %
	1,50 %	97,81 %	99,98 %
	2,00 %	98,36 %	99,98 %
Trisomi 18	0,03 %	21,48 %	100,00 %
	0,05 %	31,32 %	99,99 %
	0,10 %	47,71 %	99,99 %
	0,20 %	64,62 %	99,98 %
	0,30 %	73,28 %	99,97 %
	0,40 %	78,54 %	99,96 %
	0,50 %	82,08 %	99,95 %
Trisomi 13	0,01 %	7,09 %	100,00 %
	0,02 %	13,23 %	100,00 %
	0,05 %	27,61 %	100,00 %
	0,10 %	43,29 %	100,00 %
	0,20 %	60,44 %	100,00 %

NPV = negativ prædiktiv værdi, PPV = positiv prædiktiv værdi

## Ydeevne ved tvillingegegraviditeter

### Klinisk ydeevne

På grund af den lave prævalens var der kun et mindre antal tvillingeprøver til rådighed for det kliniske studie. Der blev testet fire tvillingeprøver med trisomi 21, og alle blev korrekt rapporteret for forekomst af trisomi 21 samt fravær af enhver anden abnormitet. Men da antallet af tvillingeprøver var for lavt, ville konfidensniveauerne for sensitivitet og specificitet være for stort til at være praktisk anvendeligt. Disse prøver blev ikke inkluderet i de samlede beregninger af ydeevne rapporteret i [Tabel 11](#).

### Estimering af ydeevne med trisomi 21, 18 og 13

For at estimere VeriSeq NIPT Solutions ydeevne ved tvillingegegraviditeter mere præcist blev der anvendt *in silico*-modeller baseret på observationer fra kliniske prøver til at simulere populationer af tvillingegegraviditeter i overensstemmelse med den tilsigtede brugspopulation. Fordelingen af føtal fraktion blev fastlagt ud fra ca.

4.500 tvillingeprovér og sammenlignet med fordelingen fra ca. 120.000 enkeltbarnsgraviditeter. Fordelingen af føtal fraktion betinget af aneuploidistatus blev fastlagt ud fra putative tildelinger for enkeltbarnsgraviditeter (1.004 trisomi 21, 312 trisomi 18 og 197 trisomi 13). Kombination af de to tilladte fordelinger for inferens ved detektering af aneuploidi hos tvillinger. Sæt med dizygote og monozygote tvillinger blev simuleret, og der blev udregnet et vægtet gennemsnit, som repræsenterede deres prævalens i den tilsigtede brugspopulation (2 dizygote: 1 monozygot) for at estimere sensitiviteten. Sæt af ikke-berørte tvillinger blev simuleret af hensyn til specificiteten.

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

- For monozygote tvillinger blev den berørte fraktion af hver prøve indstillet til 1,0, fordi trisomien i denne situation berører begge tvillinger.
- For dizygote tvillinger formodedes det, at kun den ene tvilling var berørt (tilfælde, hvor begge dizygote tvillinger er berørte, er ekstremt sjældne). Værdierne for den berørte fraktion blev simuleret ved hjælp af den kendte fordeling af den føtale fraktion fastlagt ud fra kønsafhængige kliniske tvillingeprovér. Der blev anvendt en konservativ tilgang, hvorved det formodedes, at den berørte tvilling altid havde den laveste føtale fraktion af de to tvillinger. Der blev anvendt en korrektionsfaktor for føtale fraktioner, som gennemsnitligt var lavere ved graviditeter med trisomi 13 og 18.
- For ikke-berørte tvillinger blev den berørte fraktion for hver prøve angivet som nul.

For berørte tvillinger med enten trisomi 18 eller 13 blev den berørte føtale fraktion svarende til den berørte fraktion i prøven reduceret proportionalt med den gennemsnitlige reduktion af den føtale fraktion observeret i kliniske data i enkeltbarnsgraviditeter med trisomi 18 eller 13 i forhold til euploide enkeltbarnsgraviditeter.

Såvel den samlede føtale fraktion som den berørte fraktion for hver simuleret prøve blev derefter anvendt til at beregne antallet af tilfælde af aneuploidi ved hjælp af standardalgoritmen for VeriSeq NIPT Solution. Sensitiviteten blev beregnet ved at fastlægge, hvor ofte antallet af tilfælde af aneuploidi blandt de simulerede berørte tvillinger var over den tilsvarende grænseværdi for aneuploidi. Tilsvarende blev specificiteten beregnet ved at fastlægge, hvor ofte antallet af tilfælde af aneuploidi blandt de simulerede ikke-berørte tvillinger var under den tilsvarende grænseværdi for aneuploidi (Tabel 16). 95 % konfidensintervaller blev estimeret ud fra antallet af ægte kliniske tvillingeprovér i det oprindelige datasæt, der blev klassificeret som enten berørte eller ikke-berørte af den relevante trisomi.

Tabel 16 Estimerer for trisomi 21, 18 og 13 i simuleret population af tvillingegraviditeter

	Trisomi 21	Trisomi 18	Trisomi 13
Følsomhed	97,1 %	95,8 %	95,1 %
2-sidet 95 % CI*	(87,9 %, 99,2 %)	(66,7 %, 99,5 %)	(67,7 %, 99,3 %)
Specificitet	99,9 %	> 99,9 %	> 99,9 %
2-sidet 95 % CI	(99,7 %, 99,9 %)	(99,9 %, > 99,9 %)	(99,9 %, 99,9 %)

\*CI er udregnet ved Wilsons metode

For Tabel 16 blev punktestimerer og estimerede 95 % konfidensintervaller for sensitiviteten og specificiteten af VeriSeq NIPT Solution for at registrere trisomi 21, 18 og 13 fastlagt ud fra en simuleret population af tvillingegraviditeter i overensstemmelse med den tilsigtede brugspopulation. Konfidensintervallerne blev estimeret ud fra antallet af QC-bestående kliniske tvillingeprovér klassificeret som enten berørte eller ikke-berørte af den relevante trisomi. Ved beregningen af sensitivitet formodes det, at to tredjedele af de berørte tvillingegraviditeter er dizygote med en tvilling berørt, mens en tredjedel af de berørte tvillingegraviditeter er monozygote med begge tvillinger berørte.

Estimererne angivet i Tabel 16 vedrører udelukkende tvillingegraviditeter. På grund af den endnu lavere prævalens var dataene for graviditeter med flere fostre (trillinger eller derover) utilstrækkelige til at etablere relevante statistiske modeller, hvorfor præcisionen af detektionen af aneuploidi ikke kunne estimeres.

## Analytisk ydeevne

### Præcision

Der er udført to studier til vurdering af præcisionen af VeriSeq NIPT Solution:

- ▶ Et internt reproducerbarhedsstudie udført på flere centre, som omfattede 9 kørsler på 3 centre ved brug af 3 operatører og et enkelt reagensparti.
- ▶ Et intralaboratorielt præcisionsstudie udført på et enkelt laboratorium, der omfattede 12 kørsler ved brug af to operatører, 2 instrumentsystemer og 3 reagenspartier.

Der blev oprettet en trisomi 21-pulje med en føtal fraktion på 5 % ved at kombinere cfDNA ekstraheret fra maternelt plasma fra gravide kvinder (med et trisomi 21-inficeret foster) og cfDNA ekstraheret fra plasma fra kvinder, der ikke var gravide. Der blev også testet puljet cfDNA ekstraheret fra maternel plasma fra graviditeter med ikke-inficerede drenge (XY-fostre) og ikke-inficerede piger (XX-fostre). Testningen blev udført over 10 dage i form af 21 kørsler i alt i begge studier tilsammen.

Ud af de 903 prøver, der blev inkluderet i analyserne i de 2 studier, var der 100 % overensstemmelse i 84/84 prøver vedrørende trisomi 21, 399/399 prøver vedrørende XX-kønsklassificering og 420/420 prøver vedrørende XY-kønsklassificering. Fordelingen af prøver pr. center var som følger: Center 1 - T21 (12), XX (57), XY(60); Center 2 - T21 (12), XX (57), XY(60); Center 3 - T21 (60), XX (285), XY(300).

Tabel 17 Reproducerbarhed og intralaboratoriel præcision (samlede data)

Forventet	Prøvet	Observeret rapportering				
		T21	T18	T13	XX	XY
T21 (XY)	84	84	0	0	0	84
XX	399	0	0	0	399	0
XY	420	0	0	0	0	420

### Krydskontaminering

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

### Potentielt interfererende stoffer

For at vurdere indvirkningen af interfererende stoffer på VeriSeq NIPT solution blev analysens ydeevne evalueret ved tilstedeværelse af potentielt interfererende stoffer.

Der blev tilført albumin, bilirubin, hæmoglobin og triglycerider (endogene) til maternelle plasmapuljer fra graviditeter med ikke-afficerede hunkøn (XX-fostre), som blev testet ved 2 koncentrationer af hvert teststof (n=16 for hver). Der blev ikke observeret nogen interferens på analysens ydeevne.

Tabel 18 Potentielt interfererende stoffer (endogene)

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



Naturligt forekommende maternelt genomisk DNA (gDNA) i plasma kan potentielt også interferere med analysens ydeevne, da det kan blive ekstraheret sammen med det føtale cfDNA. Niveauer af genomisk DNA på 1,6, 3,3, og 4,9 ng pr. prøve (svarende til 1, 2 og 3 standardafvigelse over den gennemsnitlige forventede gDNA-koncentration efter 7 dages opbevaring af helblod<sup>13</sup>) blev føjet til cfDNA ekstraheret fra maternel plasma fra graviditeter med ikke-afficerede hunkøn (XX-fostre). Prøverne blev så testet i VeriSeq NIPT Solution (n=16 for hver koncentration). Der blev ikke observeret nogen interferens på analysens ydeevne ved forekomst af forhøjede niveauer af gDNA.

Tyve lægemiddelbaserede og potentielt interfererende stoffer (eksogene), som ofte bliver anvendt eller ordineret under graviditeten, blev testet pr. EP7-A2 (Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline-Second Edition). De 20 potentielt interfererende stoffer blev kombineret i 4 puljer, overført til maternel plasma fra graviditeter med ikke-afficerede hunkøn (XX-fostre) og testet i VeriSeq NIPT Solution (N=16 for hver pulje). Der blev ikke observeret nogen interferens på analysens ydeevne ved forekomst af disse eksogene stoffer.

Tabel 19 Potentielt interfererende stoffer (eksogene)

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

## Fejlfinding

### Fejlfinding på VeriSeq NIPT Solution

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

Fejltilstand	Muligt resultat	Fortolkning	Anbefalet handling	Kommentarer
Prøvetilstopning/ langsomt flow	Plasmakontaminering	Individuelle prøver kan tilstoppe bindingspladen, hvis der er signifikant kontaminering i plasmaprøven	Kontrollér prøven. Hvis resterende plasma i røret er rødt eller mælkeagtigt, skal prøven annulleres, og der skal anmodes om en ny udtrækning. Test igen, hvis prøven ser normal ud.	
	Prøveoverløb	Utilstrækkelig visuel inspektion af hvert rørs velegnethed til prøven.	Ugyldiggør prøver i nærliggende brønde, der er berørt af overløbet.	Kan være tegn på ukorrekt transport eller opbevaring af prøven inden behandlingen. Du bør ikke inkludere uegnede prøver i behandlingen.
	Hardwarefejl	Utilstrækkelig optagelse af materiale i forbindelse med ekstraktion	Test prøven igen. Kontakt Illuminas tekniske support, hvis problemet i brøndplaceringen fortsætter med andre prøver.	
Mislykket QC af individuel prøveanalyse	Mislykket QC af sekventering	Utilstrækkeligt genetisk input ELLER forkert overførsel i forbindelse med prøvehåndtering	Se prøvekommentarer. Se, om der har været lignende resultater i forbindelse med tidligere prøver i den pågældende pladeposition. Test prøven igen.	Er enten tegn på dårligt prøveinput eller forkert overførsel på ML STAR. Utilstrækkeligt genetisk materiale kan skyldes utilstrækkeligt cellefrit DNA i plasma eller cellebaseret DNA, hvilket resulterer i overfortynding af sekventeringsprøven.
	Lav FF eller NES-tælling	Der er ikke genereret tilstrækkelige data til at lave en præcis rapportering	Test igen fra plasma.	
Mislykket QC af kvantificering	Mislykket kvantificeringskørsel – Batchmedian under minimum	Utilstrækkeligt procesudbytte	Gentag kvantificering. Kontakt Illuminas tekniske support, hvis den gentagne kvantificering også mislykkes.	Vellykkede standardkurvemålinger tyder på problemer med biblioteksklargøringen.
	Mislykket kvantificeringskørsel	Standardkurvefejl på grund af dårlig kvantificering	Gentag kvantificering. Kontakt Illuminas tekniske support, hvis den gentagne kvantificering også mislykkes.	

Fejltilstand	Muligt resultat	Fortolkning	Anbefalet handling	Kommentarer
Mislykket puljeoprettelse	Puljeoprettelsen kunne ikke gennemføres	Puljeoprettelsesanalysen kan ikke beregne korrekte puljevoluminer	Revurder puljens målkonzentration, og kørs puljeanalysen igen.	

## Fejlfinding på VeriSeq NIPT Microlab STAR

Procestrin	Fejlkode	Fejlbesked	Beskrivelse	Brugerløsning
Batchoprettelse	EM0044	The Batch ID entered contains forbidden characters. (Det indtastede batch-ID indeholder forbudte tegn).	VeriSeq NIP Solution tillader kun tal, bogstaver, understregningstegn og bindestreger i alle datafelter.	Omdøb batchen til et navn, der ikke indeholder nogen specialtegn.
Batchoprettelse	EM0051	The Batch ID is greater than 26 characters in length. (Batch-ID'et indeholder mere end 26 tegn).	VeriSeq NIPT Solution begrænser længden af batchnavne til 26 tegn eller derunder.	Omdøb batchen til et navn, der indeholder færre end 26 tegn.
Batchoprettelse	EM0076	Unable to connect to VeriSeq Onsite Server (Der kunne ikke oprettes forbindelse til VeriSeq Onsite Server)	VeriSeq Onsite Server responderer ikke på dataanmodninger fra Workflow Manager.	Kontrollér, at: 1. ML STAR er forbundet til netværket. 2. VeriSeq Onsite Server er tændt. 3. ML STAR kan forbinde til VeriSeq Onsite Server (via ping-anmodning). 4. Send en e-mail til Illuminas tekniske support, hvis ovennævnte trin ikke løser problemet.
Batchoprettelse	EM0118	This batch has been failed and cannot be further processed. (Batchen er blevet ugyldiggjort og kan ikke viderebehandles).	Den angivne batch er allerede blevet ugyldiggjort og kan ikke viderebehandles.	Batchregistret på VeriSeq Onsite Server viser, at den valgte batch er blevet ugyldiggjort. Viderebehandling er ikke tilladt. Opret en anden batch med de ønskede prøver.
Batchoprettelse	I/T	This batch has already completed processing. Would you like to repool? (Denne batch er allerede færdigbehandlet. Vil du oprette en ny pool?)	Den angivne batch er blevet bearbejdet på puljeoprettelsestrinnet. Den eneste tilladte behandling er oprettelse af en ny pulje.	Klik på Re-Pool for at oprette en ny pulje. ELLER Afbryd metoden, og dobbelttjek batchnavnet.
Plasmaisolering	WP0087	Duplicate sample barcodes loaded. (Der er overført prøver med allerede anvendte stregkoder.)	Der er overført prøver med identiske stregkoder til systemet.	1. Følg beskederne i Workflow Manager for at identificere hvilke prøver, der har stregkoder, der allerede er blevet anvendt. 2. Fjern disse prøver, og giv dem nye stregkoder eller erstat dem. 3. Overfør prøverne påny.

Procestrin	Fejlkode	Fejlbesked	Beskrivelse	Brugerløsning
Plasmaisolering	EP0102	Samples specified in the Sample Sheet were not loaded. (Manglende overførsel af prøver på prøvearket).	Der er prøver på prøvearket, som ikke er inkluderet i de overførte stregkoder.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Følg beskederne i Workflow Manager for at identificere de manglende prøver.</li> <li>2. Tilføj de manglende prøver til batchen, og overfør prøverne igen</li> </ol> <b>ELLER</b> Afbryd metoden, rediger prøvearket efter behov, genstart metoden.
Pladeoverførsel	I/T	Venus Barcode Mask Error (Venus-stregkodemaskefejl)	Workflow Manager gennemtvinger korrekt plade-til-batch-associering ved brug af Venus-stregkodemasker.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Kontrollér pladens placering for at sikre, at plade-layoutet er korrekt.</li> <li>2. Kontrollér, at den overførte plade er den korrekte plade til den angivne batch.</li> </ol>
cfDNA-ekstraktion	WE0150	Pressure in the vacuum chamber is too low. (Trykket i vakuumkammeret er for lavt.)	Workflow Manager fortsætter ikke, hvis det hvilende tryk i vakuumledningen er < 400 torr.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Kontrollér vakuumledningen for bøjninger eller anden blokering.</li> <li>2. Åbn affaldsledningens frigøringsclips, så trykket frigøres, luk frigøringsclipsen helt til.</li> <li>3. Kontrollér, at vakuumkontrolenheden og pumpen er tændt.</li> <li>4. Kontakt Illuminas tekniske support, hvis problemet fortsætter.</li> </ol>
	WE0153	Pressure in the vacuum chamber is too high. (Trykket i vakuumkammeret er for højt)	Hvis det målte vakuumtryk er for højt, inden trykkontrollen starter, kan systemet være fejlbehæftet.	Kontrollér, at alle vakuumforbindelser og ledninger er på plads på bagsiden af kontrolenheden.
	WE0996	Vacuum failed to seal. (Vakuumforsegling mislykkedes).	Systemet skaber ikke vakuumforsegling på bindingspladen.	<b>BEMÆRK!</b> Vælg ikke OK, før forseglingsfejlen er helt rettet. <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Kontrollér, at bindingspladen er ret mod vakuum-fordelingsstykket. Tryk kraftigt ned på bindingspladen med en handskeklædt hånd.</li> <li>2. Klik på OK for at fortsætte med cfDNA-ekstraktion.</li> <li>3. Send en e-mail til Illuminas tekniske support, hvis denne fejlbesked bliver vist mere end tre gange i løbet af en kørsel.</li> </ol>

Procestrin	Fejlkode	Fejlbesked	Beskrivelse	Brugerløsning
	WM0219	If Vacuum is on, manually rest the pump. (Deaktiver pumpen manuelt, hvis vakuum er tændt).	Vakuummet kan fortsætte med at være tændt efter en metodeafbrydelse i løbet af ekstraktionen.	<ol style="list-style-type: none"> <li>Tryk på tænd-/slukknappen på vakuum-kontrolheden for at slukke vakuummet.</li> <li>Vent 10 sekunder, og tryk så på tænd-/slukknappen igen for at tænde for vakuummet.</li> </ol>
	EE0477	An error has occurred while moving a plate. (iSWAP error) (Der opstod en fejl i forbindelse med flytning af en plade (iSWAP-fejl))	Hvis der opstår en iSWAP-fejl (tab af plade, manglende opsamling osv.) giver systemet brugeren besked om, at færdiggøre flytningen af pladen manuelt.	<p>Kontrollér, at pladen kan anvendes igen (intet materialespild).</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– I modsat fald skal du afbryde kørslen.</li> <li>– I så fald skal du følge de anviste vejledninger for at færdiggøre overførslen af pladen.</li> </ul>
	EE0519	Scanned barcode does not match binding plate barcode on record. (Den scannede stregkode stemmer ikke overens med bindingspladens stregkode i registret.)	Den overførte bindingsplade stemmer ikke overens med stregkoden på den fjernede plade.	Kontrollér, at den plade, der overføres, stemmer overens med den registrerede stregkode (se den forventede stregkode i sporingslogfilen).
API	EA0372	Unable to connect to the data server. (Der kunne ikke oprettes forbindelse til dataserveren.)	VeriSeq Onsite Server responderer ikke på dataanmodninger fra Workflow Manager.	<p>Kontrollér, at:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>ML STAR er forbundet til netværket.</li> <li>ML STAR kan forbinde til VeriSeq Onsite Server (via ping-anmodning).</li> <li>VeriSeq Onsite Server er tændt.</li> </ol>
	EA0774	Connection Error The API server connection failed to validate. (Forbindelsesfejl. Forbindelsen til API-serveren kunne ikke bekræftes.)	VeriSeq Onsite Server er stoppet med at respondere på dataanmodninger fra Workflow Manager.	<p>Kontrollér, at:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>ML STAR er forbundet til netværket.</li> <li>ML STAR kan forbinde til VeriSeq Onsite Server (via ping-anmodning).</li> <li>VeriSeq Onsite Server er tændt.</li> </ol>
	EA0780	403: Invalid Request The current transaction is not valid. (403: Ugyldig anmodning Den aktuelle transaktion er ikke gyldig.)	De sendte data overholder ikke systemets arbejdsproceslogik.	Du finder yderligere information i fejloplysningerne. Årsagen er ofte, at inputtet er for langt eller ikke overholder de gyldige tegn.

## Referencer

- 1 Nagaoka S, Hassold T, Hunt P. Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nat Rev Genet.* 2012;13(7):493-504. doi:10.1038/nrg3245.
- 2 Garnder RJ, Sutherland GR, Schaffer LG. *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling.* 4th edition. New York (NY): Oxford University Press; 2012.
- 3 Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, Ogilvie C, D'Antonio F. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015 Jan;45(1):16-26. doi: 10.1002/uog.14636.
- 4 ACOG Practice Bulletin #163.
- 5 Gil M M, Quezada M S, Revello R, Akolekar R, and Nicolaidis K H (2015), Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 45: 249–266. doi:10.1002/uog.14791
- 6 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.
- 7 2. ACOG Committee on Genetics. "Committee Opinion No. 640: Cell-Free DNA Screening For Fetal Aneuploidy." *Obstet Gynecol* 126 (2015): e31-7.
- 8 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.
- 9 McCullough RM, Almasri EA, Guan X, et al. Non-invasive prenatal chromosomal aneuploidy testing – clinical experience: 100 000 clinical samples. *PLoS One.* 2014; 9(10):e109173.
- 10 Norton ME, Brar H, Weiss J, et al. Non-Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18. *J Obstet Gynecol.* 2012;207:137.e1-8.
- 11 Norton ME, Jacobsson B, Swamy GK, et al. Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy. *New Engl J Med.* 2015; 372(17):1589-97.
- 12 Ryan A, Hunkapiller N, Banjevic M, et al. Validation of an enhanced version of a single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal test for detection of fetal aneuploidies. *Fetal Diagn Ther.* 2016;doi:10.1159/000442931.
- 13 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.

## Patenter og varemærker

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

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

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

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

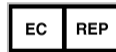
© 2021 Illumina, Inc. Alle rettigheder forbeholdes.

Alle varemærker tilhører Illumina, Inc. eller de respektive ejere. Specifikke varemærkeoplysninger er tilgængelige på [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Kontaktoplysninger



Illumina  
5200 Illumina Way  
San Diego, California 92122 U.S.A.  
+1.800.809.ILMN (4566)  
+1.858.202.4566 (uden for Nordamerika)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com



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



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

## Produktmærkning

Se forklaringer på de symboler, der fremgår af produktemballagen og -mærkningen, i symbolnøglen på [support.illumina.com](http://support.illumina.com) under fanen *Documentation and Literature* (Dokumentation og litteratur) for dit sæt.