

Insero della confezione di VeriSeq NIPT Solution

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

Uso previsto

VeriSeq NIPT Solution è un test diagnostico *in vitro* il cui uso è previsto come test di screening basato sul sequenziamento per il rilevamento di aneuploidie fetali da campioni di sangue intero periferico materno in donne in gravidanza ad almeno dieci settimane di gestazione. VeriSeq NIPT fornisce informazioni relative allo stato di aneuploidia per i cromosomi: 21, 18, 13, X e Y. Questo prodotto non deve essere utilizzato come unica base per la diagnosi o altre decisioni nella gestione della gravidanza.

VeriSeq NIPT Solution comprende: VeriSeq NIPT Workflow Manager per VeriSeq NIPT Microlab STAR, VeriSeq NIPT Sample Prep Kit e VeriSeq Onsite Server con VeriSeq NIPT Assay Software.

Riepilogo e spiegazione del saggio

Le anomalie cromosomiche fetali, nello specifico l'aneuploidia ossia un numero anomalo di cromosomi, sono una causa comune di insuccesso riproduttivo, anomalie congenite, ritardi nello sviluppo e disabilità intellettive. L'aneuploidia incide su circa 1 su 300 nati vivi, con percentuali molto superiori associate con aborto spontaneo e morte alla nascita.^{1,2} Fino a poco tempo fa, erano presenti due tipi di test prenatali per questi disordini: test diagnostici o screening di marker multipli. I test diagnostici prevedono procedure invasive quali amniocentesi o villocentesi. Questi metodi di analisi sono considerati i più accurati per il rilevamento dell'aneuploidia. Tuttavia, sono associati a un rischio di perdita di gravidanza tra 0,11% e 0,22%.³ I tradizionali screening con marker multipli non presentano alcun rischio di perdita di gravidanza in quanto non sono invasivi, ma sono meno accurati rispetto ai test diagnostici. Le percentuali di rilevamento per la trisomia 21 variano tra il 69% e il 96% in base al determinato screening, all'età della madre e all'età gestazionale al momento del test.⁴ Soprattutto, presentano percentuali di falsi positivi di circa il 5%, che possono portare a test diagnostici invasivi di conferma e quindi al rischio di perdita di gravidanza legata alla procedura.⁴

L'aneuploidia fetale per i cromosomi 21, 18, 13, X e Y può essere rilevata con un livello di accuratezza superiore mediante test prenatali non invasivi (Noninvasive Prenatal Testing, NIPT), utilizzando il sequenziamento dell'intero genoma di DNA libero fetale (Cell-Free DNA, cfDNA) ottenuto da plasma materno a dieci settimane o più di gestazione. Una recente meta-analisi di più studi clinici ha riportato percentuali e specificità di rilevamento raggruppato pesato per trisomia 21 e trisomia 18 in gravidanze singole nel modo seguente: trisomia 21 99,2% e 99,91% e trisomia 18 96,3% e 99,87%, rispettivamente.⁵

Data la riduzione significativa nelle percentuali di falsi positivi con NIPT rispetto allo screening convenzionale con multipli marker, diverse organizzazioni mediche professionali hanno rilasciato dichiarazioni a supporto di diverse indicazioni per l'utilizzo di NIPT.

Nello specifico, l'International Society for Prenatal Diagnosis, l'American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG)/Society for Maternal Fetal Medicine (SMFM), l'American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) e la European Society of Human Genetics/American Society of Human Genetics supportano lo screening NIPT per tutte le donne in gravidanza.⁶ Sono raccomandati consulenza pre-test, consenso informato e test diagnostici per confermare un risultato di screening positivo di cfDNA.⁷

Uno studio suggerisce che l'utilizzo di NIPT come screening primario su tutte le gravidanze potrebbe comportare una riduzione dell'89% nel numero delle procedure invasive di conferma.⁸

VeriSeq NIPT Solution attualmente rappresenta un test diagnostico in vitro (In-Vitro Diagnostic, IVD) non invasivo che utilizza il sequenziamento dell'intero genoma di frammenti di cfDNA derivato da campioni di sangue intero periferico materno ottenuto da donne in gravidanza ad almeno dieci settimane di gestazione per rilevare le aneuploidie cromosomiche fetali 21, 18, 13, X e Y.

Principi della procedura

VeriSeq NIPT Solution è una soluzione automatizzata per i test di laboratorio NIPT che consiste nella preparazione dei campioni automatizzata e nell'analisi dei dati di sequenziamento. VeriSeq NIPT Sample Prep Kit contiene reagenti specializzati da utilizzare assieme a VeriSeq NIPT Microlab STAR per preparare batch da 48 o 96 campioni per il sequenziamento di nuova generazione. I dati di sequenziamento paired-end dell'intero genoma vengono analizzati da un software specializzato, VeriSeq NIPT Assay Software, e viene generato un report.

Il flusso di lavoro è costituito dalle procedure seguenti: raccolta del campione, isolamento del plasma, estrazione di cfDNA, preparazione delle librerie, quantificazione delle librerie, raggruppamento delle librerie, sequenziamento e analisi. Le procedure sono qui di seguito spiegate dettagliatamente:

- ▶ **Raccolta dei campioni:** 7–10 ml di sangue intero periferico materno vengono raccolti in provette di raccolta Streck per sangue libero materno, che impediscono la lisi cellulare e la contaminazione genomica, stabilizzando il sangue intero a temperatura ambiente.
- ▶ **Isolamento del plasma:** entro cinque giorni dalla raccolta, o entro dieci giorni dalla raccolta se conservato a 4 °C, il plasma viene isolato da sangue intero periferico materno utilizzando le tecniche di centrifugazione standard. VeriSeq NIPT Microlab STAR aspira ed eroga il plasma nella piastra a 96 pozzetti profondi per la successiva elaborazione.
- ▶ **Estrazione di cfDNA:** la purificazione di cfDNA da plasma si ottiene mediante assorbimento su una piastra di legame, lavando la piastra di legame per rimuovere i contaminanti ed eluendola.
- ▶ **Preparazione delle librerie:** i frammenti di cfDNA purificato vengono sottoposti a riparazione delle estremità per convertire le estremità sporgenti al 5' e 3' in estremità piatte. Quindi, un nucleotide deossiadenosina viene aggiunto alle estremità 3' per creare una singola sporgenza della base. Gli adattatori indicizzati che contengono una singola sporgenza della base di deossiadenosina all'estremità 3' vengono quindi ligati su altri frammenti di cfDNA elaborati. Il DNA ligato viene quindi purificato mediante microsfere di immobilizzazione in fase solida inversa. Ciascun campione in un set di 48 o 96 campioni riceve un adattatore indicizzato univoco. Gli adattatori hanno due funzioni:
 - ▶ Gli indici permettono l'identificazione del campione durante un successivo sequenziamento.
 - ▶ Gli adattatori indici contengono sequenze che consentono di catturare la libreria sulla superficie solida di una cella a flusso di sequenziamento per la generazione di cluster e il successivo sequenziamento.
- ▶ **Quantificazione:** il prodotto della libreria viene quantificato utilizzando un colorante fluorescente con la concentrazione determinata dal confronto di una curva standard di DNA.
- ▶ **Raggruppamento della libreria e sequenziamento:** le librerie composte da batch di 48 campioni vengono raggruppate assieme in quantità regolate per ridurre al minimo la variazione nella copertura. I raggruppamenti composti da batch di 48 campioni vengono quindi sequenziati utilizzando un sequenziatore di nuova generazione con le seguenti specifiche: in grado di ottenere letture paired-end da 2 x 36, compatibile con gli adattatori contenuti in VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, chimica basata su due coloranti e creazione automatica di file .BCL (i dati non elaborati ottenuti dallo strumento di sequenziamento). VeriSeq NIPT Solution non include le apparecchiature e i materiali di consumo per il sequenziamento.
- ▶ **Analisi:** le identificazioni delle basi con nucleotidi sono eseguite direttamente dalle misurazioni dell'intensità del segnale durante il sequenziamento. L'analisi secondaria è costituita da:
 - ▶ Demultiplex delle letture utilizzando le sequenze d'indice
 - ▶ Mappatura delle sequenze su un genoma umano di riferimento
 - ▶ Calcolo del numero di letture univoche entro ciascun raggruppamento genomico di 100 kb
 - ▶ Normalizzazione della copertura su un livello sottocromosomico
- ▶ Le informazioni relative alle letture paired-end vengono utilizzate per valutare la copertura (il numero di letture univoche allineate a un riferimento per campione) e la lunghezza dei singoli frammenti entro il campione. La frazione fetale entro ciascun campione viene stimata in base al profilo della copertura, alla distribuzione della dimensione e al numero di copie sul cromosoma X. Infine, questi input statistici vengono utilizzati per

determinare la sovrarappresentazione o la sottorappresentazione dei cromosomi 21, 18, 13, X e Y. I risultati vengono riepilogati in un report nel quale "Aneuploidy detected" (Aneuploidia rilevata) o "No aneuploidy detected" (Nessuna aneuploidia rilevata) viene elencato per ciascun cromosoma target per i campioni che superano le metriche di controllo qualità. Nel report viene inclusa una stima della frazione fetale per ciascun campione.

Limiti della procedura

- ▶ VeriSeq NIPT Solution è un test di screening e non dovrebbe essere preso in considerazione indipendentemente da altri esiti clinici e risultati di test. La gestione delle decisioni inclusa la terminazione della gravidanza non dovrebbe essere basata solo sui risultati ottenuti dallo screening NIPT.⁷
- ▶ Il saggio richiede campioni di sangue intero periferico materno da donne in gravidanza ad almeno dieci settimane di gestazione.
- ▶ I risultati del test possono essere confusi da determinati fattori materni e fetali inclusi, ma non limitati a, quanto segue:
 - ▶ Recente trasfusione di sangue materno
 - ▶ Trapianto di organo materno
 - ▶ Procedura chirurgica materna
 - ▶ Immunoterapia o terapia con cellule staminali materna
 - ▶ Tumore maligno materno
 - ▶ Mosaicismo materno
 - ▶ Mosaicismo confinato alla placenta
 - ▶ Morte fetale
 - ▶ Gemello scomparso
 - ▶ Trisomia parziale o monosomia parziale fetale
 - ▶ Mosaicismo fetale
- ▶ Le prove a supporto della sensibilità e della specificità per i test sono per le gravidanze singole e gemellari. Queste istruzioni per l'uso non forniscono dati di sensibilità o specificità per le gravidanze trigemini o superiori.
- ▶ VeriSeq NIPT Solution riporta uno dei seguenti stati:
 - ▶ Sovrarappresentazione del cromosoma 21, 18 e 13
 - ▶ Le seguenti aneuploidie cromosomiche sessuali: XO, XXX, XXY e XYY
- ▶ VeriSeq NIPT Solution non è concepito per rilevare poliploidie, come la triploidia.
- ▶ Il test VeriSeq NIPT Solution individua determinate anomalie cromosomiche. I risultati riportati come No Aneuploidy Detected (Nessuna aneuploidia rilevata) non eliminano la possibile presenza di anomalie cromosomiche dei cromosomi testati. Inoltre, un risultato negativo non elimina la possibilità di una gravidanza che presenti altre anomalie cromosomiche, condizioni genetiche o difetti alla nascita (ad es, difetto di apertura del tubo neurale).

Componenti del prodotto

VeriSeq NIPT Solution è composto da:

- ▶ VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (48 campioni) (n. codice 15066801)
- ▶ VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (96 campioni) (n. codice 15066802)
- ▶ VeriSeq Onsite Server (n. codice 15076164)
 - ▶ VeriSeq NIPT Assay Software, preinstallato su VeriSeq Onsite Server
- ▶ VeriSeq NIPT Microlab STAR (n. codice Hamilton Company Reno: 95475-01 (115 V) e 95475-02 (230 V), Hamilton Company Bonaduz: 806288)
 - ▶ VeriSeq NIPT Workflow Manager, preinstallato su VeriSeq NIPT Microlab STAR

Reagenti

Reagenti forniti

Illumina fornisce i seguenti reagenti: VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (48 campioni) (n. codice 15066801) VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (96 campioni) (n. codice 15066802). VeriSeq NIPT Sample Prep Kit è configurato per l'utilizzo con ML STAR, fornito da Hamilton Company (n. codice 806288).

VeriSeq NIPT Sample Prep, scatola di estrazione

Tabella 1 VeriSeq NIPT Extraction Box (48), n. codice 15066803

Nome del reagente sull'etichetta	Numero di contenitori nel kit	Volume sull'etichetta	Ingredienti attivi	Conservazione
Lysis Buffer (Tampone di lisi)	1	100 ml	Cloruro di guanidinio in soluzione acquosa tamponata	tra 15 °C e 30 °C
Wash Buffer I (Tampone di lavaggio I)	1	125 ml	Cloruro di guanidinio e 2-propanolo in soluzione acquosa tamponata	tra 15 °C e 30 °C
Wash Buffer II (Tampone di lavaggio II)	1	25 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali	tra 15 °C e 30 °C
Elution Buffer (Tampone di eluizione)	1	30 ml	Soluzione acquosa tamponata	tra 15 °C e 30 °C
Proteinase Buffer (Tampone proteasi)	1	35 ml	Glicerolo in soluzione acquosa tamponata	tra 15 °C e 30 °C
Proteinase K (Proteasi K)	3	75 mg	Proteasi K liofilizzata	tra 15 °C e 30 °C

Tabella 2 VeriSeq NIPT Extraction Box (96), n. codice 15066807

Nome del reagente sull'etichetta	Numero di contenitori nel kit	Volume sull'etichetta	Ingredienti attivi	Conservazione
Lysis Buffer (Tampone di lisi)	1	100 ml	Cloruro di guanidinio in soluzione acquosa tamponata	tra 15 °C e 30 °C
Wash Buffer I (Tampone di lavaggio I)	1	125 ml	Cloruro di guanidinio e 2-propanolo in soluzione acquosa tamponata	tra 15 °C e 30 °C
Wash Buffer II (Tampone di lavaggio II)	2	25 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali	tra 15 °C e 30 °C
Elution Buffer (Tampone di eluizione)	1	30 ml	Soluzione acquosa tamponata	tra 15 °C e 30 °C
Proteinase Buffer (Tampone proteasi)	1	35 ml	Glicerolo in soluzione acquosa tamponata	tra 15 °C e 30 °C
Proteinase K (Proteasi K)	4	75 mg	Proteasi K liofilizzata	tra 15 °C e 30 °C

VeriSeq NIPT Sample Prep, scatola di preparazione delle librerie

Tabella 3 VeriSeq NIPT Library Prep Box (48), n. codice 15066809

Nome del reagente sull'etichetta	Numero di contenitori nel kit	Volume sull'etichetta	Ingredienti attivi	Conservazione
End Repair Mix (Miscela riparazione finale)	1	2,72 ml	DNA polimerasi e dNTP in soluzione acquosa tamponata	tra -25 °C e -15 °C
A-Tailing Mix (Miscela A-tailing)	1	910 µl	DNA polimerasi e dATP in soluzione acquosa tamponata	tra -25 °C e -15 °C
Ligation Mix (Miscela di ligazione)	1	233 µl	DNA ligasi in soluzione acquosa tamponata	tra -25 °C e -15 °C
Hybridization Buffer (Tampone di ibridazione)	1	12 ml	Soluzione acquosa tamponata	tra -25 °C e -15 °C
VeriSeq NIPT DNA Adapter Plate (Piastra adattatore DNA VeriSeq NIPT)	1	N/A	Oligonucleotidi in soluzione acquosa tamponata	tra -25 °C e -15 °C

Tabella 4 VeriSeq NIPT Library Prep Box (96), n. codice 15066810

Nome del reagente sull'etichetta	Numero di contenitori nel kit	Volume sull'etichetta	Ingredienti attivi	Conservazione
End Repair Mix (Miscela riparazione finale)	1	2,72 ml	DNA polimerasi e dNTP in soluzione acquosa tamponata	tra -25 °C e -15 °C
A-Tailing Mix (Miscela A-tailing)	2	910 µl	DNA polimerasi e dATP in soluzione acquosa tamponata	tra -25 °C e -15 °C
Ligation Mix (Miscela di ligazione)	2	233 µl	DNA ligasi in soluzione acquosa tamponata	tra -25 °C e -15 °C
Hybridization Buffer (Tampone di ibridazione)	1	12 ml	Soluzione acquosa tamponata	tra -25 °C e -15 °C
VeriSeq NIPT DNA Adapter Plate (Piastra adattatore DNA VeriSeq NIPT)	1	N/A	Oligonucleotidi in soluzione acquosa tamponata	tra -25 °C e -15 °C

VeriSeq NIPT Sample Prep, scatola accessori

Tabella 5 VeriSeq NIPT Accessory Box, n. codice 15066811

Nome del reagente sull'etichetta	Numero di contenitori nel kit	Volume sull'etichetta	Ingredienti attivi	Conservazione
Piastra DNA Binding (Legame del DNA)	1	N/D	Micropiastra in polistirolo con membrana in silicone modificato	tra 2 °C e 8 °C
Resuspension Buffer (Tampone risospensione)	1	35 ml	Soluzione acquosa tamponata	tra 2 °C e 8 °C
Sample Purification Beads (Microsfere purificazione campione)	1	10 ml	Microsfere paramagnetiche in fase solida in soluzione acquosa tamponata	tra 2 °C e 8 °C

Nome del reagente sull'etichetta	Numero di contenitori nel kit	Volume sull'etichetta	Ingredienti attivi	Conservazione
DNA Quantification Reagent (Reagente di quantificazione del DNA)	1	294 µl	Colorante intercalante in DMSO	tra 2 °C e 8 °C
DNA Quantification Standard (Standard di quantificazione del DNA)	1	110 µl	Standard dsDNA, DNA non specifico e sodio azide in soluzione acquosa tamponata	tra 2 °C e 8 °C

VeriSeq NIPT Sample Prep, provette ed etichette per il flusso di lavoro

Tabella 6 Workflow Tubes and Labels, n. codice 15071543

Nome dell'item sull'etichetta	Numero degli item nel kit	Conservazione
Label (LBL)–Plate Barcode (Etichetta - codice a barre piastra)	9	tra 15 °C e 30 °C
Label (LBL)–Deep-well Plate Barcode (Etichetta - codice a barre piastra con pozzetti profondi)	12	tra 15 °C e 30 °C
Tube (TB)–Empty Pooling Tube (Provetta - provetta di raggruppamento in pool vuota)	5	tra 15 °C e 30 °C

Reagenti non forniti

Reagenti richiesti, non forniti

- ▶ Acqua priva di DNasi/RNasi
- ▶ Etanolo, 100% (200 proof) per biologia molecolare
- ▶ Reagenti e materiali di consumo per il sequenziamento richiesti per il sistema di sequenziamento di nuova generazione (Next-Generation Sequencing, NGS)

Reagenti facoltativi, non forniti

- ▶ Soluzione salina tamponata con fosfato Dulbecco (Dulbecco Phosphate-Buffered Saline, DPBS) per controllo non templato (No Template Control, NTC)

Conservazione e manipolazione

- 1 Per temperatura ambiente si intende la temperatura compresa tra 15 °C e 30 °C.
- 2 Tutti i reagenti devono essere utilizzati solo una volta. Tutti i reagenti preparati per l'uso dovrebbero essere utilizzati immediatamente.
- 3 Se la confezione o i contenuti di VeriSeq NIPT Solution sono danneggiati o compromessi, contattare l'Assistenza clienti Illumina.
- 4 I reagenti sono stabili se conservati come indicato fino alla data di scadenza indicata sulle etichette dei kit. Per le condizioni di conservazione, vedere la colonna Storage (Conservazione) nelle tabelle contenute in *Reagenti forniti a pagina 4*. Non utilizzare i reagenti scaduti.
- 5 Cambiamenti nell'aspetto fisico dei reagenti forniti possono indicare un deterioramento dei materiali. Non utilizzare i reagenti in caso di cambiamenti nell'aspetto fisico (ad es., variazioni evidenti nel colore del reagente oppure opacità visibile con contaminazione microbica).

- 6 Attenersi alle migliori pratiche seguenti quando si gestiscono Sample Purification Beads (Microsfere purificazione campione):
 - ▶ Non congelare mai le microsfere.
 - ▶ Prima dell'uso, portare le microsfere a temperatura ambiente.
 - ▶ Immediatamente prima dell'uso, agitare bene le microsfere con un vortex fino ad ottenere una corretta sospensione e il colore appare omogeneo.
- 7 Lysis Buffer (Tampone di lisi), Wash Buffer I (Tampone di lavaggio I), Wash Buffer II (Tampone di lavaggio II), Elution Buffer (Tampone di eluizione) e Proteinase Buffer (Tampone proteasi) possono formare precipitati o cristalli. Prima dell'uso, agitare energicamente con un vortex, quindi ispezionare visivamente per accertarsi che non vi sia presenza di precipitati.
- 8 Non congelare mai il sangue intero dopo la raccolta.
- 9 Sequenziare le librerie il prima possibile dopo il raggruppamento in pool. Le librerie raggruppate sono stabili per un massimo di sette giorni a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C.

Apparecchiature e materiali

Apparecchiature e materiali richiesti, non forniti

Apparecchiature richieste, non fornite

Apparecchiatura	Fornitore
Pipette a singolo canale da 20 µl	Fornitore di laboratorio generico
Pipette a singolo canale da 200 µl	Fornitore di laboratorio generico
Pipette a singolo canale da 1.000 µl	Fornitore di laboratorio generico
Pipette Aid	Fornitore di laboratorio generico
Frigorifero, temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C	Fornitore di laboratorio generico
Congelatore, tra -25 °C e -15 °C	Fornitore di laboratorio generico
Microcentrifuga	Fornitore di laboratorio generico
Vortex	Fornitore di laboratorio generico
Centrifuga e gruppo rotore per le provette di raccolta del sangue	
Raccomandato: <ul style="list-style-type: none"> • Centrifuga Allegra serie 6, 1.600 g • Rotore con bacinelle per la centrifuga Allegra GH-3.8 • Coperchi per bacinelle per la centrifuga Allegra, set di due • Gruppo adattatore per la centrifuga Allegra, 16 mm, set di quattro 	<ul style="list-style-type: none"> • Beckman Coulter, n. prodotto 366830 (120 V) • Beckman Coulter, n. prodotto 360581 • Beckman Coulter, n. prodotto 360585 • Beckman Coulter, n. prodotto 359150
Equivalente: <ul style="list-style-type: none"> • Centrifuga refrigerata dotata di 1.600 x g senza opzione di arresto • Rotore bacinelle oscillanti con bacinelle • Inserti bacinelle, capacità di 48 o 96 provette, profondità minima di 76 mm • Adattatori inserti per supportare provette di raccolta del sangue da 16 x 100 mm 	Fornitore di laboratorio generico
Centrifuga e gruppo rotore per micropiastre	

Apparecchiatura	Fornitore
Raccomandato: <ul style="list-style-type: none"> • Centrifuga Sorvall Legend XTR • Rotore micropiastre HIGHPlate 6000 • Una delle seguenti basi di supporto per micropiastre: <ul style="list-style-type: none"> • Base di supporto MicroAmp da 96 pozzetti • Portapietra PCR da 96 pozzetti 	<ul style="list-style-type: none"> • Thermo Fisher Scientific, n. di catalogo 75004521 (120 V) o n. di catalogo 75004520 (230 V) • Thermo Fisher Scientific, n. di catalogo 75003606 • Thermo Fisher Scientific, n. di catalogo 4379590 • Thermo Fisher Scientific, n. di catalogo AB-0563/1000
Equivalente: <ul style="list-style-type: none"> • Centrifuga da 5.600 × g • Rotore piastra oscillante con portapietra da 96 pozzetti, profondità minima di 76,5 mm • Base di supporto per micropiastre 	Fornitore di laboratorio generico
Uno dei seguenti lettori per micropiastre (fluorimetro) con SoftMax Pro v6.2.2 o superiore: <ul style="list-style-type: none"> • Gemini XPS • SpectraMax M2 	<ul style="list-style-type: none"> • Molecular Devices, n. codice XPS • Molecular Devices, n. codice M2
USB ad elevata velocità SpectraMax, adattatore seriale	Molecular Devices, n. codice 9000-0938
Ciclatore termico dotato delle seguenti specifiche: <ul style="list-style-type: none"> • Coperchio riscaldato • Intervallo di temperatura da 4 °C a 98 °C • Accuratezza temperatura ±2 °C • Rampa minima di 2 °C per secondo • Compatibile con la Piastra per PCR a 96 pozzetti twin.tec, fully skirted 	Fornitore di laboratorio generico
VeriSeq NIPT Microlab STAR	Hamilton, n. codice 95475-01 (115 V) n. codice 95475-02 (230 V)
Sistema di sequenziamento di nuova generazione (NGS) dotato delle seguenti caratteristiche: <ul style="list-style-type: none"> • Sequenziamento paired-end da 2 x 36 bp • Compatibile con gli adattatori doppio indice di VeriSeq NIPT Sample Prep • Creazione automatica di file .BCL • Chimica basata su due coloranti • 400 milioni di letture paired-end per corsa • Compatibile con VeriSeq NIPT Assay Software 	Fornitore strumento
VeriSeq OnSite Server	Illumina, n. codice 15076164

Apparecchiature facoltative, non fornite

Apparecchiatura	Fornitore
Sistema per l'estrazione dei tappi Pluggo	LGP Consulting, n. codice 4600 4450
Piastra di convalida fluorescente SpectraMax SpectraTest FL1	Molecular Devices, n. codice 0200-5060
Revolver/Rotator per provette, provette da 15 ml, 40 giri/min, 100-240 V	Thermo Scientific, n. catalogo 88881001 (U.S.A.) o n. di catalogo 88881002 (EU)

Materiali richiesti, non forniti

Materiale di consumo	Fornitore
Punte filtro non sterili conduttive da 1.000 µl	Hamilton, n. codice 235905
Punte filtro non sterili conduttive da 300 µl	Hamilton, n. codice 235903
Punte filtro non sterili conduttive da 50 µl	Hamilton, n. codice 235948
Serbatoio con pozzetti profondi	Corning Axygen, n. prodotto RES-SW96-HP-SI
20 provette per reagente medie MagNA Pure LC, 20 ml	Roche, n. prodotto 3004058001
Piastra da 96 pozzetti profondi, 2 ml	Eppendorf, n. codice 951033600
Micropiastra con base piatta in polistirolo nera dotata di 384 pozzetti a basso volume	Corning, n. prodotto 3820
Piastra per PCR a 96 pozzetti twin.tec, fully skirted	Eppendorf, n. codice 30129512
Uno dei seguenti sigilli: • Sigillo con microsigillo 'F' • Sigilli in alluminio	• Bio-Rad, n. catalogo MSF1001 • Beckman Coulter, n. prodotto 538619
Cell-Free DNA BCT CE	Streck, n. di catalogo 218997
Tappi a pressione	Sarstedt, n. ordine 65.802
Provette con tappo avvitabile, 2 ml	Fornitore di laboratorio generico
Punte per filtro da 20 µl per pipettatore da 20 µl	Fornitore di laboratorio generico
Punte per filtro da 200 µl per pipettatore da 200 µl	Fornitore di laboratorio generico
Punte per filtro da 1.000 µl per pipettatore da 1.000 µl	Fornitore di laboratorio generico
Pipette sierologiche da 25 ml	Fornitore di laboratorio generico
Pipette sierologiche da 10 ml	Fornitore di laboratorio generico
Raccomandato: • Deconex® SOLARSEPT • Deconex® 61 DR	Borer Chemie AG
Equivalente: • Uno spray a base alcolica per disinfezione rapida • Una soluzione di detergente disinfettante	Fornitore di laboratorio generico

Materiali facoltativi, non forniti

Materiale di consumo	Fornitore
Provetta, tappo avvitabile, 10 ml	Sarstedt, n. ordine 60.551
Provetta, tappo avvitabile, 50 ml	Fornitore di laboratorio generico

Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni



ATTENZIONE

Manipolare tutti i campioni come agenti potenzialmente infettivi.

- 1 Devono essere utilizzati i campioni di sangue intero di 7–10 ml raccolti nelle provette Streck Cell-Free DNA BCT. Non congelare.
- 2 Conservare la provetta di raccolta del sangue a 4 °C entro cinque giorni dalla raccolta e completare l'isolamento del plasma entro dieci giorni.
- 3 Il trasporto di sangue intero deve essere conforme alle regolamentazioni applicabili per il trasporto di agenti eziologici.

Avvertenze e precauzioni

- ▶ Questo saggio contiene proteasi K. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Utilizzarlo in un'area ben ventilata, indossare indumenti protettivi, evitare di inalare la polvere e smaltire eventuali contenitori e contenuti non utilizzati in conformità agli standard applicabili di sicurezza in vigore localmente.
- ▶ Questo saggio contiene guanidina cloridrato. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Utilizzarlo in un'area ben ventilata, indossare indumenti protettivi e smaltire eventuali contenitori e contenuti non utilizzati in conformità agli standard applicabili di sicurezza in vigore localmente.
- ▶ Questo saggio contiene 2-propanolo, un composto chimico infiammabile. Tenere lontano da calore e fiamme aperte. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Utilizzarlo in un'area ben ventilata, indossare indumenti protettivi e smaltire eventuali contenitori e contenuti non utilizzati in conformità agli standard applicabili di sicurezza in vigore localmente.
- ▶ Per impedire la formazione di gas dannosi, non smaltire i residui dell'estrazione di cfDNA (contiene tiocianato di guanidinio) con residui che contengono candeggina (ipoclorito di sodio).
- ▶ Manipolare tutti i campioni come contenenti agenti potenzialmente infettivi.
- ▶ Adottare le normali precauzioni di laboratorio. Non pipettare con la bocca. Non mangiare, bere o fumare nelle aree designate per il lavoro. Manipolare i campioni e i reagenti del saggio indossando guanti e indumenti da laboratorio monouso. Dopo aver maneggiato i campioni e i reagenti del saggio lavarsi bene le mani.
- ▶ Non utilizzare i componenti del saggio oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta della scatola del saggio. Non scambiare i componenti di diversi lotti di saggi. I lotti dei saggi sono identificati sull'etichetta della scatola del saggio. Conservare i componenti del saggio alla temperatura indicata.
- ▶ Per impedire la degradazione del campione o del reagente, assicurarsi che tutti i vapori di ipoclorito di sodio prodotti dalla pulizia siano stati dissipati completamente prima di avviare il protocollo.
- ▶ In caso contrario le procedure indicate potrebbero fornire risultati errati o una significativa riduzione nella qualità del campione.

Note sulle procedure

Evitare la contaminazione

- ▶ Utilizzare punte pulite e materiali di consumo puliti per apparecchiature di laboratorio.
- ▶ Miscelare i campioni mediante una pipetta. L'utilizzo di punte dotate di barriera aerosol riduce il rischio di carry-over e la contaminazione incrociata da campione a campione. Centrifugare dopo aver utilizzato un vortex.
- ▶ A causa della possibilità di contaminazione, prestare estrema cura affinché tutti i contenuti del pozzetto rimangano completamente nel pozzetto. Non far schizzare il contenuto.
- ▶ Attenersi alle regolamentazioni applicabili per la pratica e l'igiene di laboratorio corrette quando si manipola sangue o derivati del sangue.

Pulizia del piano di VeriSeq NIPT Microlab STAR

- ▶ Prima dell'utilizzo, ispezionare il piano e verificare che sia pulito. Almeno una volta alla settimana, eseguire la manutenzione settimanale e attenersi a queste istruzioni di pulizia.
- ▶ Pulire tutti i dispositivi di trasporto con uno spray a base alcolica per disinfezione rapida (Deconex® SOLARSEPT o equivalente) e lasciarli asciugare. Se sono particolarmente sporchi, immergerli poi in una soluzione di detergente disinfettante (liquido di pulizia Deconex® 61 DR o equivalente).
- ▶ Aprire il coperchio anteriore e pulire il piano con un panno saturato con Deconex® SOLARSEPT (o equivalente). Verificare in particolare la pulizia dei blocchi di scorrimento.

- ▶ Rimuovere il collettore CVS e pulire il collettore, la guarnizione e i compartimenti interni di CVS con un panno. Svuotare lo scarico delle punte per la testata a 96 punte CORE e il canale indipendente.
- ▶ Rimuovere la piastra di eiezione delle punte del canale indipendente della stazione di scarico delle punte e pulirla: nebulizzare con Deconex® SOLARSEPT (o equivalente) direttamente sulla superficie e pulirla. Mettere un nuovo sacchetto di plastica sul telaio e riattaccarlo. Rimettere in posizione la piastra di eiezione delle punte del canale indipendente.
- ▶ Nebulizzare Deconex® SOLARSEPT (o equivalente) direttamente sulla superficie della scatola di scarico della testata a 96 punte CORE e sullo scivolo di scarico e pulirli.
- ▶ Inumidire un panno che non lascia residui o cotton fioc con etanolo al 70%. Tamponare la finestrella dello scanner laser del lettore del codici e barre. Utilizzando lo stesso panno o cotton fioc, pulire ogni pozzetto dell'adattatore portacelle CPAC. Se si utilizza un panno, premere il panno in ciascun pozzetto dell'adattatore utilizzando la parte posteriore di una penna per assicurarsi di pulire correttamente l'interno del pozzetto.
- ▶ Pulire i canali indipendenti:
 - ▶ Sui canali indipendenti, pulire i manicotti di eiezione delle punte (parte esterna dei canali di pipettamento) con un panno che non lascia residui ben imbevuto di Deconex® SOLARSEPT (o equivalente). Vedere *Hamilton Microlab STAR Reference Guide, documento n. 15070074* (Guida di riferimento di Hamilton Microlab STAR).
 - ▶ Pulire il disco di arresto e gli O-ring della testata di pipettamento (parte esterna dei canali di pipettamento) con un panno che non lascia residui ben imbevuto di Deconex® SOLARSEPT (o equivalente).
- ▶ Pulire la testata a 96 punte CORE:
 - ▶ Utilizzando lo stesso panno che non lascia residui ben imbevuto di Deconex® SOLARSEPT (o equivalente), pulire l'alloggiamento della testata a 96 punte e la parte inferiore dei dischi di arresto.
 - ▶ Utilizzando lo stesso panno che non lascia residui o un pezzo di panno ben imbevuto di Deconex® SOLARSEPT (o equivalente), pulire, come con un filo interdentale, i lati dei canali delle pipette della testata a 96 punte per pulire gli O-ring. Ripetere questa procedura per ogni canale delle pipette sulla testata a 96 punte.
- ▶ Nebulizzare il coperchio anteriore e laterale con Deconex® SOLARSEPT (o equivalente) e asciugarli.
- ▶ Pulire il nastro di protezione Autoload con un panno ben imbevuto di Deconex® SOLARSEPT (o equivalente) e pulire senza esercitare pressione.

**NOTA**

La pulizia e la manutenzione inappropriate di ML STAR possono risultare in contaminazione incrociata e scarse prestazioni del saggio.

Controllo qualità

Il materiale di controllo con caratteristiche delle prestazioni note potrebbe essere valutato per rilevare le differenze nell'elaborazione e nelle procedure tecniche del laboratorio.

**NOTA**

L'elaborazione di un campione di riferimento o di un controllo non templato riduce il numero totale di campioni di sangue materno non noti che possono essere elaborati con ciascun kit di preparazione dei campioni.

Non superare il numero di due campioni NTC per un batch di 48 campioni oppure quattro campioni NTC per un batch di 96 campioni.

Istruzioni per l'uso

Suggerimenti e tecniche

Se il protocollo non specifica un punto di arresto sicuro, passare immediatamente al passaggio successivo.

Assegnazione dei codici a barre alle piastre

- I codici a barre delle piastre fully skirted iniziano con PL.
- I codici a barre delle piastre con pozzetti profondi iniziano con DW.
- Applicare i codici a barre alle piastre fully skirted e alle piastre con pozzetti profondi sul lato accanto alla colonna 12.
- Caricare le piastre con i codici a barre rivolti verso destra per permettere la scansione automatizzata.

Mettere e togliere la sigillatura alla piastra

- ▶ Sigillare sempre la piastra a 96 pozzetti prima di eseguire le seguenti fasi nel protocollo:
 - ▶ Fasi della centrifuga
 - ▶ Fasi del ciclatore termico
- ▶ Per sigillare la piastra, applicare una copertura adesiva alla piastra, quindi sigillare.
- ▶ Prima di togliere la sigillatura:
 - ▶ Centrifugare brevemente la piastra a 96 pozzetti a 1.000 × g per 20 secondi.
 - ▶ Posizionare la piastra su una superficie piatta prima di rimuovere lentamente la sigillatura.

VeriSeq NIPT Microlab STAR

- ▶ Prima dell'utilizzo, eseguire e documentare la manutenzione richiesta in base alle istruzioni del fabbricante.
- ▶ Osservare ML STAR mentre esegue le fasi automatizzate. Monitorare l'interfaccia software di VeriSeq NIPT Workflow Manager per i suggerimenti e le istruzioni per l'operatore.
- ▶ Mantenere il coperchio anteriore in posizione durante il funzionamento.
- ▶ Mantenere il piano libero da ogni oggetto durante il funzionamento.
- ▶ Durante le fasi di creazione del vuoto della piastra:
 - ▶ Se indicato da VeriSeq NIPT Workflow Manager, contribuire manualmente alla formazione del vuoto tra la piastra e il collettore del vuoto.
 - ▶ In caso di malfunzionamento dell'apparecchiatura, spegnere e accendere il vuoto manualmente quando suggerito dal software Workflow Manager.
- ▶ Consentire al sistema di eliminare automaticamente le punte dall'adattatore. Non rimuovere manualmente le punte.
- ▶ Rimuovere i reagenti usati e i materiali di consumo usati come suggerito da Workflow Manager.
- ▶ Vuotare le damigiane dello scarico del vuoto quotidianamente. Il contenuto della prima damigiana non dovrebbe superare la metà. Fuoriuscite dello scarico del vuoto possono danneggiare la pompa del vuoto.

Elaborazione dei campioni di sangue

Procedura

- 1 Centrifugare i campioni di sangue dotati di codice a barre a 1.600 × g per dieci minuti a 4 °C con il freno disinserito.
- 2 Attendere l'arresto completo della centrifuga, quindi rimuovere le provette di campione.
Dopo la centrifugazione, iniziare l'isolamento del plasma entro 15 minuti. Se trascorrono più di 15 minuti, ripetere la procedura di centrifugazione.

- 3 Controllare l'idoneità di ogni campione, assicurandosi di verificare i seguenti aspetti:
 - ▶ Il volume del campione deve corrispondere a quello previsto.
 - ▶ La separazione del campione deve essere avvenuta correttamente durante la centrifugazione.
 - ▶ Il livello del plasma deve essere almeno 1,5 ml al di sopra dello strato leucocitario-piastrinico.
 - ▶ Il campione non deve essere fortemente emolizzato (il plasma non deve avere un aspetto rosso intenso).
 - ▶ Il campione non deve essere lipemico (ad esempio, il plasma non deve avere un aspetto bianco torbido o opaco lattiginoso).
 - ▶ Il campione non deve presentare coaguli.



ATTENZIONE

I campioni conservati o manipolati in modo improprio possono diventare non idonei. L'elaborazione di campioni non idonei nel flusso di lavoro può provocare un intasamento della piastra di legame durante le estrazioni e il conseguente verificarsi di eventi di fuoriuscita dei campioni nei pozzetti adiacenti.

- 4 Stappare le provette e caricarle nel portaprovette. Caricare tutti i campioni e qualsiasi controllo del plasma per il batch.

Isolamento del plasma

Preparazione

- 1 Etichettare una piastra con pozzetti profondi Intermediate Plasma (Plasma intermedia) e applicare un codice a barre della piastra.
- 2 Etichettare una piastra con pozzetti profondi Final Plasma (Plasma finale) e applicare un codice a barre della piastra.



ATTENZIONE

Assicurarsi di utilizzare il tipo di piastra corretto per le piastre Intermediate Plasma (Plasma intermedia) e Final Plasma (Plasma finale). L'utilizzo di un serbatoio con pozzetti profondi invece di una piastra con pozzetti profondi porta all'amalgamazione dei campioni e può generare risultati errati.

Procedura

- 1 Aprire AppLauncher, quindi fare clic su VeriSeq NIPT Method (Metodo VeriSeq NIPT).
- 2 Inserire Batch ID (ID batch) e il nome utente, quindi fare clic su OK.
L'ID del batch è limitato a 26 caratteri. Utilizzare solo numeri, lettere, trattini bassi (_) o trattini (-). Ad esempio: 2025-10-16_Batch3.
- 3 Fare clic su New Batch (Nuovo batch) e, dopo l'inizializzazione, fare clic su OK per avviare l'isolamento del plasma.
- 4 Eseguire una delle seguenti operazioni.
 - Per caricare un foglio campioni esistente, selezionare il foglio campioni associato con il batch, quindi fare clic su OK.
 - Per procedere senza caricare un foglio campioni, fare clic su No Sample Sheet (Nessun foglio campioni).
 Per maggiori informazioni sulla creazione di un foglio campioni, vedere la *Guida di VeriSeq NIPT Solution Software (documento n. 1000000001949)*.



NOTA

Il tipo di campione, singolo o gemellare, deve essere accuratamente registrato per ciascun campione per poter assicurare l'analisi dei dati corretta.

- 5 Selezionare la dimensione del batch, quindi fare clic su OK.
- 6 Selezionare il numero di controlli non templati (NTC), quindi fare clic su OK.

- 7 Confermare che tutti i codici a barre siano stati assegnati e caricare i campioni, le punte e le piastre (codice a barre rivolto verso destra) sul dispositivo di trasporto. Fare clic su OK dopo ogni avviso di caricamento.

Dimensione del batch del campione	Dispositivo utilizzato	Monitoraggio	Item	Posizione sito
48	Punta	7-12	Punte da 1.000 µl	5
	Provetta	15	Provette di campione di sangue preparate 1-24	1-24
	Provetta	16	Provette di campione di sangue preparate 25-48	25-48
	Multiflex	19-24	Svuotare la piastra con pozzetti profondi, Final Plasma (Plasma finale) - dotata di codici a barre	4
	Multiflex	19-24	Svuotare la piastra con pozzetti profondi, Intermediate Plasma (Plasma intermedio) - dotata di codici a barre	5
	Reagente	47	[Facoltativo] DPBS per il controllo non templato	5
96	Punta	7-12	Punte da 1.000 µl	4, 5
	Provetta	15	Provette di campione di sangue preparate 1-24	1-24
	Provetta	16	Provette di campione di sangue preparate 25-48	25-48
	Provetta	17	Provette di campione di sangue preparate 49-72	49-72
	Provetta	18	Provette di campione di sangue preparate 73-96	73-96
	Multiflex	19-24	Svuotare la piastra con pozzetti profondi, Final Plasma (Plasma finale) - dotata di codici a barre	4
	Multiflex	19-24	Svuotare la piastra con pozzetti profondi, Intermediate Plasma (Plasma intermedio) - dotata di codici a barre	5
	Reagente	47	[Facoltativo] DPBS per il controllo non templato	5

- 8 Assicurarsi che i dispositivi di trasporto, le apparecchiature di laboratorio e i reagenti siano caricati correttamente, quindi fare clic su OK nella schermata Pre-Spin Deck Verification (Verifica del piano pre-centrifuga).
- 9 Osservare ML STAR mentre esegue le fasi automatizzate.
- 10 Quando suggerito da Workflow Manager, assicurarsi che il piano di caricamento di ML STAR non presenti ostruzioni in modo da permettere a ML STAR di scaricare i dispositivi di trasporto, quindi fare clic su Unload (Scarica) per scaricare il piano.
- 11 Rimuovere la piastra con pozzetti profondi Intermediate Plasma (Plasma intermedio).
- Ispezionare visivamente la piastra per verificare che i volumi in ciascun pozzetto siano coerenti (nessun errore di pipette). Il volume previsto è 1.000 µl.
 - Annotare eventuali incoerenze e registrarle al termine della procedura di isolamento del plasma.
 - Sigillare la piastra, caricare i campioni in modo bilanciato e centrifugare a 5.600 × g per 10 minuti con il freno disinserito o all'impostazione più bassa.
- 12 Fare clic su Yes (Sì) per passare alla fase finale Plasma Preparation (Preparazione del plasma).
- 13 Rimuovere il sigillo della piastra e ricaricare la piastra sul dispositivo di trasporto.

Dimensione del batch del campione	Dispositivo utilizzato	Monitoraggio	Item	Posizione sito
48, 96	Multiflex	19-24	Piastra con pozzetti profondi Intermediate Plasma (Plasma intermedio)	5

- 14 Selezionare la casella di controllo Intermediate Plasma plate has been spun (La piastra plasma intermedio è stata fatta ruotare), quindi fare clic su OK.
- 15 Osservare ML STAR mentre esegue le fasi automatizzate.

- 16 Quando suggerito da Workflow Manager, assicurarsi che il piano di caricamento di ML STAR non presenti ostruzioni in modo da permettere a ML STAR di scaricare i dispositivi di trasporto, quindi fare clic su Unload (Scarica) per scaricare il piano.
- 17 Quando suggerito da Workflow Manager, svuotare il dispositivo di trasporto e il piano.
- 18 Rimuovere la piastra con pozzetti profondi Final Plasma (Plasma finale).
- 19 Ispezionare visivamente la piastra per verificare quanto segue:
 - ▶ Volumi coerenti in ciascun pozzetto. Volume previsto di 900 µl.
 - ▶ Pellet cellulari visibili
 - ▶ Eccessiva emolisi

In caso di un pellet cellulare visibile o eccessiva emolisi, invalidare il campione interessato al termine del metodo Plasma Isolation (Isolamento del plasma) o utilizzare Batch Manager. Per maggiori informazioni su Batch Manager, vedere la *Guida di VeriSeq NIPT Solution Software (documento n. 1000000001949)*.
- 20 Quando suggerito da Workflow Manager, fare clic su OK.
- 21 Inserire i commenti sui pozzetti interessati, quindi fare clic su OK.
- 22 Eseguire una delle seguenti operazioni.
 - Per passare a cfDNA Extraction (Estrazione di cfDNA), fare clic su Yes (Sì).
 - Per fermarsi, fare clic su Exit (Esci).

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Nel caso si esegua un arresto, sigillare la piastra Final Plasma (Plasma finale) e conservare a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C per un massimo di sette giorni.

Estrazione di cfDNA

Preparazione

- 1 Esaminare visivamente le scatole Extraction Box (Scatola di estrazione) e Accessory Box (Scatola accessori) per accertarsi che il kit non sia scaduto.
- 2 Preparare i seguenti reagenti. Etichettare le provette dei serbatoi e i serbatoi con pozzetti profondi con il nome dei reagenti.

Item	Conservazione	Istruzioni
Piastra Final Plasma (Plasma finale) con pozzetti profondi da <i>Isolamento del plasma a pagina 13</i> .	tra 2 °C e 8 °C	Se precedentemente conservata, lasciare trascorrere 30 minuti per portarla a temperatura ambiente. Prima dell'utilizzo, togliere il sigillo dalla piastra con pozzetti profondi Final Plasma (Plasma finale).
Proteinase K (Proteasi K)	tra 15 °C e 30 °C	Aggiungere lentamente 3,75 ml di Proteinase Buffer (Tampone proteasi) a ciascuna provetta di reagente. <ul style="list-style-type: none"> • Preparare 3 provette per 48 campioni. • Preparare 4 provette per 96 campioni. Tappare la provetta e utilizzare un vortex fino a quando si verifica la risospensione. Il reagente preparato per il raggruppamento in pool da tutte le provette in una provetta di reagente.
Wash Buffer II (Tampone di lavaggio II)	tra 15 °C e 30 °C	Aggiungere 100 ml di EtOH al 100% a ciascun flacone di reagente. <ul style="list-style-type: none"> • Preparare 1 flacone per 48 campioni. • Preparare 2 flaconi per 96 campioni. Capovolgere per miscelare. Contrassegnare la casella di spunta sul flacone.

- 3 Etichettare una nuova piastra fully skirted Intermediate (Intermedia) e applicare un codice a barre della piastra.
- 4 Etichettare una nuova piastra fully skirted cfDNA Elution (Eluizione di cfDNA) e applicare un codice a barre della piastra.
- 5 Etichettare una nuova piastra fully skirted Extraction Intermediate (Estrazione intermedia) e applicare un codice a barre della piastra.

- 6 Applicare un codice a barre della piastra alla piastra DNA Binding (Legame del DNA).
- 7 Preparare una soluzione di pulizia di EtOH al 70% (EtOH al 70%, acqua priva di DNasi/RNasi al 30%) per pulire il sistema del vuoto.
- 8 Preparare il sistema del vuoto.
 - a Rimuovere il collettore del vuoto e lavare con EtOH al 70%.
 - b Svuotare lo scarico del vuoto.
 - c Assicurarci che il sistema del vuoto di ML STAR sia attivato.

Procedura

- 1 Fare clic su OK per avviare l'estrazione di cfDNA. Se VeriSeq NIPT Method non è ancora aperto:
 - a Aprire AppLauncher e fare clic su VeriSeq NIPT Method (Metodo VeriSeq NIPT).
 - b Inserire Batch ID (ID batch) e il nome utente, quindi fare clic su OK.

- 2 Caricare le punte sui portapunte nel modo seguente, quindi fare clic su OK.

Dimensione del batch del campione	Dispositivo Tipo	Monitoraggio	Apparecchio	Posizione sito
48	Punta	1-6	Punte da 1.000 µl	1, 2
		7-12	Punte da 300 µl	1
96	Punta	1-6	Punte da 1.000 µl	1, 2, 3, 4
		7-12	Punte da 300 µl	1

- 3 Caricare le punte contate sul portapunte nel modo seguente.

Dimensione del batch del campione	Dispositivo	Monitoraggio	Apparecchio	Posizione sito
48, 96	Punta	49-54	Punte da 1.000 µl	1
			Punte da 300 µl	2
			Punte da 50 µl	3

- 4 Inserire la posizione della prima e dell'ultima punta per ciascun rack delle punte, quindi fare clic su OK.
- 5 Eseguire la scansione dei codici a barre di Extraction Box (Scatola estrazione).
- 6 Immettere il nome utente o le iniziali dell'utente che ha preparato i reagenti, quindi fare clic su OK.
- 7 Eseguire la scansione dei codici a barre di Accessory Box (Scatola accessori).
- 8 Immettere il nome utente o le iniziali dell'utente che ha preparato i reagenti, quindi fare clic su OK.
- 9 Confermare che i codici a barre siano stati assegnati, togliere il sigillo dalla piastra a pozzetti profondi Final Plasma (Plasma finale), se necessario, e caricare le piastre sul portapiastre (codice a barre rivolto verso destra) nel modo seguente, quindi fare clic su OK.

Dimensione del batch del campione	Dispositivo Tipo	Monitoraggio	Apparecchio	Posizione sito
48, 96	Multiflex	19-24	Nuova piastra fully skirted, Intermediate (Intermedia) - dotata di codice a barre	1
			Nuova piastra fully skirted, cfDNA Elution (Eluizione di cfDNA) - dotata di codice a barre	2
			Nuova piastra a pozzetti profondi, Extraction Intermediate (Estrazione intermedia) - dotata di codice a barre	4
			Piastra a pozzetti profondi Final Plasma (Plasma finale) - dotata di codice a barre	5

- 10 Confermare che la piastra DNA Binding (Legame del DNA) disponga di codice a barre, quindi fare clic su OK.

- 11 Per il batch da 48 campioni, tagliare un sigillo a metà e applicarlo sulle colonne 7–12 non utilizzate della piastra prima del caricamento nel collettore del vuoto.
- 12 Caricare la piastra DNA Binding (Legame del DNA) sul collettore del vuoto con il codice a barre rivolto verso destra, quindi fare clic su OK.
- 13 Caricare le provette di reagente sul portareagenti nel modo seguente, quindi fare clic su OK.

Dimensione del batch del campione	Dispositivo Tipo	Monitoraggio	Apparecchio	Posizione sito
48	Reagente	47	16 ml di Elution Buffer (Tampone di eluizione)	1
			11 ml di Proteinase K (Proteasi K)	2
96	Reagente	47	16 ml di Elution Buffer (Tampone di eluizione)	1
			15 ml di Proteinase K (Proteasi K)	2

- 14 Trasferire i reagenti indicati nei serbatoi con pozzetti profondi, quindi caricare i serbatoi nel portapozzetti profondi nel modo seguente, infine fare clic su OK.

Dimensione del batch del campione	Dispositivo Tipo	Monitoraggio	Apparecchio	Posizione sito
48	Pozzetto profondo	39–44	125 ml di Wash Buffer II (Tampone di lavaggio II)	1
			125 ml di Wash Buffer I (Tampone di lavaggio I)	2
			60 ml di EtOH al 100%	3
			100 ml di Lysis Buffer (Tampone di lisi)	4
			60 ml di acqua priva di DNasi/RNasi	5
96	Pozzetto profondo	39–44	200 ml di Wash Buffer II (Tampone di lavaggio II)	1
			125 ml di Wash Buffer I (Tampone di lavaggio I)	2
			100 ml di EtOH al 100%	3
			100 ml di Lysis Buffer (Tampone di lisi)	4
			100 ml di acqua priva di DNasi/RNasi	5

- 15 Attendere il completamento della verifica automatica del volume di reagente.
- 16 Confermare che lo scarico del vuoto non superi la metà (è consigliato che sia vuoto), quindi fare clic su OK.
- 17 Confermare la posizione di tutti i dispositivi di trasporto, le apparecchiature di laboratorio e i reagenti, quindi fare clic su OK sulla schermata Extraction Deck Verification (Verifica del piano di estrazione).
- 18 Osservare ML STAR mentre esegue le fasi automatizzate.
- 19 Al termine della fase finale del vuoto, centrifugare la piastra DNA Binding (Legame del DNA), quindi fare clic su OK.
 - a Rimuovere la piastra DNA Binding (Legame del DNA) e pulire la parte inferiore con EtOH al 70%.
 - b Sigillare eventuali pozzetti non coperti sulla piastra DNA Binding (Legame del DNA) e posizionarla sulla piastra a pozzetti profondi Final Plasma (Plasma finale).
 - c Centrifugare il gruppo della piastra DNA Binding/Final Plasma (Legame del DNA/Plasma finale) a 5.600 x g per 10 minuti con il freno inserito.
- 20 Durante la centrifugazione della piastra DNA Binding (Legame del DNA), completare la pulizia del vuoto.
 - a Attendere il completamento dell'eliminazione automatizzata dello scarico.

- b Pulire il collettore del vuoto e dentro il sistema del vuoto con EtOH al 70%, quindi sostituire il collettore del vuoto.
 - c Selezionare la casella di controllo Manifold is on Vacuum (Collettore sotto vuoto) per avviare il trasferimento della piastra di eluizione sul collettore del vuoto, quindi fare clic su OK.
- 21 Rimuovere il collettore del vuoto, quindi fare clic su OK.
 - 22 Al termine della centrifugazione, togliere i sigilli dai pozzetti contenenti i campioni e posizionare la piastra DNA Binding (Legame del DNA) sulla piastra cfDNA Elution (Eluizione di cfDNA). La piastra cfDNA Elution (Eluizione di cfDNA) si trova sul collettore del vuoto. Caricare la piastra DNA Binding (Legame del DNA) con il codice a barre rivolto verso destra, quindi fare clic su OK.
 - 23 Osservare ML STAR mentre esegue le fasi automatizzate.



ATTENZIONE

È necessario invalidare manualmente le fuoriuscite dei campioni non rilevate dal sistema prima che queste contaminino i pozzetti vicini.

- 24 Dopo la fase di incubazione, selezionare la casella di controllo Plates are assembled as indicated (Le piastre sono nella posizione indicata), confermando che il gruppo della piastra DNA Binding/cfDNA Elution (Legame del DNA/Eluizione di cfDNA) si trova su una base di supporto (se richiesto dalla centrifuga).
- 25 Sigillare i pozzetti non coperti sulla piastra DNA Binding (Legame del DNA) e centrifugare a 5.600 x g per due minuti con il freno inserito, quindi fare clic su OK.
- 26 Ispezionare visivamente la piastra cfDNA Elution (Eluizione di cfDNA) per verificare che i volumi contenuti in ciascun pozzetto siano coerenti. Il volume previsto è di circa 55 µl.
- 27 Sigillare la piastra cfDNA Elution (Eluizione di cfDNA) in attesa della preparazione delle librerie.
- 28 Quando suggerito da Workflow Manager, assicurarsi che il piano di caricamento di ML STAR non presenti ostruzioni, in modo da permettere a ML STAR di scaricare i dispositivi di trasporto, quindi fare clic su Unload (Scarica) per scaricare il piano.
- 29 Scaricare tutti i dispositivi di trasporto e pulire il piano di ML STAR, quindi fare clic su OK.
- 30 Inserire i commenti sui pozzetti interessati, quindi fare clic su OK.
- 31 Eseguire una delle seguenti operazioni:
 - Per passare a Prepare Libraries (Preparazione delle librerie), fare clic su Yes (Sì).
 - Per fermarsi, fare clic su Exit (Esci).

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Nel caso si esegua un arresto, sigillare la piastra cfDNA Elution (Eluizione di cfDNA) e conservare a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di sette giorni.

Preparazione delle librerie

Preparazione

- 1 Esaminare visivamente le scatole Library Prep Box (Scatola preparazione delle librerie) e Accessory Box (Scatola accessori) per accertarsi che il kit non sia scaduto.
- 2 Preparare i seguenti reagenti. Etichettare le provette dei serbatoi e i serbatoi con pozzetti profondi con i nomi dei reagenti.

Item	Conservazione	Istruzioni
End Repair Mix (Miscela riparazione finale)	tra -25 °C e -15 °C	Scongelare a temperatura ambiente. Utilizzare un vortex per miscelare.
A-Tailing Mix (Miscela A-tailing)	tra -25 °C e -15 °C	Scongelare a temperatura ambiente. Utilizzare un vortex per miscelare, quindi centrifugare brevemente.
Ligation Mix (Miscela di ligazione)	tra -25 °C e -15 °C	Scongelare a temperatura ambiente. Utilizzare un vortex per miscelare, quindi centrifugare brevemente.
Resuspension Buffer (Tampone risospensione)	tra 2 °C e 8 °C	Utilizzare un vortex per miscelare. Dopo l'utilizzo, riportare nello spazio adibito a conservazione.
Hybridization Buffer (Tampone di ibridazione)	tra -25 °C e -15 °C	Scongelare a temperatura ambiente. Utilizzare un vortex per miscelare. Dopo l'utilizzo, riportare nello spazio adibito a conservazione.
VeriSeq NIPT DNA Adapter Plate (Piastra adattatore DNA VeriSeq NIPT)	tra -25 °C e -15 °C	Scongelare a temperatura ambiente. Utilizzare un vortex per miscelare. Centrifugare a 1.000 × g per 20 secondi. Applicare un codice a barre della piastra.
Sample Purification Beads (Microsfere purificazione campione)	tra 2 °C e 8 °C	Lasciare trascorrere 30 minuti per portarla a temperatura ambiente. Agitare vigorosamente con un vortex prima di ogni utilizzo. Miscelare mediante un vortex o capovolgere fino a quando tutte le microsfere non siano in sospensione e la miscela non sia omogenea.
EtOH all'80%	tra 2 °C e 8 °C	Preparare al momento una soluzione. Combinare 40 ml di EtOH al 100% e 10 ml di acqua priva di DNasi/RNasi. Capovolgere per miscelare.
Piastra cfDNA Extraction (Estrazione di cfDNA) da <i>Estrazione di cfDNA a pagina 15.</i>	tra -25 °C e -15 °C	Se precedentemente conservata, confermare che la piastra non sia stata conservata per più di sette giorni e scongelarla a temperatura ambiente. Centrifugare con un vortex a 1.500 giri/min per un minuto. Centrifugare a 1.000 × g per 20 secondi.

- 3 Etichettare una nuova piastra fully skirted Libraries (Librerie) e applicare un codice a barre della piastra.
- 4 Assicurarsi che il controllo termico di ML STAR sia attivato.

Diluizione degli enzimi

- 1 Combinare A-Tailing Mix (Miscela A-tailing) e Resuspension Buffer (Tampone risospensione) in una provetta con tappo avvitabile. Utilizzare un vortex per miscelare, quindi centrifugare brevemente.

Dimensione del batch del campione	A-Tailing Mix (Miscela A-tailing)	Resuspension Buffer (Tampone risospensione)
48	900 µl	1.200 µl
96	1.800 µl	2.400 µl

- 2 Combinare Ligation Mix (Miscela di ligazione) e Resuspension Buffer (Tampone risospensione) in una provetta con tappo avvitabile. Utilizzare un vortex per miscelare, quindi centrifugare brevemente.

Dimensione del batch del campione	Ligation Mix (Miscela di ligazione)	Resuspension Buffer (Tampone risospensione)
48	230 µl	1.713 µl
96	440 µl	3.278 µl

Procedura

- 1 Fare clic su OK per avviare la preparazione delle librerie . Se VeriSeq NIPT Method non è ancora aperto:
 - a Aprire AppLauncher e fare clic su VeriSeq NIPT Method (Metodo VeriSeq NIPT).
 - b Inserire Batch ID (ID batch) e il nome utente, quindi fare clic su OK.
- 2 Confermare che siano stati preparati i seguenti item come indicato nella schermata Reagent Preparation (Preparazione dei reagenti):
 - ▶ A-Tailing Mix (Miscela A-tailing), Ligation Mix (Miscela di ligazione) ed EtOH all'80%
 - ▶ Sample Purification Beads (Microsfere purificazione campione), End Repair Mix (Miscela riparazione finale) e VeriSeq NIPT DNA Adapter Plate (Piastra adattatore DNA VeriSeq NIPT)
- 3 Selezionare le caselle di controllo, quindi fare clic su OK.
- 4 Eseguire la scansione dei codici a barre di Library Prep Box (Scatola preparazione delle librerie).
- 5 Inserire il nome utente o le iniziali dell'utente che ha preparato i reagenti, quindi fare clic su OK.
- 6 Eseguire la scansione dei codici a barre di Accessory Box (Scatola accessori).
- 7 Inserire il nome utente o le iniziali dell'utente che ha preparato i reagenti, quindi fare clic su OK.
- 8 Caricare le punte sui portapunte nel modo seguente, quindi fare clic su OK per ogni portapunte.

Dimensione del batch del campione	Dispositivo utilizzato	Monitoraggio	Item	Posizione sito
48	Punta	1-6	Punte da 50 µl	1, 2
		7-12	Punte da 300 µl	1, 2, 3, 5
96	Punta	1-6	Punte da 50 µl	1, 2, 3, 4
		7-12	Punte da 300 µl	1, 2, 3, 4, 5

- 9 Se il protocollo è stato interrotto dall'utente dopo la procedura cfDNA Extraction (Estrazione di cfDNA), caricare le punte contate sul portapunte nel modo seguente.

Dimensione del batch del campione	Dispositivo	Monitoraggio	Item	Posizione sito
48, 96	Punta	49-54	Punte da 1.000 µl	1
			Punte da 300 µl	2
			Punte da 50 µl	3

- 10 Inserire la posizione della prima punta per ciascun rack delle punte, quindi fare clic su OK.
- 11 Confermare che siano stati assegnati i codici a barre e caricare le piastre (codice a barre rivolto verso destra) sul portapiastre nel modo seguente, quindi fare clic su OK.

Dimensione del batch del campione	Dispositivo utilizzato	Monitoraggio	Item	Posizione sito
48, 96	Multiflex	19-24	Piastra cfDNA Elution (Eluizione di cfDNA) - dotata di codice a barre	1
			Piastra DNA Adapter (Adattatore DNA) - dotata di codice a barre	2
			Nuova piastra fully skirted, librerie a 96 campioni - dotata di codice a barre	3
			Nuove piastre fully skirted da 96 pozzetti	4, 5

12 Caricare il portapietra a pozzetti profondi nel modo seguente, quindi fare clic su OK.

Dimensione del batch del campione	Dispositivo utilizzato	Monitoraggio	Item	Posizione sito
48, 96	Pozzetto profondo	39–44	50 ml di EtOH all'80% in un serbatoio con pozzetti profondi	1
			Nuove piastre fully skirted da 96 pozzetti	2, 3, 4, 5

13 Caricare le provette di reagente sul portareagenti nel modo seguente, quindi fare clic su OK.

Dimensione del batch del campione	Dispositivo utilizzato	Monitoraggio	Item	Posizione sito
48, 96	Reagente	47	2,5 ml di End Repair Mix (Miscela riparazione finale)	1
			A-Tailing Mix (Miscela A-tailing) preparata (volume totale)	2
			Ligation Mix (Miscela di ligazione) preparata (volume totale)	3
			10 ml di Sample Purification Beads (Microsfere purificazione campione)	4
			12 ml di Hybridization Buffer (Tampone di ibridazione)	5

- 14 Assicurarsi che i dispositivi di trasporto, le apparecchiature di laboratorio e i reagenti siano caricati come indicato, quindi fare clic su OK nella schermata Library Deck Verification (Verifica del piano libreria).
- 15 Attendere il completamento della verifica automatica del volume di reagente.
- 16 Osservare ML STAR mentre esegue le fasi automatizzate.
- 17 Quando suggerito da Workflow Manager, assicurarsi che il piano di caricamento di ML STAR non presenti ostruzioni in modo da permettere a ML STAR di scaricare i dispositivi di trasporto, quindi fare clic su Unload (Scarica) per scaricare il piano.
- 18 Ispezionare visivamente la piastra Libraries (Librerie) per verificare che i volumi contenuti in ciascun pozzetto siano coerenti.
- 19 Sigillare e tenere la piastra Library (Libreria).
- 20 Scaricare tutti i dispositivi di trasporto, pulire il piano, quindi fare clic su OK.
- 21 Inserire i commenti sui pozzetti interessati, quindi fare clic su OK.
- 22 Eseguire una delle seguenti operazioni:
 - Per passare a Quantify Libraries (Quantificazione delle librerie), fare clic su Yes (Sì).
 - Per fermarsi, fare clic su Exit (Esci).



NOTA

Passare immediatamente alla quantificazione a meno che non si desideri conservare le librerie a un punto di arresto sicuro.

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Nel caso si esegua un arresto, sigillare la piastra Libraries (Librerie) prima della conservazione. La piastra Libraries (Librerie) è stabile per un massimo di sette giorni di conservazione complessiva a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C.

Quantificazione delle librerie

Preparazione

1 Preparare i seguenti reagenti:

Item	Conservazione	Istruzioni
DNA Quantification Reagent (Reagente di quantificazione del DNA)	tra 2 °C e 8 °C	Proteggere dalla luce. Scongelare a temperatura ambiente. Utilizzare un vortex per miscelare, quindi centrifugare brevemente.
DNA Quantification Standard (Standard di quantificazione del DNA)	tra 2 °C e 8 °C	Utilizzare un vortex per miscelare, quindi centrifugare brevemente.
La piastra Libraries (Librerie) da <i>Preparazione delle librerie</i> a pagina 19	tra -25 °C e -15 °C	Se precedentemente conservata, confermare che la piastra non sia stata conservata per più di sette giorni e scongelarla a temperatura ambiente. Utilizzare un vortex per miscelare. Centrifugare a 1.000 x g per 20 secondi.
Resuspension Buffer (Tampone risospensione)	tra 2 °C e 8 °C	Utilizzare un vortex per miscelare.

- 2 Prima dell'uso accendere il fluorimetro per dieci minuti.
- 3 Applicare un codice a barre della piastra a una nuova piastra da 384 pozzetti.
- 4 Applicare un codice a barre della piastra a una nuova piastra fully skirted.

Procedura

- 1 Fare clic su OK per avviare la quantificazione. Se VeriSeq NIPT Method non è ancora aperto:
 - a Aprire AppLauncher e fare clic su VeriSeq NIPT Method (Metodo VeriSeq NIPT).
 - b Inserire Batch ID (ID batch) e il nome utente, quindi fare clic su OK.
- 2 Eseguire la scansione dei codici a barre di Accessory Box (Scatola accessori).
- 3 Inserire il nome utente o le iniziali dell'utente che ha preparato i reagenti, quindi fare clic su OK.
- 4 Caricare le punte sul portapunte nel modo seguente, quindi fare clic su OK.

Dimensione del batch del campione	Dispositivo utilizzato	Monitoraggio	Item	Posizione sito
48	Punta	1-6	Rack punte da 300 µl	1
			Rack punte da 50 µl	2
96	Punta	1-6	Rack punte da 300 µl	1
			Rack punte da 50 µl	2, 3

- 5 Confermare che siano stati assegnati i codici a barre, togliere il sigillo dalla piastra Libraries (Librerie) e caricare le piastre (codice a barre rivolto verso destra) sul portaMultiflex nel modo seguente, quindi fare clic su OK.

Dimensione del batch del campione	Dispositivo utilizzato	Monitoraggio	Item	Posizione sito
48, 96	Multiflex	19-24	Nuove piastre fully skirted - dotate di codice a barre	1
			Nuova piastra da 384 pozzetti - dotata di codice a barre	2
			Piastra Libraries (Librerie) - dotata di codici a barre	3
			Nuove piastre fully skirted da 96 pozzetti	4, 5

- 6 Caricare le provette di reagente senza tappi sul portaprovette nel modo seguente, quindi fare clic su OK.

Dimensione del batch del campione	Dispositivo utilizzato	Monitoraggio	Item	Posizione sito
48, 96	Provetta	46	DNA Quantification Standard (Standard di quantificazione del DNA)	1
			DNA Quantification Reagent (Reagente di quantificazione del DNA)	2

- 7 Caricare le provette di reagente sul portareagenti nel modo seguente, quindi fare clic su OK.

Dimensione del batch del campione	Dispositivo utilizzato	Monitoraggio	Item	Posizione sito
48, 96	Reagente	47	Nuove provette di reagente	1
			16 ml di Resuspension Buffer (Tampone risospensione)	2

- 8 Se il protocollo è stato interrotto dall'utente dopo la procedura Library Preparation (Preparazione della libreria), caricare le punte contate sul portapunte nel modo seguente.

Dimensione del batch del campione	Dispositivo	Monitoraggio	Item	Posizione sito
48, 96	Punta	49-54	Punte da 1.000 µl	1
			Punte da 300 µl	2
			Punte da 50 µl	3

- 9 Inserire la posizione della prima e dell'ultima punta per ciascun rack delle punte, quindi fare clic su OK.
- 10 Assicurarsi che i dispositivi di trasporto, le apparecchiature di laboratorio e i reagenti siano caricati come indicato, quindi fare clic su OK nella schermata Quant Deck Verification (Verifica del piano di quantificazione).
- 11 Attendere il completamento della verifica automatica del volume di reagente.
- 12 Osservare ML STAR mentre esegue le fasi automatizzate.
- 13 Quando suggerito da Workflow Manager, assicurarsi che il piano di caricamento di ML STAR non presenti ostruzioni in modo da permettere a ML STAR di scaricare i dispositivi di trasporto, quindi fare clic su Unload (Scarica) per scaricare il piano.
- 14 Scaricare la piastra Libraries (Librerie).
- Ispezionare visivamente la piastra per verificare che i volumi contenuti in ciascun pozzetto siano coerenti.
 - Sigillare la piastra Libraries (Librerie) e conservare a temperatura ambiente fino al completamento dell'analisi dei dati del fluorimetro.
- 15 Scaricare le rimanenti piastre a 96 pozzetti e ispezionare visivamente per assicurarsi che i volumi contenuti in ciascun pozzetto siano coerenti. Evidenti errori nel volume potrebbero indicare un problema con le fasi di pipettamento.
- 16 Caricare la piastra a 384 pozzetti e ispezionare visivamente la presenza di liquido negli appropriati pozzetti.
- Sigillare la piastra con un sigillo.
 - Centrifugare a 1.000 × g per 20 secondi.
 - Incubare a temperatura ambiente per 10 minuti, al riparo dalla luce.
- 17 Scaricare tutti i dispositivi di trasporto e pulire il piano di ML STAR, quindi fare clic su OK.
- 18 Dopo l'incubazione, rimuovere il sigillo e caricare la piastra a 384 pozzetti sul lettore per micropiastre. Assicurarsi che A1 si trovi nell'angolo superiore sinistro, quindi fare clic su Read (Leggi).

19 Esportare i dati in formato XML nel modo seguente:

- a Fare clic con il pulsante destro del mouse su Barcode (Codice a barre), selezionare rinomina, eseguire la scansione del codice a barre della piastra Quantification (Quantificazione), quindi fare clic su OK.
- b Nell'angolo superiore sinistro, fare clic sull'icona della piastra, quindi selezionare Export (Esporta) dal menu.
- c Selezionare la casella di controllo Expt1 (Esp. 1), impostare il formato dell'output su XML, quindi fare clic su OK.
- d Impostare il percorso del file degli output e il nome del file, quindi fare clic su Save (Salva).



NOTA

Assicurarsi che la posizione del file sia accessibile dal computer di Hamilton. Non utilizzare spazi nel nome del file o nel percorso del file.

Analisi

- 1 Su ML STAR, nella schermata Scanner Information (Informazioni scanner), inserire l'ID del fluorimetro.
- 2 Inserire i commenti sulla corsa del fluorimetro, quindi fare clic su OK.
- 3 Individuare il file di quantificazione .XML che contiene i dati del fluorimetro, quindi fare clic su OK.
- 4 Rivedere i risultati dell'analisi della curva degli standard e della concentrazione del campione, quindi fare clic su OK.
- 5 Se è necessario rielaborare la piastra, fare clic su Rescan (Esegui nuovamente la scansione).



NOTA

I campioni sono sensibili al tempo e alla luce. Quando necessario, eseguire immediatamente Rescan (Esegui nuovamente la scansione).

- 6 Inserire i commenti sui pozzetti interessati, quindi fare clic su OK.
- 7 Valutare i risultati ed elaborare nel modo seguente.
 - ▶ Se i risultati superano la specifica, passare a Pool Libraries (Raggruppamento in pool delle librerie).
 - ▶ Se i risultati non superano la specifica, il sistema interrompe il metodo. Ripetere le procedure di qualificazione iniziando con *Preparazione a pagina 22*.
- 8 Eseguire una delle seguenti operazioni:
 - Per passare a Pool Libraries (Raggruppamento in pool delle librerie), fare clic su Yes (Sì).
 - Per fermarsi, fare clic su Exit (Esci).

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Nel caso si esegua un arresto, sigillare la piastra Libraries (Librerie) prima della conservazione. La piastra Libraries (Librerie) è stabile per un massimo di sette giorni di conservazione complessiva a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C.

Raggruppamento in pool delle librerie

Preparazione

1 Preparare i seguenti reagenti:

Item	Conservazione	Istruzioni
Hybridization Buffer (Tampone di ibridazione)	tra -25 °C e -15 °C	Scongelare a temperatura ambiente. Utilizzare un vortex per miscelare. Dopo l'utilizzo, riportare nello spazio adibito a conservazione.
La piastra delle librerie da <i>Procedura di Procedura a pagina 22.</i>	tra -25 °C e -15 °C	Se precedentemente conservato, scongelare a temperatura ambiente. Centrifugare con un vortex a 1.500 giri/min per un minuto. Centrifugare a 1.000 × g per 20 secondi.

- Etichettare un provetta di raggruppamento in pool vuota con Pool A (Raggruppamento in pool A). Per 96 campioni, etichettare una seconda provetta di raggruppamento in pool vuota con Pool B (Raggruppamento in pool B).
- Salvare il seguente programma di denaturazione sul ciclatore termico con un coperchio riscaldato.
 - ▶ Scegliere l'opzione con coperchio pre-riscaldato e impostare la temperatura su 102 °C.
 - ▶ Impostare il volume di reazione a 50 µl.
 - ▶ Impostare l'intervallo della rampa a 4 °C al secondo.
 - ▶ Incubare a 96 °C per dieci minuti, quindi a 0 °C per cinque secondi.
 - ▶ Mantenere la temperatura a 4 °C.

Procedura

- Posizionare la piastra Libraries (Librerie) sul ciclatore termico preprogrammato ed eseguire il programma di denaturazione.
- Fare clic su OK per avviare il raggruppamento in pool delle librerie . Se VeriSeq NIPT Method non è ancora aperto:
 - a Aprire AppLauncher e fare clic su VeriSeq NIPT Method (Metodo VeriSeq NIPT).
 - b Inserire Batch ID (ID batch) e il nome utente, quindi fare clic su OK.
- Selezionare la concentrazione del raggruppamento in pool, quindi fare clic su OK. La densità cluster target è di 220–260 k/mm². Se necessario, regolare la concentrazione del raggruppamento in pool per ottenere la densità cluster target.
- Quando suggerito da Workflow Manager, eseguire una delle seguenti operazioni:
 - Per caricare un foglio campioni, selezionare il foglio campioni associato con il batch, quindi fare clic su Load (Carica).
 - Per utilizzare i valori predefiniti del sistema per i restanti tipi di campioni o report sui cromosomi sessuali, fare clic su Use Default (Utilizza predefinito) per ogni impostazione.
 Per maggiori informazioni sulla creazione di un foglio campioni, vedere la *Guida di VeriSeq NIPT Assay Software (documento n. 1000000001949)*.
- Fare clic su Start (Avvia) per avviare il timer per la piastra di denaturazione.
- Caricare le punte sul portapunte nel modo seguente.

Dimensione del batch del campione	Dispositivo	Monitoraggio	Item	Posizione sito
48, 96	Punta	7–12	Punte filtro da 50 µl	1

- 7 Caricare la piastra Denatured Library (Libreria denaturata) (codice a barre rivolto verso destra) sul portaMultiflex nel modo seguente, quindi fare clic su OK.

Dimensione del batch del campione	Dispositivo utilizzato	Monitoraggio	Item	Posizione sito
48, 96	Multiflex	19-24	Piastra per le librerie denaturate (dotate di codice a barre)	1

- 8 Caricare le provette del raggruppamento in pool sul portaprovette nel modo seguente, quindi fare clic su OK.

Dimensione del batch del campione	Dispositivo utilizzato	Monitoraggio	Item	Posizione sito
48	Provetta	46	Nuova provetta da 2 ml, Pool A (Raggruppamento in pool A)	1
96	Provetta	46	Nuova provetta da 2 ml, Pool A (Raggruppamento in pool A)	1
			Nuova provetta da 2 ml, Pool B (Raggruppamento in pool B)	2

- 9 Caricare le provette di reagente sul portareagenti nel modo seguente, quindi fare clic su OK.

Dimensione del batch del campione	Dispositivo utilizzato	Monitoraggio	Item	Posizione sito
48	Reagente	47	3 ml di Hybridization Buffer (Tampone di ibridazione)	1
96	Reagente	47	3 ml di Hybridization Buffer (Tampone di ibridazione)	1

- 10 Caricare le punte sul portapunte nel modo seguente.

Dimensione del batch del campione	Dispositivo	Monitoraggio	Item	Posizione sito
48, 96	Punta	49-54	Punte filtro da 1.000 µl	1
			Punte filtro da 300 µl	2
			Punte filtro da 50 µl	3

- 11 Inserire la posizione della prima e dell'ultima punta per ciascun rack delle punte, quindi fare clic su OK.
- 12 Assicurarsi che i dispositivi di trasporto, le apparecchiature di laboratorio e i reagenti siano caricati come indicato, quindi fare clic su OK nella schermata Pooling Deck Verification (Verifica del piano raggruppamento in pool).
- 13 Osservare ML STAR mentre esegue le fasi automatizzate.
- 14 Quando suggerito da Workflow Manager, assicurarsi che il piano di caricamento di ML STAR non presenti ostruzioni in modo da permettere a ML STAR di scaricare i dispositivi di trasporto, quindi fare clic su Unload (Scarica) per scaricare il piano.
- 15 Scaricare il portaprovette. Tappare ciascuna provetta di raggruppamento in pool, utilizzare un vortex, quindi centrifugare brevemente.
- 16 Sequenziare le librerie il prima possibile dopo il raggruppamento in pool. Conservare la piastra Libraries (Librerie) a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di sette giorni per permettere un nuovo raggruppamento, se necessario. La piastra Libraries (Librerie) è stabile per un massimo di sette giorni di conservazione complessiva a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C.
- 17 Fare clic su OK.
- 18 Inserire i commenti sui pozzetti interessati, quindi fare clic su OK.
- 19 Fare clic su OK nella schermata Pooling Complete (Raggruppamento in pool completato).

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Nel caso si esegua un arresto, tappare le provette di raggruppamento e conservare a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di sette giorni.

Preparazione del raggruppamento in pool per il sequenziamento

Preparazione

1 Preparare i seguenti reagenti:

Item	Conservazione	Istruzioni
Provette raggruppamento	tra -25 °C e -15 °C	Se precedentemente conservato, scongelare a temperatura ambiente. Agitare brevemente con un vortex. Centrifugare brevemente.

2 Preparare il sistema di sequenziamento di nuova generazione con le seguenti impostazioni:

- Corsa paired-end con letture da 36 x 36 cicli.
- Doppia indicizzazione con letture indici da otto cicli.
- Run Name (Nome corsa) è lo stesso di Pool Name (Nome raggruppamento in pool).



NOTA

Le configurazioni errate della corsa sono rifiutate dal software di analisi e potrebbero richiedere il risequenziamento.

La seguente procedura descrive il corretto caricamento delle librerie raggruppate su uno strumento di sequenziamento di nuova generazione basato su cartuccia.

Procedura

- Aggiungere il tampone e il raggruppamento della libreria direttamente nella cartuccia campioni del sequenziatore nel modo seguente.
 - ▶ 900 µl di Hybridization Buffer (Tampone di ibridazione)
 - ▶ 450 µl di Pool A (Raggruppamento A)
 - ▶ Pipettare per miscelare
- Procedere con il sequenziamento utilizzando un sistema di sequenziamento di nuova generazione in base alle istruzioni del fabbricante.
- Quando richiesto, confermare la corretta configurazione della corsa.
- Se necessario, ripetere la procedura per Pool B (Raggruppamento B).

Analisi dei dati di sequenziamento

Dopo aver completato il sequenziamento, i dati del sequenziamento vengono inviati automaticamente a VeriSeq NIPT Assay Software per l'analisi e la generazione di report. Il report include le classificazioni per ciascun campione nel batch come anche una valutazione di tutte le metriche di controllo qualità. Il processo di analisi dal completamento del sequenziamento ai risultati finali impiega circa quattro ore per un batch di 48 campioni. Per informazioni dettagliate sull'analisi dei dati e sui file di output, vedere la *Guida di VeriSeq NIPT Solution Software (documento n. 1000000001949)*.

Interpretazione dei risultati

VeriSeq NIPT Solution utilizza un algoritmo basato su diversi input di dati, inclusi copertura del sequenziamento, qualità delle letture di sequenziamento e frazione fetale stimata, per determinare la rappresentazione cromosomica fetale.

VeriSeq NIPT Assay Software genera automaticamente un risultato ANEUPLOIDY DETECTED (Aneuploidia rilevata) oppure NO ANEUPLOIDY DETECTED (Nessuna aneuploidia rilevata) per i cromosomi 21, 18 e 13 per ciascun campione della paziente. Un risultato ANEUPLOIDY DETECTED (Aneuploidia rilevata) indica che il campione è risultato positivo alla trisomia di un dato cromosoma.

I risultati dello stato del cromosoma sessuale fetale vengono generati automaticamente e facoltativamente riportati. Quando non viene rilevata alcuna aneuploidia del cromosoma sessuale il report indicherà NO ANEUPLOIDY DETECTED (Nessuna aneuploidia rilevata) assieme alla classificazione sessuale: XX (campione fetale femminile) o XY (campione fetale maschile). Le aneuploidie dei cromosomi sessuali sono riportate come ANEUPLOIDY DETECTED (Aneuploidia rilevata) assieme al rilevamento dell'aneuploidia rilevata: XXX, XXY, XYY o XO (monosomia X). In casi rari, i valori per il cromosoma sessuale non rientrano nell'intervallo riportabile e il sistema genera un risultato SEX CHROMOSOMES NOT REPORTABLE (Cromosomi sessuali non riportabili). Per questi campioni potrebbero comunque essere riportati i risultati per un'aneuploidia autosomica.

VeriSeq NIPT Assay Software utilizza le statistiche generate durante il sequenziamento per fornire una stima della frazione fetale (Fetal Fraction Estimation, FFE) per ciascun campione. Il valore FFE rappresenta il componente di cfDNA fetale stimato ottenuto dal saggio e riportato come percentuale arrotondata per ciascun campione. La deviazione media standard di questa stima su tutti i campioni è dell'1,3%. Il valore FFE non deve essere utilizzato nell'isolamento per escludere i campioni quando vengono riportati i risultati.

Per identificare la rappresentazione cromosomica, VeriSeq NIPT Assay Software utilizza il test di sicurezza fetale delle aneuploidie individuale (individualized Fetal Aneuploidy Confidence Test, iFACT), una metrica di soglia dinamica che indica se il sistema ha generato una copertura di sequenziamento sufficiente, considerando la stima di frazione fetale per ciascun campione. Il sistema esegue le identificazioni della rappresentazione cromosomica solo se un campione corrisponde alla soglia iFACT. Se un campione non raggiunge questa soglia, la valutazione del controllo qualità visualizza FAILED iFACT (iFACT non riuscito) e il sistema non genera risultati. La valutazione iFACT viene applicata a tutti i campioni.

Oltre a iFACT, VeriSeq NIPT Assay Software valuta diverse altre metriche di controllo qualità durante l'analisi. Le metriche aggiuntive includono le valutazioni sull'uniformità di copertura delle regioni del genoma di riferimento (DATA OUTSIDE OF EXPECTED RANGE - Dati al di fuori dell'intervallo previsto) e la distribuzione di frammenti di cfDNA relativamente alle lunghezze (FRAGMENT SIZE DISTRIBUTION OUTSIDE OF EXPECTED RANGE - Distribuzione dei frammenti relativamente a dimensioni oltre l'intervallo previsto). La valutazione del controllo qualità visualizza un indicatore di controllo qualità o un mancato superamento del controllo qualità per qualsiasi metrica che non rientra nell'intervallo accettabile. In caso di mancato superamento del controllo qualità, il sistema non genera un risultato per il campione. Se un campione non supera il controllo qualità, può essere elaborata una seconda aliquota di plasma, sempre che sia disponibile plasma sufficiente nella provetta di raccolta del sangue.



ATTENZIONE

Verificare le stime della frazione fetale di tutti i campioni. Se le stime della frazione fetale sono simili per tutti i campioni di una corsa, è possibile che i campioni si siano amalgamati e questo può incidere sui risultati. Per ricevere aiuto nella risoluzione dei problemi, contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.

Caratteristiche delle prestazioni

I seguenti dati descritti nelle sezioni relative alle prestazioni cliniche e alle prestazioni analitiche sono stati generati utilizzando i protocolli e i materiali descritti nelle *Istruzioni per l'uso* a partire dal plasma. Tutti i dati di sequenziamento per questa sezione sono stati generati sul sistema di sequenziamento NextSeq 500/550 Illumina con le seguenti configurazioni:

- NextSeq Control Software v2.1.0.31
- Kit di reagenti di sequenziamento NextSeq 500/550 High Output Kit v2 (75 cicli)
- Corsa di sequenziamento paired-end da 2 x 36 in modalità ad output elevato

Studio clinico

L'accuratezza clinica di VeriSeq NIPT Solution rispetto agli esiti determinati da una valutazione clinica di riferimento standard è stata dimostrata mediante la valutazione dei campioni di plasma ottenuti da donne con gravidanza singola che si sono sottoposte a screening prenatale per identificare eventuali aneuploidie cromosomiche fetali. I campioni sono stati ottenuti da campioni di plasma conservati e anonimi, che erano stati precedentemente elaborati da campioni di sangue intero periferico.

È stato testato un totale di 3.107 campioni. Di questi campioni, 21 campioni (0,68%, 21/3.107) non hanno superato il controllo qualità del saggio in base all'effetto di primo passaggio (first pass) durante l'analisi dei dati di sequenziamento completati:

- ▶ 11 non hanno superato iFACT
- ▶ 8 presentavano dati al di fuori dell'intervallo previsto
- ▶ 2 presentavano una distribuzione della dimensione del frammento al di fuori dell'intervallo previsto.

Demografia e caratteristiche della gravidanza

L'età della madre, l'etnia, l'età gestazionale e il trimestre della gravidanza sono riassunti nella [Tabella 7](#).

Tabella 7 Demografia e caratteristiche della gravidanza

	(N=3.086)
Età materna - anni	
Media	36,8
Deviazione standard	3,6
Mediana	36,7
25° percentile, 75° percentile	35,3, 38,8
Minimo, massimo	18,2, 51,6
Razza/etnia - n (%)^a	
Bianco o caucasico	981 (32%)
Nero o afroamericano	231 (7%)
Ispanico o latino	1.079 (35%)
Asiatico	706 (23%)
Nativo americano	4 (0,1%)
Multipla	58 (2%)
Sconosciuto ^b	27 (1%)
Età gestazionale al prelievo di sangue - settimane	
Media	12,2
Deviazione standard	2,8
Mediana	11
25° percentile, 75° percentile	10, 13
Minimo, massimo	10, 25
Trimestre della gravidanza - n (%)	
Primo (< 14 settimane)	2.520 (82%)
Secondo	566 (18%)
Terzo (≥ 27 settimane)	0 (0%)

^a Questa sperimentazione è stata eseguita negli Stati Uniti.

^b Riportata come "sconosciuta".

Prestazioni cliniche nelle gravidanze singole

Tutti i campioni dello studio presentano esiti clinici dei riferimenti standard ("verità" clinica) in relazione allo stato di aneuploidia e sono stati basati su una valutazione, da parte di un medico o consulente genetico, dei risultati del test citogenetico o dell'esame fisico del neonato. I campioni erano eleggibili per l'analisi se i risultati clinici erano stati registrati per lo stato di aneuploidia fetale dei cromosomi 21, 18, 13 o esiti di sesso fetale incluse le aneuploidie cromosomiche sessuali (Sex Chromosome Aneuploidy, SCA) fetali (monosomia X, XXX, XXY o XYY). All'interno del set di campioni, 3.057 campioni presentavano dati clinici di riferimento per aneuploidie autosomiche e 3.082 presentavano dati clinici di riferimento per SCA. I risultati identificati dal saggio VeriSeq NIPT Solution sono stati confrontati con gli esiti clinici dei riferimenti standard.

Tabulazione incrociata del risultato ottenuto mediante VeriSeq NIPT Solution rispetto agli esiti clinici dei riferimenti standard per la trisomia 21, la trisomia 18 e la trisomia 13

Viene fornita una tabulazione incrociata dei risultati ottenuti mediante VeriSeq NIPT Solution (righe) rispetto agli esiti clinici dei riferimenti standard (colonne) in una serie di tabelle 2 x 2. Non si sono verificati episodi di identificazione incrociata tra le aneuploidie autosomiche (ad es, VeriSeq NIPT Solution non ha rilevato la trisomia 18 in un campione che presentava un risultato affetto da trisomia 21).

Tabella 8 Tabulazione incrociata dei risultati per la trisomia 21

Risultato di VeriSeq NIPT Solution	Riferimento clinico Risultato standard ^a		Totale
	Affetto da trisomia 21	Non affetto da trisomia 21	
Rilevata aneuploidia per il cromosoma 21	90	1	91
Nessuna aneuploidia rilevata per il cromosoma 21	1	2.965	2.966
Totale	91	2.966	3.057

^a La valutazione del riferimento clinico standard è stata eseguita mediante test citogenetici o esame fisico del neonato.

Tabella 9 Tabulazione incrociata dei risultati per la trisomia 18

Risultato di VeriSeq NIPT Solution	Riferimento clinico Risultato standard ^a		Totale
	Affetto da trisomia 18	Non affetto da trisomia 18	
Rilevata aneuploidia per il cromosoma 18	18	3	21
Nessuna aneuploidia rilevata per il cromosoma 18	2	3.034	3.036
Totale	20	3.037	3.057

^a La valutazione del riferimento clinico standard è stata eseguita mediante test citogenetici o esame fisico del neonato.

Tabella 10 Tabulazione incrociata dei risultati per la trisomia 13

Risultato di VeriSeq NIPT Solution	Riferimento clinico Risultato standard ^a		Totale
	Affetto da trisomia 13	Non affetto da trisomia 13	
Rilevata aneuploidia per il cromosoma 13	8	4	12
Nessuna aneuploidia rilevata per il cromosoma 13	0	3.045	3.045
Totale	8	3.049	3.057

^a La valutazione del riferimento clinico standard è stata eseguita mediante test citogenetici o esame fisico del neonato.

Sensibilità e specificità di VeriSeq NIPT Solution per il rilevamento delle trisomie 21, 18 e 13

Tabella 11 Sensibilità e specificità di VeriSeq NIPT Solution per il rilevamento delle trisomie 21, 18 e 13

	Trisomia 21	Trisomia 18	Trisomia 13
Sensibilità	98,9% (90/91)	90,0% (18/20)	100,0% (8/8)
IC bilaterale al 95% ^a	(94,0%,99,8%)	(69,9%,97,2%)	(67,6%,100,0%)
Specificità	> 99,9% (2.965/2.966)	99,9% (3.034/3.037)	99,9% (3.045/3.049)
IC bilaterale al 95% ^a	(99,8%,100,0%)	(99,7%,100,0%)	(99,7%,99,9%)

^a IC basato sul metodo del punteggio di Wilson.

Sensibilità e specificità di VeriSeq NIPT Solution in campioni con stima della frazione fetale di $\leq 4\%$ e $> 4\%$. I campioni nelle analisi delle prestazioni presentano frazioni fetali stimate comprese tra $< 1\%$ e 30% . Il rilevamento delle aneuploidie fetali da cfDNA materno dipende, in parte, dalla frazione fetale per ciascun campione, pertanto le prestazioni del saggio potrebbero diminuire a frazioni fetali inferiori. Alcune metodologie NIPT impiegano un valore di cut-off rigoroso di frazione fetale^{9,10,11,12}, con 4% considerato come il livello inferiore di rilevamento.^{9,10,11} Le tabelle seguenti mostrano le prestazioni di VeriSeq NIPT Solution alla stima della frazione fetale inferiore o pari al 4% e superiore al 4% . I risultati dello studio clinico dimostrano che VeriSeq NIPT Solution è in grado di rilevare aneuploidie fetali a frazioni fetali del 4% o inferiori.

Tabella 12 Sensibilità e specificità nei campioni con stima della frazione fetale $\leq 4\%$

	Trisomia 21	Trisomia 18	Trisomia 13
Sensibilità	90,9% (10/11)	80,0% (4/5)	N/A (0/0)
IC bilaterale al 95%*	(62,3%, 98,4%)	(37,6%, 96,4%)	N/A
Specificità	99,7% (329/330)	100,0% (336/336)	99,7% (340/341)
IC bilaterale al 95%*	(98,3%, 99,9%)	(98,9%, 100%)	(98,4%, 99,9%)

* IC basato sul metodo del punteggio di Wilson

Tabella 13 Sensibilità e specificità nei campioni con stima della frazione fetale $> 4\%$

	Trisomia 21	Trisomia 18	Trisomia 13
Sensibilità	100,0% (80/80)	93,3% (14/15)	100% (8/8)
IC bilaterale al 95%*	(95,4%,100,0%)	(70,2%,98,8%)	(67,6%,100,0%)
Specificità	100,0% (2.636/2.636)	99,9% (2.698/2.701)	99,9% (2.705/2.708)
IC bilaterale al 95%*	(99,9%,100,0%)	(99,7%,100%)	(99,7%,100%)

* IC basato sul metodo del punteggio di Wilson

Rilevamento delle aneuploidie cromosomiche sessuali

I risultati dei cromosomi sessuali ottenuti da VeriSeq NIPT Solution sono stati confrontati con gli esiti clinici dei riferimenti standard e sono stati riassunti nella tabella seguente. La percentuale di concordanza è stata calcolata per ogni cromosoma sessuale in ciascun esito clinico del riferimento standard [classificazione]. La percentuale di concordanza è stata calcolata come il numero di campioni nei quali l'identificazione del cromosoma sessuale mediante VeriSeq NIPT Solution corrispondeva alla classificazione dei riferimenti clinici standard, diviso per il numero totale dei campioni con la stessa classificazione dei riferimenti clinici standard.

Tabella 14 Percentuale di concordanza per la classificazione sessuale fetale

Risultati VeriSeq NIPT Solution per la classificazione sessuale fetale	Esiti clinici dei riferimenti standard								
	Esito dell'esame fisico del neonato [nessun risultato citogenetico]		Risultati citogenetici						
	Femmina	Maschio	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY	Altro ^a
Percentuale concordante	99,9% (1.371/1.373)	99,9% (1.420/1.422)	97,4% (147/151)	100,0% (118/118)	100,0% (6/6)	80,0% (4/5)	100,0% (5/5)	100,0% (1/1)	Non applicabile

^a 1 campione è stato classificato 49, XXXXY da VeriSeq NIPT Solution come Sex chromosome not reportable (Cromosoma sessuale non riportabile)

Il valore predittivo positivo e il valore predittivo negativo di VeriSeq NIPT Solution per il rilevamento delle trisomie 21, 18 e 13 per un intervallo di prevalenze

Il valore predittivo positivo (Positive Predictive Value, PPV) e il valore predittivo negativo (Negative Predictive Value, NPV) del test forniscono informazioni relative alla capacità del test di fornire informazioni su eventuali decisioni cliniche in base alla sensibilità e alla specificità del test, nonché di pretestare la probabilità che un feto sia affetto da trisomia (prevalenza). Poiché i valori PPV e NPV dipendono dalla prevalenza e la prevalenza per queste aneuploidie potrebbe variare su diverse popolazioni target, i valori PPV e NPV sono stati calcolati in base alla sensibilità e alla specificità osservate identificate negli studi di accuratezza clinica per le trisomie 21, 18 e 13. La tabella seguente riepiloga i valori PPV e NPV per un intervallo di valori di prevalenza plausibili.

Tabella 15 Valore predittivo positivo e valore predittivo negativo di VeriSeq NIPT Solution per il rilevamento delle trisomie 21, 18 e 13 per un intervallo di prevalenze

Aneuploidia	Prevalenza	PPV	NPV
Trisomia 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%
Trisomia 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%
Trisomia 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 = valore predittivo negativo, PPV = valore predittivo positivo

Prestazioni nelle gravidanze gemellari

Prestazioni cliniche

A causa della prevalenza, per gli studi clinici erano disponibili solo un piccolo numero di campioni gemellari. Sono stati testati quattro campioni gemellari con trisomia 21 e sono stati tutti correttamente rilevati per la presenza della trisomia 21 come anche per l'assenza di qualsiasi altra anomalia. Tuttavia, poiché il numero di campioni gemellari era troppo basso, i livelli di affidabilità per la sensibilità e per la specificità sarebbero troppo ampi per l'uso pratico. Perciò, questi campioni non sono stati inclusi nei calcoli delle prestazioni complessive riportati nella [Tabella 11](#).

Stima delle prestazioni per le trisomie 21, 18 e 13

Per ottenere un calcolo più accurato delle prestazioni di VeriSeq NIPT Solution nelle gravidanze gemellari, sono stati utilizzati modelli *in silico* basati su osservazioni ottenute da campioni clinici per simulare le popolazioni delle gravidanze gemellari coerenti con la popolazione prevista per l'uso. La distribuzione della frazione fetale è stata determinata da circa 4.500 campioni gemellari e confrontati con la distribuzione di circa 120.000 campioni singoli. La distribuzione della frazione fetale condizionata dallo stato dell'aneuploidia è stata determinata da identificazioni singole putative (1.004 trisomia 21, 312 trisomia 18 e 197 trisomia 13). La combinazione delle due distribuzioni ha consentito il rilevamento delle interferenze dell'aneuploidia nei gemelli. Al fine di stimare la sensibilità, sono stati simulati set gemellari dizigotici e monozigotici ed è stata utilizzata una media pesata che rappresenta la loro prevalenza nella popolazione prevista per l'uso (2 dizigotico: 1 monozigotico). Per la specificità, sono stati simulati set gemellari non affetti.

La frazione di ciascun campione affetto simulato per la trisomia (ossia, la "frazione affetta") è stata calcolata in modo diverso per ciascuna categoria di campione:

- Per i campioni gemellari monozigotici, la frazione affetta di ciascun campione è stata impostata su 1,0 perché, in questo caso, la trisomia riguarda entrambi i gemelli.
- Per i campioni gemellari dizigotici, si è partiti dal presupposto che solo un gemello era affetto (avere entrambi i gemelli dizigotici affetti è estremamente raro). Sono stati simulati i valori delle frazioni affette utilizzando la distribuzione nota dei rapporti delle frazioni fetali come determinata dai campioni clinici gemellari con sesso discordante. Si è partiti da un approccio conservativo il cui presupposto era che il gemello affetto presentava sempre la frazione fetale più bassa dei due gemelli. È stato applicato un fattore di correzione per le frazioni fetali mediamente più basse nelle gravidanze con trisomia 13 e 18.
- Per i gemelli non affetti, la frazione affetta di ciascun campione era impostata su zero.

Per i gemelli affetti dalla trisomia 18 o 13, la frazione fetale corrispondente alla frazione fetale del campione è stata ridotta proporzionalmente sulla riduzione media nella frazione fetale osservata nei dati clinici nei campioni singoli rispetto a singoli con euploidia per la trisomia 18 o 13.

Sia la frazione fetale complessiva che la frazione affetta di ciascun campione simulato sono state utilizzate per calcolare il punteggio dell'aneuploidia utilizzando l'algoritmo standard di VeriSeq NIPT Solution. È stata calcolata la sensibilità determinando quanto spesso i punteggi dell'aneuploidia per i campioni gemellari affetti simulati era al di sopra del valore di cutoff dell'aneuploidia corrispondente. Analogamente, è stata calcolata la specificità determinando quanto spesso i punteggi dell'aneuploidia per i campioni gemellari non affetti simulati era al di sotto al valore di cutoff dell'aneuploidia corrispondente ([Tabella 16](#)). Il 95% degli intervalli di affidabilità è stato stimato in base al numero di campioni clinici gemellari reali nel set di dati originari, che sono stati classificati come affetti o non affetti per la trisomia rilevante.

Tabella 16 Stime per le trisomie 21, 18 e 13 in una popolazione simulata nelle gravidanze gemellari

	Trisomia 21	Trisomia 18	Trisomia 13
Sensibilità	97,1%	95,8%	95,1%
IC bilaterale al 95%*	(87,9%, 99,2%)	(66,7%, 99,5%)	(67,7%, 99,3%)
Specificità	99,9%	> 99,9%	> 99,9%
IC bilaterale al 95%	(99,7%, 99,9%)	(99,9%, > 99,9%)	(99,9%, 99,9%)

* IC basato sul metodo del punteggio di Wilson

Per la **Tabella 16**, le stime dei punteggi e gli intervalli di affidabilità stimati al 95% per la sensibilità e la specificità di VeriSeq NIPT Solution per il rilevamento delle trisomie 21, 18 e 13 sono stati determinati in base a una popolazione simulata di gravidanze gemellari coerente con la popolazione in uso prevista. Gli intervalli di affidabilità sono stati stimati in base al numero di campioni clinici gemellari che avevano superato il controllo qualità e che erano stati classificati come affetti o non affetti per la trisomia rilevante. Il calcolo della sensibilità presume che due terzi delle gravidanze gemellari affette sono dizigotiche con un gemello affetto, mentre un terzo delle gravidanze gemellari affette sono monozigotiche con entrambi i gemelli affetti.

Le stime elencate nella **Tabella 16** si riferiscono solo alle gravidanze gemellari. A causa della prevalenza ancora inferiore, i dati per le gravidanze di ordine superiore (trigemini o superiore) non erano sufficienti a stabilire i modelli statistici corretti in base ai quali stimare il rilevamento accurato dell'aneuploidia.

Prestazioni analitiche

Precisione

Per valutare la precisione di VeriSeq NIPT Solution, sono stati condotti due studi:

- ▶ Uno studio interno di riproducibilità multicentrico che comprendeva nove corse su tre centri utilizzando tre operatori e un singolo lotto di reagenti
- ▶ Uno studio di precisione condotto all'interno del laboratorio che comprendeva 12 corse presso un singolo centro con due operatori, due sistemi di strumenti e tre lotti di reagenti

È stato creato un raggruppamento con 5% di frazione fetale affetto da trisomia 21 combinando cfDNA estratto da plasma materno da donne in gravidanza (con feto affetto da trisomia 21) e cfDNA estratto da plasma da donne non in gravidanza. Sono stati inoltre testati il cfDNA raggruppato estratto da plasma materno in gravidanze con maschi non affetti (feto XY) e femmine non affette (feto XX). Il test è stato eseguito in dieci giorni per un totale di 21 corse per i due studi combinati.

Dei 903 campioni inclusi nelle analisi sui due studi, si è verificata una concordanza del 100% con 84/84 per la trisomia 21, 399/399 per la classificazione sessuale XX e 420/420 per la classificazione sessuale XY. La distribuzione dei campioni per centro sono stati i seguenti: centro 1: T21 (12), XX (57), XY(60); centro 2: T21 (12), XX (57), XY(60); centro 3: T21 (60), XX (285), XY(300).

Tabella 17 Riproducibilità e precisione tra i laboratori (dati combinati)

Previsto	Tentato	Identificazione osservata				
		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

Contaminazione incrociata

La contaminazione incrociata è stata valutata nel flusso di lavoro di preparazione dei campioni di VeriSeq NIPT Solution. I raggruppamenti in pool di plasma da donne non in gravidanza (XX) e maschi adulti (XY) sono stati testati in un formato con disposizione a scacchiera nella piastra a 96 pozzetti su quattro piastre (N=48 ciascuno per i campioni femminili e maschili per piastra; un totale di 192 campioni femminili e 192 campioni maschili). Nessuno dei campioni femminili ha dimostrato una copertura per il cromosoma Y statisticamente superiore al background stimato, indicando che non era presente una contaminazione incrociata dai campioni maschili nella medesima piastra. Non è stata osservata una contaminazione incrociata rilevabile in VeriSeq NIPT Solution.

Sostanze potenzialmente interferenti

Per valutare l'impatto delle sostanze interferenti su VeriSeq NIPT Solution, le prestazioni del saggio sono state valutate in presenza di potenziali sostanze interferenti.

Albumina, bilirubina, emoglobina e trigliceridi (endogeni) sono stati aggiunti ai raggruppamenti in pool di sangue materno da gravidanze femminili non affette (feto XX) e testati a due concentrazioni per ciascuna sostanza del test (n=16 per ciascuno). Non è stata osservata alcuna interferenza nelle prestazioni del saggio.

Tabella 18 Sostanze potenzialmente interferenti (endogene)

Sostanza del test	Concentrazione bassa del test (mg/ml)	Concentrazione alta del test (mg/ml)
Albumina	35	50
Bilirubina	0,01	0,15
Emoglobina	100	200
Trigliceride	1,5	5

La presenza naturale di DNA genomico materno (Genomic DNA, gDNA) nel plasma può inoltre potenzialmente interferire con le prestazioni del saggio, in quanto può essere estratto assieme a cfDNA fetale. Livelli di DNA genomico a 1,6, 3,3 e 4,9 ng per campione (che corrispondono a 1, 2 e 3 deviazioni standard sopra la media prevista di concentrazione di gDNA dopo sette giorni di conservazione di sangue intero¹³) sono stati aggiunti a cfDNA estratto da plasma materno da gravidanze femminili (feto XX) non affette. I campioni sono stati testati con VeriSeq NIPT Solution (n=16 per ciascuna concentrazione). Non è stata osservata alcuna interferenza nelle prestazioni del saggio in presenza di livelli elevati di gDNA.

Sono state testate venti sostanze potenzialmente interferenti basate su farmaci (esogeni) comunemente utilizzate o prescritte durante la gravidanza per identificare EP7-A2 (Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline-Second Edition - Test delle interferenze nella chimica clinica; Linee guida approvate - seconda edizione). Le 20 sostanze potenzialmente interferenti sono state combinate in quattro raggruppamenti in pool, sono state aggiunte al plasma materno ottenuto da gravidanze femminili non affette (feto XX) e testate con VeriSeq NIPT Solution (N=16 per ciascun raggruppamento in pool). Non è stata osservata alcuna interferenza nelle prestazioni del saggio in presenza di queste sostanze esogene.

Tabella 19 Sostanze potenzialmente interferenti (esogene)

Raggruppamento in pool 1	Raggruppamento in pool 2	Raggruppamento in pool 3	Raggruppamento in pool 4
Acetaminofene	Difenidramina	Albuterolo	Cetirizina
Acetilcisteina	Eritromicina	Bupropione	Destrometorfano
Bisoprololo	Guaifenesina	Caffeina	Acido ascorbico L
Citalopram	Eparina	Sertralina	Metoprololo
Desloratadina	Lidocaina	Fluoruro di sodio	Nadololo

Risoluzione dei problemi

Risoluzione dei problemi di VeriSeq NIPT Solution

Modalità mancato funzionamento	Risultato possibile	Interpretazione	Intervento raccomandato	Commenti
Input di plasma insufficiente	Controllo qualità del campione non superato	Volume di plasma insufficiente	Eseguire un nuovo prelievo.	In base all'ispezione visiva del volume di plasma.
Provetta di sangue difettosa	Nessuna separazione del sangue in strati	Il campione non è stato centrifugato	Assicurarsi che la centrifuga sia stata avviata e che la provetta sia stata fatta ruotare alla forza corretta. Eseguire un nuovo prelievo.	
		Conservazione o trasporto non appropriato (lisi del campione)	Eseguire un nuovo prelievo.	I campioni congelati non si separeranno.
Ostruzione campione/flusso lento	Contaminazione del plasma	I singoli campioni potrebbero ostruire la piastra di legame se è presente una contaminazione nel campione di plasma	Ispezionare il campione. Se il plasma rimanente nella provetta è rosso o di aspetto lattiginoso, annullare il campione e richiedere un nuovo prelievo. Se l'aspetto del campione è normale, ritestare il campione.	
	Fuoriuscita di campione	Ispezione visiva inadeguata di ogni provetta per controllare se il campione è idoneo	Invalidamento dei campioni nei pozzetti vicini interessati dalla fuoriuscita.	Può indicare l'inadeguatezza del trasporto o della conservazione del campione prima dell'elaborazione. I campioni non idonei devono essere esclusi dall'elaborazione.
	Malfunzionamento dell'hardware	Digestione inadeguata di materiale durante l'estrazione	Ritestare il campione. Se il problema persiste nella posizione del pozzetto con altri campioni, contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.	

Modalità mancato funzionamento	Risultato possibile	Interpretazione	Intervento raccomandato	Commenti
Controllo qualità dell'analisi per i singoli campioni non superato	Controllo qualità del sequenziamento non superato	Input genetico insufficiente OPPURE trasferimento errato durante la gestione del campione	Verificare l'annotazione del campione. Verificare la presenza di prestazioni simili su campioni testati in precedenza nella relativa posizione sulla piastra. Ritestare il campione.	Indica se è presente un input di campione errato o un trasferimento errato su ML STAR. Il materiale genetico insufficiente potrebbe provenire da DNA libero fetale insufficiente nel plasma o DNA cellulare che causa un'eccessiva diluizione del campione per il sequenziamento.
	Bassa frazione fetale (Fetal Fraction, FF) o conteggio di siti non esclusi (Non Excluded Sites, NES)	I dati generati non sono sufficienti per creare un report accurato	Ritestare a partire dal plasma.	
Controllo qualità della quantificazione non superato	Corsa di quantificazione non riuscita - la mediana del batch risultato al di sotto del valore minimo	Insufficiente resa del processo	Ripetere la quantificazione. Se anche la ripetizione non riesce, contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.	Le metriche di superamento della curva degli standard indicano un problema con la preparazione della libreria.
	Corsa di quantificazione non riuscita	La mancata riuscita della curva degli standard è dovuta a una quantificazione errata	Ripetere la quantificazione. Se anche la ripetizione non riesce, contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.	
Raggruppamento in pool non riuscito	Impossibile completare il raggruppamento in pool dei campioni	L'analisi del raggruppamento in pool non è in grado di calcolare il volumi corretti dei raggruppamenti	Valutare nuovamente la concentrazione target del raggruppamento in pool e rielaborare l'analisi del raggruppamento.	

Risoluzione dei problemi di VeriSeq NIPT Microlab STAR

Fase di elaborazione	Codice errore	Finestra di dialogo dell'errore	Descrizione	Risoluzione da parte dell'utente
Creazione del batch	EM0044	The Batch ID entered contains forbidden characters. (L'ID del batch inserito contiene caratteri non permessi.)	VeriSeq NIPT Solution accetta solo numeri, lettere, trattini bassi e trattini per tutti i campi dei dati.	Rinominare il batch utilizzando un nome che non contenga alcun carattere di testo speciale.
Creazione del batch	EM0051	The Batch ID is greater than 26 characters in length. (L'ID del batch contiene più di 26 caratteri.)	VeriSeq NIPT Solution limita la lunghezza dei nomi dei batch a 26 caratteri o meno.	Rinominare il batch utilizzando un nome che contenga meno di 26 caratteri.
Creazione del batch	EM0076	Unable to connect to VeriSeq Onsite Server (Impossibile collegarsi a VeriSeq Onsite Server)	VeriSeq Onsite Server non risponde alla richiesta di dati da parte di Workflow Manager.	Assicurarsi che: 1. ML STAR sia collegato alla rete. 2. VeriSeq Onsite Server sia acceso. 3. ML STAR sia in grado di collegarsi a VeriSeq Onsite Server (mediante richiesta ping). 4. Se i passaggi sopra indicati non risolvono il problema, inviare un'e-mail all'Assistenza Tecnica Illumina.
Creazione del batch	EM0118	This batch has been failed and cannot be further processed. (Questo batch non è riuscito e non può essere ulteriormente elaborato.)	Il batch indicato non è riuscito già in precedenza e non può essere ulteriormente elaborato.	La registrazione del batch su VeriSeq Onsite Server indica che il batch non è riuscito già in precedenza. Non è permessa nessuna ulteriore elaborazione. Creare un altro batch con i campioni prescelti.
Creazione del batch	N/A	This batch has already completed processing. Would you like to repool? (Questo batch ha già completato l'elaborazione. Procedere con la ripetizione del raggruppamento in pool?)	Il batch indicato è stato elaborato mediante il raggruppamento in pool. È possibile solo ripetere il raggruppamento in pool.	Per ripetere il raggruppamento in pool, fare clic su Re-Pool (Ripeti raggruppamento in pool). OPPURE Interrompere il metodo e controllare Batch Name (Nome del batch).
Isolamento del plasma	WP0087	Duplicate sample barcodes loaded. (Sono stati caricati campioni con codici a barre duplicati.)	Campioni con codici a barre identici sono stati caricati sul sistema.	1. Attenersi ai suggerimenti di Workflow Manager per identificare i campioni duplicati. 2. Rimuovere questi campioni ed etichettarli nuovamente o sostituirli. 3. Ricaricare i campioni.

Fase di elaborazione	Codice errore	Finestra di dialogo dell'errore	Descrizione	Risoluzione da parte dell'utente
Isolamento del plasma	EP0102	Samples specified in the Sample Sheet were not loaded. (I campioni indicati nel foglio campioni non sono stati caricati.)	I campioni inclusi nel foglio campioni non sono stati inclusi nei codici a barre caricati.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Attenersi ai suggerimenti di Workflow Manager per identificare i campioni mancanti. 2. Aggiungere i campioni mancanti al batch e ricaricare i campioni. <p>OPPURE</p> <p>Interrompere il metodo, modificare il foglio campioni in base alle esigenze e riavviare il metodo.</p>
Caricamento piastra	N/A	Venus Barcode Mask Error (Errore maschera del codice a barre Venus)	Workflow Manager impone l'associazione di piastra-batch corretti utilizzando le maschere del codice a barre Venus.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Verificare la posizione della piastra e confermare che il layout della piastra sia corretto. 2. Assicurarsi che la piastra caricata sia la piastra corretta per il batch indicato.
Estrazione di cfDNA	WE0150	Pressure in the vacuum chamber is too low. (La pressione nella camera del vuoto è troppo bassa.)	Workflow Manager non procede se la pressione della linea del vuoto a riposo è inferiore a 400 Torr.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Verificare la presenza di ripiegamenti o altre ostruzioni nella linea del vuoto. 2. Aprire le clip di rilascio della linea di scarico, fare fuoriuscire la pressione, chiudere completamente le clip di rilascio della linea. 3. Assicurarsi che il controller del vuoto e la pompa siano accesi. 4. Se il problema persiste, contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.
	WE0153	Pressure in the vacuum chamber is too high. (La pressione nella camera del vuoto è troppo elevata.)	Se la pressione del vuoto misurata è troppo elevata prima di avviare il controllo della pressione, il sistema potrebbe presentare un malfunzionamento.	Nella parte posteriore del controller, assicurarsi che tutte le connessioni e le linee del vuoto siano fissate correttamente.
	WE0996	Vacuum failed to seal. (Impossibile creare la tenuta del vuoto.)	Il sistema non è riuscito a creare una tenuta del vuoto sulla piastra Binding (Legame).	<p>NOTA: non selezionare OK fino alla completa risoluzione del mancato funzionamento del vuoto.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Assicurarsi che la piastra di legame sia livellata rispetto al collettore del vuoto. Indossando un guanto, premere con forza sulla piastra Binding (Legame). 2. Fare clic su OK per continuare con cfDNA Extraction (Estrazione di cfDNA). 3. Se il messaggio di errore viene visualizzato più di tre volte in una corsa, inviare una e-mail all'Assistenza Tecnica Illumina.

Fase di elaborazione	Codice errore	Finestra di dialogo dell'errore	Descrizione	Risoluzione da parte dell'utente
	WM0219	If Vacuum is on, manually rest the pump. (Se il vuoto è acceso, spegnere manualmente la pompa.)	Il vuoto potrebbe rimanere acceso dopo l'interruzione di un metodo durante l'estrazione.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sul controller del vuoto, premere il pulsante di accensione per spegnere il vuoto. 2. Attendere dieci secondi, quindi premere di nuovo il pulsante di accensione per accendere il vuoto.
	EE0477	An error has occurred while moving a plate. (iSWAP error) (Si è verificato un errore durante lo spostamento di una piastra. Errore iSWAP)	Se si è verificato un errore iSWAP (piastra fatta cadere, non è stata presa e così via) il sistema inviterà l'utente a completare manualmente lo spostamento della piastra.	<p>Assicurarsi che la piastra possa essere recuperata (materiale non versato).</p> <ul style="list-style-type: none"> - In caso contrario, interrompere la corsa. - In caso positivo, attenersi alle istruzioni sullo schermo per completare il trasferimento manuale della piastra.
	EE0519	Scanned barcode does not match binding plate barcode on record. (Il codice a barre scansionato non corrisponde al codice a barre registrato per la piastra di legame.)	La piastra Binding (Legame) caricata non corrisponde al codice a barre della piastra rimossa.	Assicurarsi che la piastra caricata corrisponda al codice a barre registrato (vedere il registro della traccia per individuare il codice a barre previsto).
API	EA0372	Unable to connect to the data server. (Impossibile collegarsi al server dei dati).	VeriSeq Onsite Server non risponde alla richiesta di dati da parte di Workflow Manager.	<p>Assicurarsi che:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. ML STAR sia collegato alla rete. 2. ML STAR sia in grado di collegarsi a VeriSeq Onsite Server (mediante richiesta ping). 3. VeriSeq Onsite Server sia acceso.
	EA0774	Connection Error The API server connection failed to validate. (Errore di connessione. La connessione al server di dati API non è stata convalidata.)	VeriSeq Onsite Server non risponde più alla richiesta di dati da parte di Workflow Manager.	<p>Assicurarsi che:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. ML STAR sia collegato alla rete. 2. ML STAR sia in grado di collegarsi a VeriSeq Onsite Server (mediante richiesta ping). 3. VeriSeq Onsite Server sia acceso.
	EA0780	403: Invalid Request The current transaction is not valid. (403: richiesta non valida. L'attuale transazione non è valida.)	I dati inviati violano la logica di flusso di lavoro del sistema.	Per maggiori informazioni, controllare i dettagli dell'errore. Di solito le cause sono input troppo lunghi o che violano l'elenco delle caratteristiche accettabili.

Bibliografia

- 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 Nicolaides 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. Lab. Biochem.* 2013;46: 1561–1565. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2013.06.002.

Brevetti e marchi di fabbrica

Questo documento e il suo contenuto sono di proprietà di Illumina, Inc. e delle aziende ad essa affiliate ("Illumina") e sono destinati esclusivamente ad uso contrattuale da parte dei clienti di Illumina, per quanto concerne l'utilizzo dei prodotti qui descritti, con esclusione di qualsiasi altro scopo. Questo documento e il suo contenuto non possono essere usati o distribuiti per altri scopi e/o in altro modo diffusi, resi pubblici o riprodotti, senza previa approvazione scritta da parte di Illumina. Mediante questo documento, Illumina non trasferisce a terzi alcuna licenza ai sensi dei suoi brevetti, marchi, copyright, o diritti riconosciuti dal diritto consuetudinario, né diritti simili di alcun genere.

Al fine di assicurare un uso sicuro e corretto dei prodotti qui descritti, le istruzioni riportate in questo documento devono essere scrupolosamente ed esplicitamente seguite da personale qualificato e adeguatamente formato. Leggere e comprendere a fondo tutto il contenuto di questo documento prima di usare tali prodotti.

LA LETTURA INCOMPLETA DEL CONTENUTO DEL PRESENTE DOCUMENTO E IL MANCATO RISPETTO DI TUTTE LE ISTRUZIONI IVI CONTENUTE POSSONO CAUSARE DANNI AL/I PRODOTTO/I, LESIONI PERSONALI A UTENTI E TERZI E DANNI MATERIALI E RENDERANNO NULLA QUALSIASI GARANZIA APPLICABILE AL/I PRODOTTO/I.

ILLUMINA NON SI ASSUME ALCUNA RESPONSABILITÀ DERIVANTE DALL'USO IMPROPRIO DEL/DEI PRODOTTO/I QUI DESCRITTI (INCLUSI SOFTWARE O PARTI DI ESSO).

© 2021 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati.

Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari. Per informazioni specifiche sui marchi di fabbrica, visitare la pagina Web www.illumina.com/company/legal.html.

Informazioni di contatto



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 U.S.A.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (fuori dal Nord America)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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



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

Etichettatura del prodotto

Per un riferimento completo dei simboli che si trovano sulla confezione del prodotto e sull'etichettatura, fare riferimento alla legenda dei simboli alla pagina Web support.illumina.com sulla scheda *Documentation and Literature* (Documentazione e letteratura) per il kit in uso.