

Notice d'accompagnement

DESTINÉ AU DIAGNOSTIC IN VITRO UNIQUEMENT

Utilisation prévue

VeriSeq^{MC} NIPT Solution v2 est un test diagnostique *in vitro* conçu pour être utilisé comme un test de dépistage pour détecter les anomalies génétiques fœtales pangénomiques à partir d'échantillons de sang entier périphérique maternel provenant de femmes enceintes d'au moins 10 semaines. VeriSeq NIPT Solution v2 utilise le séquençage pangénomique pour détecter les délétions et les duplications partielles de tous les cas d'autosomie et d'aneuploïdies dans tous les chromosomes. Le test comporte une option permettant de demander le signalement de l'aneuploïdie des chromosomes sexuels (SCA). Un diagnostic ou une décision concernant une grossesse ne doit pas être uniquement fondé sur les résultats obtenus par l'utilisation de ce produit.

VeriSeq NIPT Solution v2 comprend les éléments suivants : le VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 pour le système VeriSeq NIPT Microlab STAR, le VeriSeq NIPT Sample Prep et le VeriSeq Onsite Server v2 avec le logiciel VeriSeq NIPT Assay Software v2. VeriSeq NIPT Solution v2 a été conçu pour être utilisé avec le séquenceur nouvelle génération.

Résumé et explication du test

Les anomalies chromosomiques fœtales, particulièrement l'aneuploïdie, soit un nombre anormal de chromosomes, sont une cause fréquente d'infertilité, d'anomalies congénitales, de retard de développement et de déficiences intellectuelles. L'aneuploïdie touche environ une naissance vivante sur 300, et les fausses couches et les mortinaissances affichent des taux d'aneuploïdie plus élevés que celui-ci^{1,2}. Jusqu'à récemment, il existait deux types de tests prénataux pour ces troubles : les tests diagnostiques ou le dépistage. Les tests diagnostiques comprennent des interventions effractives, comme l'amniocentèse ou l'échantillonnage des villosités chorales. Ces méthodes d'analyse sont considérées comme la norme de référence pour la détection de l'aneuploïdie fœtale. Cependant, ils sont associés à un risque d'interruption de grossesse de l'ordre de 0,11 à 0,22 %³. Les dépistages traditionnels à marqueurs multiples ne comportent aucun risque d'interruption de grossesse puisqu'ils sont non effractifs, mais ils sont moins précis que les tests diagnostiques. Les taux de détection de la trisomie 21 varient de 69 à 96 % selon le dépistage choisi, l'âge maternel et l'âge gestationnel au moment du dépistage⁴. Fait important, ces dépistages ont des taux de faux positifs d'environ 5 %, ce qui peut mener à l'exécution d'un test diagnostique effractif de confirmation et exposer ainsi la grossesse à un risque d'interruption⁴. Les dépistages par ultrasons peuvent aussi permettre de détecter les anomalies chromosomiques, mais ils le font avec encore moins de certitude que ces autres méthodes.

Il est possible de détecter avec un taux d'exactitude élevé les aneuploïdies fœtales pour les chromosomes 21, 18, 13, X et Y au moyen de tests de dépistage prénatal non invasifs (DPNI) grâce au séquençage du génome entier de l'ADN acellulaire tiré du plasma maternel à 10 semaines de grossesse ou plus tard. Une méta-analyse récente de multiples études cliniques a révélé que les taux de détection regroupés pondérés et les spécificités

de la trisomie 21 et de la trisomie 18 dans les grossesses simples étaient les suivants : trisomie 21, 99,7 % et 99,96 % et trisomie 18, 97,9 % et 99,96 %, respectivement⁵. Une étude suggère que l'emploi des tests de DPNI comme un dépistage primaire pour toutes les grossesses pourrait mener à une réduction de 89 % du nombre d'interventions effractives de confirmation⁶.

Étant donné la réduction considérable des taux de faux positifs avec les tests de DPNI comparativement au dépistage traditionnel à marqueurs multiples, de nombreuses organisations professionnelles médicales se sont prononcées favorablement sur plusieurs indications pour employer les tests de DPNI.

Plus particulièrement, l'International Society for Prenatal Diagnosis, l'American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG), la Society for Maternal Fetal Medicine (SMFM), l'American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG), l'European Society of Human Genetics et l'American Society of Human Genetics appuient le fait d'offrir les tests de DPNI à toutes les femmes enceintes^{7,8,9}. La consultation avant un test, le consentement éclairé et les tests diagnostiques pour confirmer un résultat positif d'un dépistage de l'ADN acellulaire sont recommandés⁴.

VeriSeq NIPT Solution v2 est un test diagnostique in vitro (DIV) non effractif qui utilise le séquençage pangénomique sur des fragments d'ADN acellulaire dérivés d'échantillons de sang entier périphérique maternel provenant de femmes enceintes depuis au moins 10 semaines. Le test offre deux options de type de dépistage : dépistage de base ou dépistage au niveau du génome entier. Le dépistage de base fournit des renseignements sur les cas d'aneuploïdie au niveau des chromosomes 21, 18, 13, X et Y uniquement. Les dépistages pangénomiques procurent de l'information sur les délétions et les duplications partielles pour tous les autosomes ainsi que sur les cas d'aneuploïdie pour tous les chromosomes. Les deux types de dépistage offrent la possibilité d'obtenir un rapport sur l'aneuploïdie des chromosomes sexuels (ACS) avec ou sans indication du sexe du fœtus. L'option de signalement de l'ACS peut être désactivée. Si l'option de signalement de l'ACS est désactivée, le sexe du fœtus ne sera pas mentionné non plus. Pour plus de renseignements sur les options de déclaration du sexe, consultez le *Guide du VeriSeq NIPT Solution v2 Software (document n° 1000000067940)*.

Principes procéduraux

VeriSeq NIPT Solution v2 est une solution automatisée pour effectuer des tests DPNI en laboratoire, lesquels regroupent la préparation automatisée d'échantillons et l'analyse des données de séquençage. Les VeriSeq NIPT Sample Prep sont des réactifs spécialisés à usage unique utilisés en combinaison avec le système VeriSeq NIPT Microlab STAR pour préparer des lots de 24, 48 ou 96 échantillons pour le séquençage nouvelle génération. Un logiciel spécialisé, VeriSeq NIPT Assay Software V2, analyse les données sur le génome entier et sur le séquençage à lecture appariée et produit un rapport qui fournit des résultats qualitatifs.

Le flux de travail se compose des étapes suivantes : collecte des échantillons, isolation du plasma, extraction d'ADN acellulaire, préparation de bibliothèques, quantification de bibliothèques, regroupement de bibliothèques, séquençage et analyse. Ces étapes sont décrites plus en détail ci-dessous :

- **Collecte des échantillons** : de 7 à 10 ml de sang entier maternel périphérique sont recueillis dans un tube de prélèvement sanguin pour ADN acellulaire Cell-Free DNA de marque Streck, laquelle prévient la lyse cellulaire et la contamination génomique et stabilise le sang entier à la température ambiante.

- **Isolation de plasma** : dans les 5 jours suivant sa collecte, le plasma est isolé du sang entier périphérique maternel à l'aide de techniques de centrifugation standards. Le système VeriSeq NIPT Microlab STAR aspire le plasma et le verse dans une plaque de 96 puits profonds pour le traitement subséquent. Advenant qu'il soit nécessaire de les retester, les échantillons qui ont été traités peuvent être rebouchés et conservés à 4 °C pendant 5 jours de plus (jusqu'à un total de 10 jours après la collecte de l'échantillon).



ATTENTION

Dépasser les durées d'entreposage mentionnées ci-dessus peut avoir des répercussions négatives sur les taux d'échecs des échantillons individuels.

- **Extraction d'ADN acellulaire** : la purification de l'ADN acellulaire du plasma s'effectue par absorption sur une plaque de fixation, par lavage de la plaque de fixation pour retirer les contaminants et par élution.
- **Préparation de la librairie** : les fragments purifiés d'ADN acellulaire subissent un traitement de réparation des extrémités pour convertir les extrémités 5' et 3' saillantes en extrémités franches. Ensuite, un nucléotide désoxyadénosine est ajouté aux extrémités 3' saillantes pour créer une extrémité saillante d'une seule base. Les adaptateurs indexés qui contiennent une extrémité 3' de désoxythymidine saillante d'une seule base sont ensuite ligaturés aux fragments d'ADN acellulaire traités. L'ADN ligaturé est purifié au moyen des billes d'immobilisation réversible en phase solide. Chaque échantillon d'un ensemble de 24, 48 ou 96 reçoit un adaptateur indexé unique. Les adaptateurs ont deux fonctions :



ATTENTION

Faites preuve d'extrême prudence pour éviter la contamination croisée des index car cela pourrait causer des résultats incorrects.

- Ils permettent d'identifier les échantillons dans le séquençage subséquent.
- Ils contiennent des séquences qui permettent de retenir une librairie sur la surface solide d'une Flow Cell de séquençage pour la génération d'amplifiats et le séquençage subséquent.
- **Quantification de librairies** : la librairie est quantifiée au moyen d'un marqueur fluorescent dont la concentration est déterminée à la suite d'une comparaison à une courbe standard d'ADN.
- **Regroupement et séquençage des librairies** : les échantillons de librairies sont regroupés ensemble dans des regroupements de 24 ou 48 échantillons dans des quantités ajustées pour minimiser la variation dans la couverture. Chaque regroupement est ensuite séquencé à l'aide du système de séquençage nouvelle génération.
- VeriSeq NIPT Solution v2 n'inclut pas l'équipement de séquençage ni les consommables.
- **Analyse** : pour chaque échantillon, l'analyse consiste en ce qui suit :
 - L'identification de fragments de librairies par séquence d'indexage et l'alignement des lectures appariées à un génome de référence humain.
 - Estimation de la fraction foétale de la librairie en combinant des renseignements tirés de la distribution des longueurs et des coordonnées génomiques des fragments de librairies.

- Après avoir tenu compte des biais connus, un modèle statistique détecte les régions du génome qui sont sous ou surreprésentées dans la librairie de façon cohérente avec une anomalie comportant le niveau estimé de fraction fœtale.
- Le rapport de DPNI fournit des résultats sommaires pour le menu de tests sélectionné où l'indication ANOMALY DETECTED (anomalie détectée) ou NO ANOMALY DETECTED (aucune anomalie détectée) est répertoriée ainsi que l'estimation de la fraction fœtale pour les échantillons qui réussissent le CQ.
- Le rapport complémentaire fournit les mesures quantitatives qui caractérisent chacune des anomalies détectées.

Limites de la procédure

Limites du test

- Les preuves qui appuient la sensibilité et la spécificité du test englobent les grossesses simples et gémellaires. Les présentes directives ne fournissent pas de données sur la sensibilité et la spécificité pour les grossesses d'ordre élevé (triplets ou plus).
- VeriSeq NIPT Solution v2 n'a pas été conçue pour détecter les polyploïdies, comme la triploïdie.
- VeriSeq NIPT Solution v2 n'a pas été conçue pour détecter les remaniements chromosomiques équilibrés.
- Le test exige des échantillons de sang entier périphérique maternel de femmes enceintes d'au moins 10 semaines.
- Pour les dépistages de base, le test de VeriSeq NIPT Solution v2 recherche la présence d'anomalies chromosomiques spécifiques. Les résultats NO ANOMALY DETECTED (aucune anomalie détectée) n'éliminent pas la possibilité d'anomalies chromosomiques dans les chromosomes testés. Un résultat négatif n'élimine pas la possibilité que la grossesse ait d'autres anomalies chromosomiques, maladies génétiques ou anomalies congénitales (p. ex., anomalie de la moelle épinière par défaut de soudure).
- Pour les dépistages pangénomiques, des délétions et duplications substantiellement importantes qui touchent moins de 75 % de la taille du chromosome peuvent indiquer une aneuploïdie panchromosomique.
- Pour les dépistages pangénomiques, certaines régions sont exclues de l'analyse. Vous trouverez la liste des régions ignorées sur le site Web de soutien d'Illumina. La détection d'une anomalie génomique est seulement effectuée sur les régions non exclues.
- Le signalement du sexe du fœtus n'est pas disponible dans tous les pays en raison des règlements locaux liés à la déclaration du sexe.
- Sur la base d'éléments de preuve dans la littérature scientifique, les résultats de dépistage au moyen de l'ADN acellulaire peuvent être biaisés par certains facteurs fœtaux et maternels. Ces facteurs comprennent, sans s'y limiter :
 - une transfusion sanguine récente reçue par la mère ;
 - une greffe de cellules souches/greffe d'organe subie par la mère ;

- une maladie auto-immune de la mère ;
- des néoplasmes chez la mère (bénins et malins) ;
- un mosaïcisme maternel ;
- une variation du nombre de copies chez la mère ;
- un mosaïcisme foetoplacentaire/mosaïcisme placentaire confiné ;
- une mort foetale/un jumeau perdu.

Rapports de VeriSeq NIPT Solution v2

- VeriSeq NIPT Solution v2 est un test de dépistage et elle ne devrait pas être prise isolément d'autres résultats cliniques ou de tests. Les conclusions concernant les décisions relatives à l'état du fœtus et la prise en charge de la grossesse ne doivent pas être basées sur les résultats du test de DPNI seulement⁷.
- VeriSeq NIPT Solution v2 crée un rapport sur les éléments suivants :
 - Les tests de dépistage de base permettent d'examiner la surreprésentation des chromosomes 13, 18 et 21.
 - Les tests de dépistage pangénomique permettent d'examiner la sous-représentation et la surreprésentation de tous les autosomes, y compris les délétions et les duplications partielles d'au moins 7 Mb.
 - Dans les grossesses simples, si la valeur Yes (Oui) ou SCA (ACS) est sélectionnée comme option de signalement du sexe, les anomalies aux chromosomes sexuels suivantes sont signalées : XO, XXX, XXY et XYY.
 - Dans les grossesses simples, si la valeur Yes (Oui) ou SCA (ACS) est sélectionnée comme option de signalement du sexe, le sexe du fœtus est rapporté.
 - La présence d'un chromosome Y en cas de grossesses gémellaires.

Composants du produit

VeriSeq NIPT Solution v2 (référence 20030577) comprend les éléments de préparation des échantillons suivants :

- VeriSeq NIPT Sample Prep (24 échantillons) (référence 20025895)
- VeriSeq NIPT Sample Prep (48 échantillons) (référence 15066801)
- VeriSeq NIPT Sample Prep (96 échantillons) (référence 15066802)

VeriSeq NIPT Solution v2 (référence 20030577) comprend les composants logiciels suivants :

- VeriSeq NIPT Assay Software v2 (référence 20047024), préinstallé sur le serveur VeriSeq Onsite Server v2.
 - VeriSeq Onsite Server v2 (référence 20028403 ou 20047000) ou VeriSeq Onsite Server (référence 15076164 ou 20016240) qui est mis à jour à la v2.

- VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 (référence 20044988), préinstallé sur le système VeriSeq NIPT Microlab STAR.
 - VeriSeq NIPT Microlab STAR (référence de la compagnie Hamilton à Reno : 95475-01 (115 V) et 95475-02 (230 V), de la compagnie Hamilton à Bonaduz : 806288).
- Local Run Manager VeriSeq NIPT Module (référence 20044989).

Réactifs

Réactifs fournis

Illumina fournit les réactifs suivants : VeriSeq NIPT Sample Prep (24 échantillons) (référence 20025895), VeriSeq NIPT Sample Prep (48 échantillons) (référence 15066801) et VeriSeq NIPT Sample Prep (96 échantillons) (référence 15066802). Les VeriSeq NIPT Sample Prep sont configurés pour être utilisés avec le VeriSeq NIPT Microlab STAR (ML STAR) (référence 95475-01, 95475-02 ou 806288) qui est fourni par Hamilton Company.

VeriSeq NIPT Sample Prep, boîte d'extraction

Tableau 1 VeriSeq NIPT Extraction Box (24) et (48), référence 20025869 et 15066803

Nom du réactif sur l'étiquette	Nombre de contenants dans la trousse	Ingrédients actifs	Stockage
Lysis Buffer (Tampon de lyse)	1	Chlorhydrate de guanidine dans une solution aqueuse tamponnée	15 à 30 °C
Wash Buffer I (Tampon de lavage I)	1	Chlorhydrate de guanidine et propan-2-ol dans une solution aqueuse tamponnée	15 à 30 °C
Wash Buffer II (Tampon de lavage II)	1	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels	15 à 30 °C
Elution Buffer (Tampon d'élution)	1	Solution aqueuse tamponnée	15 à 30 °C
Proteinase Buffer (Tampon de protéinase)	1	Glycérol dans une solution aqueuse tamponnée	15 à 30 °C
Proteinase K (Protéinase K)	3	Protéinase K lyophilisée	15 à 30 °C

Tableau 2 VeriSeq NIPT Extraction Box (96), référence 15066807

Nom du réactif sur l'étiquette	Nombre de contenants dans la trousse	Ingrédients actifs	Stockage
Lysis Buffer (Tampon de lyse)	1	Chlorhydrate de guanidine dans une solution aqueuse tamponnée	15 à 30 °C
Wash Buffer I (Tampon de lavage I)	1	Chlorhydrate de guanidine et propan-2-ol dans une solution aqueuse tamponnée	15 à 30 °C
Wash Buffer II (Tampon de lavage II)	2	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels	15 à 30 °C
Elution Buffer (Tampon d'élution)	1	Solution aqueuse tamponnée	15 à 30 °C
Proteinase Buffer (Tampon de protéinase)	1	Glycérol dans une solution aqueuse tamponnée	15 à 30 °C
Proteinase K (Protéinase K)	4	Protéinase K lyophilisée	15 à 30 °C

VeriSeq NIPT Sample Prep, boîte de préparation de librairie

Tableau 3 VeriSeq NIPT Library Prep Box (24) et (48), références 20026030 et 15066809

Nom du réactif sur l'étiquette	Nombre de contenants dans la trousse	Ingrédients actifs	Stockage
End Repair Mix (Mélange de réparation des extrémités)	1	ADN polymérase et dNTP dans une solution aqueuse tamponnée	-25 à -15 °C
End Repair Mix (Mélange d'extension homopolymérique A)	1	ADN polymérase et dATP dans une solution aqueuse tamponnée	-25 à -15 °C
Ligation Mix (Mélange de ligation)	1	ADN ligase dans une solution aqueuse tamponnée	-25 à -15 °C
Hybridization Buffer (Tampon d'hybridation)	1	Solution aqueuse tamponnée	-25 à -15 °C

Nom du réactif sur l'étiquette	Nombre de contenants dans la trousse	Ingrédients actifs	Stockage
NIPT DNA Adapter Plate (Plaque d'adaptateur d'ADN DPNI)	1	Oligonucléotides dans une solution aqueuse tamponnée	-25 à -15 °C

Tableau 4 VeriSeq NIPT Library Prep Box (96), référence 15066810

Nom du réactif sur l'étiquette	Nombre de contenants dans la trousse	Ingrédients actifs	Stockage
End Repair Mix (Mélange de réparation des extrémités)	1	ADN polymérase et dNTP dans une solution aqueuse tamponnée	-25 à -15 °C
End Repair Mix (Mélange d'extension homopolymérique A)	2	ADN polymérase et dATP dans une solution aqueuse tamponnée	-25 à -15 °C
Ligation Mix (Mélange de ligation)	2	ADN ligase dans une solution aqueuse tamponnée	-25 à -15 °C
Hybridization Buffer (Tampon d'hybridation)	1	Solution aqueuse tamponnée	-25 à -15 °C
NIPT DNA Adapter Plate (Plaque d'adaptateur d'ADN DPNI)	1	Oligonucléotides dans une solution aqueuse tamponnée	-25 à -15 °C

VeriSeq NIPT Sample Prep, boîte d'accessoires

Tableau 5 VeriSeq NIPT Accessory Box, référence 15066811

Nom du réactif sur l'étiquette	Nombre de contenants dans la trousse	Ingrédients actifs	Stockage
DNA Binding Plate (Plaque de fixation de l'ADN)	1	Microplaque en propylène avec membrane en silicone modifiée	2 à 8 °C
Resuspension Buffer (Tampon de resuspension)	1	Solution aqueuse tamponnée	2 à 8 °C
Sample Purification Beads (Billes de purification d'échantillon)	1	Billes paramagnétiques pour la phase solide dans une solution aqueuse tamponnée	2 à 8 °C
DNA Quantification Reagent (Réactif pour quantification d'ADN)	1	Marqueur intercalaire de l'ADN dans du DMSO	2 à 8 °C
DNA Quantification Standard (Standard de quantification d'ADN)	1	Standard d'ADN double brin, ADN non spécifique et azoture de sodium dans une solution aqueuse tamponnée	2 à 8 °C

VeriSeq NIPT Sample Prep, tubes de flux de travail et étiquettes

Tableau 6 Étiquettes et tubes du flux de travail, référence 15071543

Nom de l'élément sur l'étiquette	Nombre d'éléments dans la trousse	Stockage
Étiquette (LBL); Code à barres de la plaque	9	15 à 30 °C
Étiquette (LBL); Code à barres de la plaque à puits profonds	12	15 à 30 °C
Tube; Tube de groupement vide	5	15 à 30 °C

Réactifs non fournis

Réactifs nécessaires, non fournis

- Réactifs de séquençage et consommables requis pour le système de séquençage nouvelle génération (SNG)
- Eau sans DNase/RNase certifiée
- Éthanol, 100 % (200 épreuves) de qualité biologie moléculaire

REMARQUE L'éthanol qui n'est pas de qualité biologie moléculaire peut avoir des répercussions potentiellement négatives sur la performance du test.

Réactifs facultatifs, non fournis

- Solution saline dans un tampon phosphate de Dulbecco (DPBS) pour le contrôle négatif

Stockage et manipulation

1. La température ambiante correspond à une température de 15 à 30 °C.
2. Tous les réactifs ne doivent être utilisés qu'une seule fois. Dès que les réactifs ont été préparés aux fins d'utilisation, ils devraient être utilisés immédiatement.
3. Si l'emballage ou le contenu des composants de VeriSeq NIPT Solution sont endommagés ou altérés, veuillez communiquer avec le service à la clientèle d'Illumina.
4. Les réactifs sont stables lorsqu'ils sont entreposés comme précisé jusqu'à la date de péremption indiquée sur les étiquettes des trousse. Pour connaître les conditions de stockage, consultez la colonne Stockage dans les tableaux de la section [Réactifs, page 6](#). N'utilisez pas de réactifs périmés.
5. Les changements dans l'apparence physique des réactifs fournis peuvent indiquer une détérioration du matériel. Si des changements dans l'apparence physique se produisent (p. ex. des changements apparents de la couleur des réactifs ou une trace de voile montrant une contamination microbienne), n'utilisez pas les réactifs.
6. Respectez les pratiques exemplaires suivantes lorsque vous manipulez les billes de purification d'échantillon :
 - Ne congelez jamais les billes.
 - Laissez les billes atteindre la température ambiante avant de les utiliser.
 - Immédiatement avant l'utilisation, agitez les billes jusqu'à obtenir une suspension adéquate et une couleur d'apparence homogène.

7. Les tampons de lyse, de lavage I et II, d'éluion et de protéinase peuvent former des précipités ou des cristaux visibles. Avant l'utilisation, agitez vigoureusement, puis inspectez visuellement pour vous assurer qu'il n'y a aucun précipité.
8. Ne congelez jamais le sang entier après le prélèvement.
9. Séquencez les bibliothèques dès que possible après le regroupement. Les bibliothèques regroupées demeurent stables jusqu'à sept jours entre -25 °C et -15 °C. Aucune autre dénaturation n'est nécessaire si elles sont entreposées dans ces conditions pendant cette durée.

Équipement et matériel

Équipement et matériel nécessaires, non fournis

Équipement nécessaire, non fourni

Équipement	Fournisseur
<p>Système de séquençage nouvelle génération (SNG) avec les capacités suivantes :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Séquençage à lecture appariée de 2 x 36 pb • Compatible avec les adaptateurs d'index double pour la préparation d'échantillons NIPT VeriSeq • Production automatique de fichiers BCL • Chimie à deux canaux • 400 millions de lectures appariées par analyse • Compatible avec le VeriSeq NIPT Assay Software v2 ou le système de séquençage NextSeq 550Dx 	Fournisseur d'instrument ou Illumina, référence 20005715
Congélateur, de -25 à -15 °C	Fournisseur de laboratoire général
Microcentrifugeuse	Fournisseur de laboratoire général
Dispositif pour simplifier le pipetage	Fournisseur de laboratoire général
Réfrigérateur, de 2 à 8 °C	Fournisseur de laboratoire général
Pipettes à canal unique de 20 µl	Fournisseur de laboratoire général
Pipettes à canal unique de 200 µl	Fournisseur de laboratoire général
Pipettes à canal unique de 1 000 µl	Fournisseur de laboratoire général
Agitateur	Fournisseur de laboratoire général
Assemblage de la centrifugeuse et du rotor pour les tubes de prélèvement de sang	

Équipement	Fournisseur
Appareils équivalents :	Fournisseur de laboratoire général
<ul style="list-style-type: none"> Centrifugeuse réfrigérée d'une capacité de 1 600 g sans option de frein Rotor à récipients rotatifs avec les récipients Récipients encastrables, capacité de 24, 48 ou de 96 tubes, profondeur minimum de 76 mm Adaptateurs de récipients encastrables pour soutenir 16 tubes de prélèvement de sang de 100 mm 	Beckman Coulter, article n° 392304 (120 V ou 230 V)
Recommandé :	
<ul style="list-style-type: none"> Centrifugeuse de la série Allegra X12R, 1 600 g 	Beckman Coulter, article n° 369704
<ul style="list-style-type: none"> Centrifugeuse Allegra, GH-3.8 Rotor, avec récipients du rotor 	Beckman Coulter, article n° 392805
<ul style="list-style-type: none"> Centrifugeuse Allegra, couvercles de récipients, jeu de deux 	Beckman Coulter, article n° 359150
<ul style="list-style-type: none"> Centrifugeuse Allegra, assemblage de l'adaptateur, 16 mm, jeu de quatre 	

Assemblage de la centrifugeuse et du rotor pour les microplaques

Appareils équivalents :	Fournisseur de laboratoire général
<ul style="list-style-type: none"> Centrifugeuse, capacité de 5 600 g Rotor de plaques rotatives avec porteurs de plaques de 96 puits, profondeur minimale de 76,5 mm Multifuge X4 Pro-MD 120V TX-1000BT Centrifugeuse Sorvall Legend XTR 	Thermo Scientific VWR, référence 76326-254 Thermo Fisher Scientific, référence 75004521 (120 V) ou référence 75004520 (230 V) Thermo Fisher Scientific, référence 75003606 Thermo Scientific VWR, référence 97040-244
<ul style="list-style-type: none"> Rotor de microplaques HIGHPlate 6000 Microplate Rotor Rotor High Plate 6000 	Thermo Fisher Scientific, n° 4379590 au catalogue
Base de soutien pour les microplaques	Thermo Fisher Scientific, n° AB-0563/1000 au catalogue
<ul style="list-style-type: none"> Recommandé : <ul style="list-style-type: none"> Base de soutien à 96 puits MicroAmp Porteur de plaque de PCR à 96 puits 	

Équipement	Fournisseur
L'un des lecteurs de microplaques suivants ou équivalent (fluorimètre) avec SoftMax Pro v6.2.2 ou une version ultérieure : <ul style="list-style-type: none"> Gemini XPS SpectraMax M2, M3, M4 et M5 <ul style="list-style-type: none"> L'insert mauve à utiliser dans le flux de travail est inclus avec le lecteur de microplaques 	Molecular Devices, référence XPS Molecular Devices, références M2, M3, M4 et M5
SpectraMax USB rapide, adaptateur de série	Molecular Devices, référence 9000-0938
Thermocycleur avec les caractéristiques suivantes : <ul style="list-style-type: none"> Couvercle chauffant Fourchette de température de 4 à 98 °C Exactitude de la température, ±2 °C Vitesse minimale de variation de température de 2 °C par seconde Compatible avec la plaque de PCR 96 puits Twin.tec à embase pleine 	Fournisseur de laboratoire général
Système VeriSeq NIPT Microlab STAR	Hamilton, référence 95475-01 (115 V), 95475-02 (230 V) ou 806288 (pour la compagnie Hamilton à Bonaduz)
VeriSeq Onsite Server v2 ou une version plus récente	Illumina, référence 20028403 ou 20047000 (v2), 15076164 ou 20016240 (mise à jour)
Si vous utilisez un système de séquençage NextSeq 550Dx : <ul style="list-style-type: none"> NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5, 75 cycles 	Illumina, n° de référence 20028870

Équipement facultatif, non fourni

Équipement	Fournisseur
Pluggo Decapper System (appareil pour déboucher les tubes)	LGP Consulting, référence n° 4600 4450
SpectraMax SpectraTest FL1 fluorescence validation plate (plaque de validation de la fluorescence)	Molecular Devices, référence n° 0200-5060
Tube Revolver/Rotator (tourniquet de tubes), tubes de 15 ml, 40 tr/min, de 100 à 240 V	Thermo Scientific, n° de référence 88881001 (É.-U.) ou 88881002 (UE)

Matériel nécessaire, non fourni

Consommable	Fournisseur
Embouts avec filtre, non stériles, conducteurs, de 1 000 µl	Hamilton, n° de référence 235905
Embouts avec filtre, non stériles, conducteurs, de 300 µl	Hamilton, n° de référence 235903
Embouts avec filtre, non stériles, conducteurs, de 50 µl	Hamilton, n° de référence 235948
Réservoir à puits profonds avec les caractéristiques suivantes : <ul style="list-style-type: none"> • Format de microplaque SLAS 1–2004 avec 96 puits à fond pyramidal ou conique et une capacité minimale de 240 ml. • Polypropylène de préférence avec une faible fixation de l'ADN pour toutes les surfaces de contact avec l'échantillon. • Dimensions internes (niveau de liquide) compatibles avec les étapes d'aspiration et de distribution automatisées du système MicroLab STAR NIPT VeriSeq. • Dimensions en hauteur compatibles avec les mouvements automatisés du système VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	Fournisseur de laboratoire général Réservoirs compatibles : <ul style="list-style-type: none"> • Produit Axygen de Corning, produit n° RES-SW96-HP-SI • Agilent, produit n° 201246-100
Bac de réactifs avec les caractéristiques suivantes : <ul style="list-style-type: none"> • Bac qui s'insère bien, sans forcer, dans le VeriSeq NIPT Microlab STAR avec un fond conique et une capacité minimale de 20 ml. • Polypropylène sans RNase ni DNase. • Les dimensions internes du réservoir (niveau de liquide) génèrent des niveaux de liquide avec des volumes de réactifs de test compatibles avec les étapes d'aspiration et de distribution automatisées du système VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Dimensions en hauteur compatibles avec les mouvements automatisés du système VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	Fournisseur de laboratoire général Bacs compatibles : <ul style="list-style-type: none"> • Roche, produit n° 03004058001

Consommable	Fournisseur
<p>Plaques à puits profonds avec les caractéristiques suivantes :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Format de microplaque SLAS 1–2004, 3–2004 et 4–2004 avec 96 puits à fond pyramidal ou conique et une capacité minimale de puits de 2 ml. • Polypropylène translucide de préférence avec une faible fixation de l'ADN pour toutes les surfaces de contact avec l'échantillon. • Les dimensions de puits génèrent des niveaux de liquide compatibles avec les étapes d'aspiration et de distribution automatisées du système VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Embase de plaque permettant d'apposer fermement et à plat les codes à barres à l'emplacement requis. • Cadre résistant au couple d'une capacité minimale de 5 600 x g. • Dimensions en hauteur des plaques compatibles avec les mouvements automatisés du système VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	<p>Fournisseur de laboratoire général</p> <p>Plaques compatibles :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, référence n° 0030505301 • Eppendorf, référence n° 30502302 • USA Scientific, référence n° 1896-2000
<p>Plaques à 384 puits avec les caractéristiques suivantes :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Microplaque à 384 puits, optimisée pour les volumes faibles, avec une capacité minimum de puits de 50 µl. • Polystyrène opaque de couleur noire avec blocage de lumière et faible fixation de l'ADN pour toutes les surfaces de contact avec l'échantillon. • Les dimensions de puits génèrent des niveaux de liquide compatibles avec les étapes d'aspiration et de distribution automatisées du système VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Dimensions en hauteur des plaques compatibles avec les mouvements automatisés du système VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Embase de plaque permettant d'apposer fermement et à plat les codes à barres à l'emplacement requis. 	<p>Fournisseur de laboratoire général</p> <p>Plaques compatibles :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Corning, produit n° 3820

Consommable	Fournisseur
<p>Plaques à 96 puits avec les caractéristiques suivantes :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Microplaque avec cadre résistant au couple pouvant supporter une force de 5 600 x g au moins et 96 puits translucides avec des fonds coniques, des bords relevés et une capacité minimale de puits de 150 µl. • Polypropylène sans RNase ni DNase avec une faible fixation de l'ADN pour toutes les surfaces de contact avec l'échantillon. • Les dimensions de puits génèrent des niveaux de liquide compatibles avec les étapes d'aspiration et de distribution automatisées du système VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Dimensions en hauteur des plaques compatibles avec les mouvements automatisés du système VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Embase de plaque permettant d'apposer fermement et à plat les codes à barres à l'emplacement requis. • Compatible avec les thermocycleurs pour la dénaturation. 	<p>Fournisseur de laboratoire général</p> <p>Plaques compatibles :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, référence n° 0030129512 • Eppendorf, référence n° 30129580 • Eppendorf, référence n° 30129598 • Eppendorf, référence n° 30129660 • Eppendorf, référence n° 30129679 • Bio-Rad, référence HSP9601
<p>L'un des types d'opercules suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Opercule F de Microseal • Opercules en aluminium 	<p>Bio-Rad, n° MSF1001 au catalogue Beckman Coulter, article n° 538619</p>
<p>Tube de prélèvement sanguin pour ADN acellulaire Cell-Free DNA BCT CE</p>	<p>Streck, n° 218997 au catalogue</p>
<p>Bouchons à pression</p>	<p>Sarstedt, n° de commande 65.802</p>
<p>Tubes de 2 ml à bouchons vissés</p>	<p>Fournisseur de laboratoire général</p>
<p>Embouts avec filtre pour pipeteur de 20 µl</p>	<p>Fournisseur de laboratoire général</p>
<p>Embouts avec filtre pour pipeteur de 200 µl</p>	<p>Fournisseur de laboratoire général</p>
<p>Embouts avec filtre pour pipeteur de 1 000 µl</p>	<p>Fournisseur de laboratoire général</p>
<p>Appareils équivalents :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Vaporisateur désinfectant à base d'alcool et à action rapide • Solution de détergent désinfectant 	<p>Fournisseur de laboratoire général</p>
<p>Recommandé :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eau désionisée et éthanol à 70 % 	

Matériel facultatif, non fourni

Consommable	Fournisseur
Solution saline dans un tampon phosphate de Dulbecco (DPBS) pour le contrôle négatif	Fournisseur de laboratoire général
Tube à bouchon vissé, 10 ml (pour échantillons de contrôle uniquement)	Sarstedt, n° de commande 60.551
Tube, à bouchon vissé, 50 ml	Fournisseur de laboratoire général
Pipettes sérologiques de 25 ml	Fournisseur de laboratoire général
Pipettes sérologiques de 10 ml	Fournisseur de laboratoire général

Prélèvement, transport et stockage des échantillons



ATTENTION

Manipulez tous les échantillons comme s'ils étaient des agents potentiellement infectieux.

- Les échantillons de sang entier de 7 à 10 ml doivent être recueillis dans un tube de prélèvement sanguin pour ADN acellulaire Cell-Free DNA de marque Streck.
- Le transport du sang entier doit être conforme à tous les règlements applicables sur le transport d'agents étiologiques. Les méthodes rapides d'expédition ou de transport sont recommandées.
- Pendant le transport, entreposez-le à une température située entre 4 et 30 °C. Une fois que vous avez reçu les échantillons, entreposez-le à une température de 2 à 8 °C jusqu'à ce que vous soyez prêt à commencer. L'intervalle entre la collecte de sang et l'isolation de plasma initiale ne doit pas dépasser 5 jours.
- Advenant qu'il soit nécessaire de les retester, les échantillons qui ont été traités peuvent être rebouchés et conservés à 4 °C pendant 5 jours de plus (jusqu'à un total de 10 jours après la collecte de l'échantillon).



ATTENTION

Dépasser les durées d'entreposage mentionnées ci-dessus peut avoir des répercussions négatives sur les taux d'échecs des échantillons individuels.

Avertissements et précautions

- Le présent test comporte de la protéinase K. Des risques de lésions corporelles peuvent survenir par inhalation, ingestion, contact avec la peau et contact avec les yeux. Utilisez ces composants dans une zone bien aérée, portez des vêtements de protection, évitez de respirer la poussière et mettez au rebut les contenants et tout contenu inutilisé conformément aux normes de sécurité gouvernementales applicables.
- Le présent test comporte du chlorure de guanidinium. Des risques de lésions corporelles peuvent survenir par inhalation, ingestion, contact avec la peau et contact avec les yeux. Utilisez ces composants dans une zone bien aérée, portez des vêtements de protection et mettez au rebut les contenants et tout contenu inutilisé conformément aux normes de sécurité gouvernementales locales applicables.
- Le présent test comporte du propan-2-ol, un produit chimique inflammable. Maintenez le produit loin des sources de chaleur et des flammes nues. Des risques de lésions corporelles peuvent survenir par inhalation, ingestion, contact avec la peau et contact avec les yeux. Utilisez ces composants dans une zone bien aérée, portez des vêtements de protection et mettez au rebut les contenants et tout contenu inutilisé conformément aux normes de sécurité gouvernementales locales applicables.
- Ce test contient du diméthyl sulfoxyde, un liquide corrosif et combustible. Des risques de lésions corporelles peuvent survenir par inhalation, ingestion, contact avec la peau et contact avec les yeux. Utilisez ces composants dans une zone bien aérée, portez des vêtements de protection et mettez au rebut les contenants et tout contenu inutilisé conformément aux normes de sécurité gouvernementales locales applicables.
- Afin d'éviter de produire des gaz nocifs, ne jetez pas les déchets issus de l'extraction d'ADN acellulaire (lesquels comportent du chlorhydrate de guanidine) avec les déchets contenant un agent de blanchiment (hypochlorite sodique).
- Manipulez tous les échantillons comme s'ils contenaient des agents potentiellement infectieux.
- Utilisez les précautions habituelles en laboratoire. Ne pipettez pas avec la bouche. Ne mangez pas, ne buvez pas et ne fumez pas dans les zones de travail indiquées. Portez des gants jetables et des blouses de laboratoire lors de la manipulation des échantillons et des réactifs du test. Lavez-vous soigneusement les mains après avoir manipulé les échantillons et les réactifs du test.
- N'utilisez aucun composant du test au-delà de la date de péremption indiquée sur l'étiquette de la boîte du test. N'interchangez pas les composants du test venant de lots de test différents. L'identification des lots du test est inscrite sur l'étiquette de la boîte du test. Entreposez les composants du test à la température indiquée.
- Afin d'éviter toute dégradation des échantillons et des réactifs, veuillez vous assurer que toutes les émanations d'hypochlorite sodique du nettoyage sont entièrement dissipées avant de lancer le protocole.
- Le non-respect des procédures comme décrites peut entraîner des résultats erronés ou une baisse considérable de la qualité des échantillons.
- Signalez immédiatement tout incident grave lié à ce produit à Illumina et aux autorités compétentes des États membres dans lesquels l'utilisateur et le patient résident.

- Pour plus de renseignements relatifs à la protection de l'environnement, à la santé et à la sécurité, consultez les fiches signalétiques (SDS) à l'adresse support.illumina.com/sds.html.

Remarques procédurales

Prévention de la contamination

- Utilisez les embouts neufs et les consommables neufs du matériel de laboratoire.
- Utilisez des embouts résistants aux aérosols pour diminuer le risque de transfert et de contamination croisée, d'échantillon à échantillon.
- En raison du risque de contamination, soyez extrêmement prudent et assurez-vous que le contenu du puits demeure complètement dans le puits. Ne faites pas éclabousser le contenu. Passez-le à la centrifugeuse à la suite d'une étape d'agitation.
- Lorsque vous manipulez du sang et des dérivés sanguins, suivez les règles applicables pour observer une bonne hygiène et de bonnes pratiques de laboratoire.
- N'utilisez pas de pulvérisateurs d'aérosols de blanchiment lorsque vous effectuez la préparation de bibliothèques. Une contamination par des quantités infimes d'agents de blanchiment peut entraîner l'échec du test.
- Lors du descellement d'une plaque, prenez soin de la placer sur une surface plane et ferme en la tenant fermement. Retirez lentement l'opercule en veillant à ce qu'il ne touche pas les puits exposés. Prenez soin de ne pas toucher les puits exposés et de ne pas en secouer le contenu. Une contamination croisée entre les puits risque de produire des résultats inexacts.

Nettoyage de la plateforme du système VeriSeq NIPT

Microlab STAR

- Avant l'utilisation, inspectez la plateforme; elle doit être propre. Au moins une fois par semaine, effectuez l'entretien hebdomadaire et suivez les instructions de nettoyage suivantes.
- Retirez tous les porteurs qui ne peuvent être chargés et nettoyez-les au moyen d'un vaporisateur désinfectant à base d'alcool et à action rapide (eau désionisée et éthanol à 70 %) et laissez-les sécher. S'ils sont très souillés, trempez-les par la suite dans une solution de détergent désinfectant, rincez-les avec un désinfectant alcoolisé et laissez-les sécher.
- Ouvrez le couvercle avant et essuyez la plateforme avec un chiffon saturé d'eau désionisée et d'éthanol à 70 %. Les coulisseaux en particulier doivent être vérifiés; ils doivent être propres.
- Retirez le collecteur Basic Vacuum System (BVS) et nettoyez le collecteur, le joint d'étanchéité et les compartiments intérieurs du BVS avec un chiffon. Évitez de nettoyer le joint d'étanchéité avec de l'éthanol puisque cela peut endommager le matériel.

- Videz les déchets des embouts du support CORE à 96 têtes et du canal indépendant.
- Retirez la plaque d'éjection des embouts du canal indépendant du poste de déchets des embouts et nettoyez-la. Vaporisez directement sa surface d'eau désionisée et d'éthanol à 70 % et essuyez-la. Tirez un nouveau sac de plastique par-dessus le cadre et attachez-le de nouveau. Remettez la plaque d'éjection des embouts nettoyée en place.
- Vaporisez directement la surface de la boîte de déchets du support CORE à 96 têtes et la chute avec de l'eau désionisée et de l'éthanol à 70 % et essuyez-les.
 - Si l'accumulation de débris est difficile à retirer des embouts, essuyez-les avec un chiffon mouillé dans une eau sans DNase ni RNase jusqu'à ce que les débris soient retirés. Débarrassez-vous du chiffon de façon appropriée. Stérilisez les embouts avec un désinfectant alcoolisé.
- Humectez un chiffon non pelucheux ou un coton-tige d'éthanol à 70 %. Passez ce chiffon ou coton-tige sur la fenêtre du lecteur laser de codes à barres. Avec le même chiffon ou coton-tige, nettoyez chacun des puits de l'adaptateur de plaque CPAC. Si vous utilisez un chiffon, enfoncez-le dans chacun des puits de l'adaptateur au moyen du bout sans encre d'un stylo pour que l'intérieur du puits soit bien nettoyé.
- Nettoyez les canaux indépendants :
 - Nettoyez le manchon d'éjection des embouts (partie extérieure des canaux de pipetage) sur les canaux indépendants au moyen d'un chiffon non pelucheux trempé dans de l'eau désionisée et de l'éthanol à 70 %. (Consultez le *Guide de référence Hamilton Microlab STAR, n° 15070074*.)
 - Nettoyez le disque d'arrêt et les joints toriques de la tête de pipetage (partie extérieure des canaux des pipettes) au moyen d'un chiffon non pelucheux trempé dans de l'eau désionisée et de l'éthanol à 70 %.
- Nettoyez le support CORE à 96 têtes :
 - Avec le même chiffon non pelucheux trempé dans de l'eau désionisée et de l'éthanol à 70 %, nettoyez le boîtier des 96 têtes et le dessous des disques d'arrêt.
 - Avec le même chiffon ou un bout de chiffon déchiré et trempé dans de l'eau désionisée et de l'éthanol à 70 %, nettoyez les côtés des canaux des pipettes des 96 têtes, comme si vous leur passiez la soie dentaire, pour nettoyer les joints toriques. Répétez cette procédure pour chacun des canaux de pipettes du support à 96 têtes.
- Vaporisez les couvercles avant et latéral avec de l'eau désionisée et de l'éthanol à 70 % et séchez-les.
- Nettoyez le ruban protecteur Autoload au moyen d'un chiffon trempé dans de l'eau désionisée et de l'éthanol à 70 % et essuyez-le sans exercer de pression.
- Lorsque la plateforme et ses accessoires sont complètement secs, remplacez les porteurs.

REMARQUE Un nettoyage et un entretien inadéquats du système ML STAR peuvent causer une contamination croisée et une piètre performance de tests.

Contrôle de la qualité

Une matière témoin dont les caractéristiques de performance sont connues peut être évaluée pour détecter les différences dans les procédures techniques et de traitement du laboratoire.

L'analyse d'un échantillon témoin ou d'un contrôle négatif réduit le nombre total d'échantillons maternels inconnus qui peuvent être traités avec chacune des solutions de préparation d'échantillons.

Ne faites pas plus de deux échantillons de contrôle négatif par lot de 24 ou 48 échantillons ou plus de quatre échantillons de contrôle négatif par lot de 96 échantillons.

Mode d'emploi

Conseils et techniques

À moins qu'un point d'arrêt de sécurité ne soit stipulé dans le protocole, passez immédiatement à l'étape suivante.

Inscription de codes à barres sur les plaques

- Les codes à barres des plaques à embase pleine commencent par PL.
- Les codes à barres des plaques à puits profonds commencent par DW.
- Collez les codes à barres sur les plaques à embase pleine et à puits profonds sur le côté près de la colonne 12.
- Chargez les plaques en plaçant le code à barres vers la droite pour que le balayage automatique puisse s'exécuter.

Scellage et descellement des plaques

- Faites preuve d'extrême prudence pour éviter la contamination croisée. Il ne doit pas y avoir de liquide visible en dessous de l'opercule.
 - Veillez à ce que le dessous exposé de l'opercule ne touche pas les puits exposés.
 - Prenez soin de ne pas toucher les puits exposés.
- Scellez toujours la plaque à 96 puits avant de suivre les étapes du protocole ci-dessous :
 - Étapes de centrifugation
 - Étapes de thermocyclage
- Pour sceller la plaque, appuyez l'opercule en aluminium contre la plaque et scellez le tout. Assurez-vous d'exercer une pression sur toute la plaque et vérifiez que l'opercule est bien scellé sur chaque puits.
- Avant de desceller la plaque, effectuez les actions suivantes :
 - Centrifugez brièvement la plaque à 96 puits à 1 000 × g pendant 20 secondes.
 - Placez la plaque sur une surface plane, puis retirez lentement l'opercule.

Système VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Avant l'utilisation, effectuez l'entretien requis selon les instructions du fabricant et documentez le tout.
- Observez le système ML STAR pendant les étapes automatisées. Surveillez l'interface du VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 Software pour voir les commandes et les instructions pour l'opérateur.
- Maintenez le couvercle avant en place pendant que l'appareil fonctionne.
- Maintenez la plateforme libre de tout objet pendant que l'appareil fonctionne.
- Si le bouton d'option **Exclude** (Exclure) s'affiche durant un événement de gestion des erreurs, vous ne devez en aucun cas sélectionner cette option. Si la méthode ne passe pas l'étape de l'événement de gestion des erreurs ou propose des options limitées pour la gestion des erreurs, interrompez l'analyse.
- Lors des étapes relatives au vide de la plaque, si le VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 Software vous en fait la demande, aidez manuellement à sceller la partie entre la plaque et le collecteur pour le vide.
- Permettez au système de jeter automatiquement les embouts de l'adaptateur. Ne retirez pas manuellement les embouts à moins que le logiciel ne vous le demande.
- Retirez les réactifs et les consommables utilisés dès que le logiciel VeriSeq NIPT Workflow Manager en fait la demande.
- Videz quotidiennement les bonbonnes de déchet du vide. La première bonbonne ne devrait jamais être remplie à plus de la moitié. Un débordement des déchets d'aspiration peut endommager la pompe à vide et diminuer le degré d'aspiration du système.
- Pour les lots de 24, 48 et 96 échantillons, chargez un support complet d'embouts à 8 canaux comptés individuellement avant de lancer la méthode.

Traitement des échantillons

Procédure

1. Effectuez les étapes suivantes pour chaque aliquote :
 - a. Centrifugez les échantillons ayant un code à barres à 1 600 × g pendant 10 minutes à 4 °C avec le frein désactivé.
 - b. Quand la centrifugeuse s'arrête complètement, retirez les tubes d'échantillons. Commencez l'isolation de plasma dans les 15 minutes suivant la centrifugation. Si plus de 15 minutes se sont écoulées, effectuez de nouveau la centrifugation.
2. Inspectez chaque tube pour vérifier l'adéquation de l'échantillon. Pour ce faire, assurez-vous que les exigences suivantes sont respectées :
 - Le volume de l'échantillon est conforme aux attentes.
 - Séparation claire entre les globules rouges et les couches de plasma des échantillons visible après la centrifugation.
 - Le niveau de plasma est d'au moins 1,5 ml au-dessus de la couche leucocytaire.

- L'échantillon n'est pas fortement hémolysé (c'est-à-dire que le plasma n'est pas d'un rouge profond en apparence).
- L'échantillon n'est pas lipidique (par exemple, le plasma n'est pas d'un blanc trouble ou d'un aspect laiteux opaque).
- L'échantillon ne présente pas de coagulation.



ATTENTION

Les échantillons qui ont été mal stockés ou manipulés peuvent devenir inaptes. Si des échantillons inadaptés sont traités, ils peuvent boucher la plaque de fixation pendant les extractions et entraîner des débordements d'échantillons dans les puits adjacents.

3. Débouchez les tubes et chargez-les dans les porteurs de tubes. Chargez tous les échantillons et tout témoin de plasma pour le lot.



ATTENTION

Si l'option Exclude (Exclure) s'affiche durant un événement de gestion des erreurs, ne la sélectionnez pas. Si la méthode ne passe pas l'étape de l'événement de gestion des erreurs et que vous disposez d'options limitées pour la gestion des erreurs, interrompez l'analyse.

Isolation du plasma

Préparation

1. Écrivez « Plasma intermédiaire » sur l'étiquette d'une plaque à puits profonds et collez un code à barres.
2. Écrivez « Plasma final » sur l'étiquette d'une plaque à puits profonds et collez un code à barres.
3. Pour les lots de 24, 48 et 96 échantillons, chargez un support complet d'embouts à 8 canaux comptés individuellement avant de lancer la méthode.



ATTENTION

Veillez à utiliser la plaque signalétique appropriée pour les plaques de plasma intermédiaire et de plasma final. L'utilisation d'un réservoir à puits profond au lieu d'une plaque à puits profonds entraîne une fusion des échantillons et peut produire des résultats incorrects.

Procédure

1. Ouvrez l'AppLauncher (Lanceur d'application), puis cliquez sur **VeriSeq NIPT Method** (Méthode DPNI VeriSeq).
2. Entrez un identifiant de lot unique et le nom de l'utilisateur, puis sélectionnez **OK**.
L'identifiant du lot peut contenir jusqu'à 26 caractères. Vous pouvez utiliser des chiffres, des lettres, des traits de soulignement (_) ou des tirets (-). Exemple : 2025-10-16_Lot3.

L'identifiant de l'échantillon n'est pas sensible à la casse. Les identifiants de lot sensibles à la casse ne sont pas considérés comme uniques.

Les noms des lots doivent être uniques et ne doivent pas seulement se distinguer par l'utilisation des majuscules. Par exemple, Lot01 et lot01 ne sont pas des noms uniques. Cette même règle s'applique à la dénomination des identifiants d'échantillons.

3. Sélectionnez **New Batch** (Nouveau lot).
4. Après le début du test, sélectionnez **OK** pour lancer l'isolation du plasma.
5. Effectuez l'une des opérations suivantes :
 - Pour charger une feuille d'échantillons existante, sélectionnez la feuille d'échantillons associée au lot, puis sélectionnez **OK**.
 - Pour poursuivre sans choisir une feuille d'échantillons, sélectionnez **No Sample Sheet** (Aucune feuille d'échantillons).

Pour obtenir des renseignements sur la création d'une feuille d'échantillons, consultez le *Guide du logiciel VeriSeq NIPT Solution v2 (document n° 1000000067940)*.

REMARQUE Le type d'échantillon, simple ou gémellaire, doit être correctement consigné pour chacun des échantillons afin d'assurer une analyse des données adéquate. Si vous choisissez **No Sample Sheet** (Aucune feuille d'échantillons), assurez-vous d'avoir réglé la valeur de l'échantillon par défaut dans les Workflow Manager Service Tools (Boîte à outils du gestionnaire de flux de travail). Consultez le *Guide du logiciel VeriSeq NIPT Solution v2 (document n° 1000000067940)* pour obtenir plus de renseignements.

6. Sélectionnez la taille du lot, puis sélectionnez **OK**.
7. Sélectionnez le nombre de contrôles négatifs (NTC), puis sélectionnez **OK**.

Les cases de NTC sont toujours les dernières cases sélectionnées. Par exemple, avec deux NTC dans une analyse de 24 échantillons, les positions 23 et 24 sont des NTC.
8. Confirmez que tous les codes à barres sont collés, puis chargez les échantillons, les embouts et les plaques (code à barres orienté vers la droite) sur le porteur.

9. Sélectionnez **OK** après chaque commande de chargement.

Taille du lot d'échantillons	Type de porteur	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48, 96	Embout	7 à 12	Embouts, 1 000 µl	5
			Embouts, 1 000 µl (lots de 96 seulement)	4, 5
	Tube	15	Tubes préparés d'échantillons de sang 1 à 24 (pour toutes les tailles de lots)	1 à 24
	Tube	16	Tubes préparés d'échantillons de sang 25 à 48 (lots de 48 et 96 seulement)	25 à 48
	Tube	17	Tubes préparés d'échantillons de sang 49 à 72 (lots de 96 seulement)	49 à 72
	Tube	18	Tubes préparés d'échantillons de sang 73 à 96 (lots de 96 seulement)	73 à 96
	Multiflex	19 à 24	Plaquette à puits profonds vide de plasma final, avec un code à barres	4
	Multiflex	19 à 24	Plaquette à puits profonds vide de plasma intermédiaire, avec un code à barres	5
	Réactif	47	[Facultatif] Solution saline dans un tampon phosphate de Dulbecco (DPBS) (utilisée pour le contrôle négatif)	5

10. Assurez-vous que les porteurs, le matériel de laboratoire et les réactifs sont chargés correctement.
11. À l'écran Pre-Spin Deck Verification (Vérification de la plateforme avant la centrifugation), sélectionnez **OK**.
12. Observez le système ML STAR effectuer les étapes automatisées.
13. Lorsque le gestionnaire de flux de travail vous avertira, assurez-vous que la plateforme de chargement du système ML STAR n'est pas entravée afin de permettre au système ML STAR de décharger les porteurs.
14. Sélectionnez **Unload** (Décharger) pour décharger la plateforme.
15. Retirez la plaquette à puits profonds de plasma intermédiaire comme suit.
 - a. Inspectez la plaquette pour que les volumes soient uniformes dans chaque puits (aucune erreur de pipette). Le volume attendu est de 1 000 µl.
 - b. Notez les incohérences lorsque la procédure d'isolation du plasma est terminée.
 - c. Scellez la plaquette, chargez avec le reste des échantillons et centrifugez à 5 600 × g pendant 10 minutes avec le frein désactivé ou au réglage le plus bas.
16. Sélectionnez **Yes** (Oui) pour passer à la préparation du plasma final.

17. Retirez le sceau de la plaque et rechargez la plaque sur le porteur.

Taille du lot d'échantillons	Type de porteur	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48, 96	Multiflex	19 à 24	Plaque à puits profonds de plasma intermédiaire	5

18. Cochez la case **Intermediate Plasma plate has been spun** (La plaque de plasma intermédiaire a été centrifugée), puis sélectionnez **OK**.

19. Observez le système ML STAR effectuer les étapes automatisées.

20. Lorsque le gestionnaire de flux de travail vous avertira, assurez-vous que la plateforme de chargement du système ML STAR n'est pas entravée afin de permettre au système ML STAR de décharger les porteurs.

21. Sélectionnez **Unload** (Décharger) pour décharger la plateforme.

22. Lorsque le gestionnaire de flux de travail vous l'indiquera, videz les porteurs et la plateforme.

23. Retirez la plaque à puits profonds de plasma final.

24. Inspectez visuellement la plaque pour détecter les erreurs suivantes :

- des volumes non uniformes dans chaque puits. Le volume attendu est de 900 µl;
- des culots de cellules sont visibles;
- il n'y a pas d'hémolyse excessive.

Si vous observez des culots anormaux de cellules visibles ou une hémolyse excessive, invalidez l'échantillon touché à la fin de la méthode d'isolation de plasma ou utilisez le gestionnaire de lots. Pour obtenir plus de renseignements sur le gestionnaire de lots, consultez le *Guide du logiciel VeriSeq NIPT Solution v2* (document n° 1000000067940).

25. Lorsque le gestionnaire de flux de travail l'indiquera, sélectionnez **OK**.

26. Entrez les commentaires sur les puits touchés, puis sélectionnez **OK**.

27. Effectuez l'une des opérations suivantes.

- Pour passer à l'extraction d'ADN acellulaire, sélectionnez **Yes** (Oui).
- Pour quitter, sélectionnez **Exit** (Quitter).

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Si vous arrêtez, scellez la plaque de plasma final et entreposez-la pendant tout au plus 7 jours entre 2 et 8 °C.

Extraction de l'ADN acellulaire

Préparation

1. Examinez visuellement les boîtes d'extraction et d'accessoires pour confirmer que la trousse n'est pas périmée.

- Préparez les réactifs suivants. Inscrivez le nom des réactifs sur les tubes réservoirs et les réservoirs à puits profonds.

Réactif	Stockage	Instructions
Plaque à puits profonds de plasma final	2 à 8 °C	Si elle était entreposée, laissez-la reposer pendant 30 minutes pour qu'elle atteigne la température ambiante. Centrifugez à 1 000 × g pendant 20 secondes. Descellez la plaque à puits profonds de plasma final avant de l'utiliser.

- Ajoutez lentement 3,75 ml de tampon de protéinase dans chacun des flacons de réactifs de protéinase K.
 - Préparez 3 flacons pour 24 et 48 échantillons.
 - Préparez 4 flacons pour 96 échantillons.
- Mettez un bouchon sur les flacons de protéinase K et agitez jusqu'à la resuspension.



ATTENTION

Ne contaminez pas le bouchon de caoutchouc. S'il entre en contact avec d'autres substances, le bouchon de caoutchouc peut contaminer d'autres échantillons.

- Regroupez la protéinase K préparée de tous les flacons dans un bac de réactifs et apposez une étiquette Protéinase K.
- Ajoutez 100 ml d'alcool éthylique à 100 % dans chaque flacon de réactifs de tampon de lavage II.
 - Préparez 1 flacon pour 24 et 48 échantillons.
 - Préparez 2 flacons pour 96 échantillons.
- Retournez les flacons de tampon de lavage II pour les mélanger.
- Cochez les cases sur les flacons de tampon de lavage II.
- Écrivez « Intermédiaire » sur l'étiquette d'une nouvelle plaque à embase pleine et collez un code à barres sur la plaque.
- Écrivez « Éluion de l'ADN acellulaire » sur l'étiquette d'une nouvelle plaque à embase pleine et collez un code à barres sur la plaque.
- Écrivez « Intermédiaire d'extraction » sur l'étiquette d'une nouvelle plaque à puits profonds et collez un code à barres sur la plaque à puits profonds.
- Collez un code à barres de plaque sur la plaque de fixation de l'ADN.
- Appliquez un opercule en aluminium sur les puits non utilisés pour les bains de 24 et 48 échantillons.
- Préparez une solution de nettoyage d'alcool éthylique à 70 % (70 % d'alcool éthylique et 30 % d'eau sans DNase/RNase) pour nettoyer le système de vide.

15. Préparez le système de vide comme suit.
 - a. Retirez le collecteur pour le vide et nettoyez-le avec de l'alcool éthylique à 70 %. Évitez de nettoyer le joint d'étanchéité avec de l'alcool éthylique puisque cela peut endommager le matériel.
 - b. Videz les déchets du vide.
 - c. Assurez-vous que le système de vide du système ML STAR est activé.

Procédure

1. Sélectionnez **OK** pour commencer l'extraction de l'ADN acellulaire.
2. Si la méthode **VeriSeq NIPT Method** n'est pas ouverte :
 - a. Ouvrez l'AppLauncher (Lanceur d'application), puis cliquez sur **VeriSeq NIPT Method** (Méthode DPNI VeriSeq).
 - b. Entrez l'identification du lot et le nom de l'utilisateur, puis sélectionnez **OK**.
3. Chargez les embouts sur les porteurs d'embouts comme suit, puis sélectionnez **OK**.



ATTENTION

Avant de lancer la méthode pour les lots de 24, 48 et 96 échantillons, ajoutez un support complet d'embouts à 8 canaux.

Taille du lot d'échantillons	Type de porteur	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24	Embout	1 à 6	Embouts, 1 000 µl	1
		7 à 12	Embouts, 300 µl	1
48	Embout	1 à 6	Embouts, 1 000 µl	1, 2
		7 à 12	Embouts, 300 µl	1
96	Embout	1 à 6	Embouts, 1 000 µl	1, 2, 3, 4
		7 à 12	Embouts, 300 µl	1

4. Chargez les embouts comptés dans les porteurs d'embouts comme suit.

Taille du lot d'échantillons	Type de porteur	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48, 96	Embout	49 à 54	Embouts, 1 000 µl	1
			Embouts, 300 µl	2
			Embouts, 50 µl	3

5. Entrez l'emplacement du premier et du dernier embouts pour chacun des supports d'embouts, sélectionnez **OK**.

6. Balayez les codes à barres de la boîte d'extraction.
7. Entrez le nom de l'utilisateur ou les initiales du préparateur des réactifs, puis sélectionnez **OK**.
8. Balayez les codes à barres de la boîte d'accessoires.
9. Entrez le nom de l'utilisateur ou les initiales du préparateur des réactifs, puis sélectionnez **OK**.
10. Confirmez que les codes à barres sont apposés.
11. Descellez la plaque à puits profonds de plasma final si nécessaire.
12. Chargez les plaques (code à barres orienté vers la droite) sur le porteur de plaques comme suit, puis sélectionnez **OK**.

Taille du lot d'échantillons	Type de porteur	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48, 96	Multiflex	19 à 24	Nouvelle plaque à embase pleine, intermédiaire, avec un code à barres	1
			Nouvelle plaque à embase pleine, élution d'ADN acellulaire, avec un code à barres	2
			Nouvelle plaque à puits profonds d'intermédiaire d'extraction, avec un code à barres	4
			Plaque à puits profonds de plasma final, avec un code à barres	5

13. Confirmez que la plaque de fixation de l'ADN possède un code à barres, puis sélectionnez **OK**.
14. Pour les lots de plaques partielles, appliquez un scellant de plaque découpé sur les puits non utilisés (colonnes 4 à 12 pour les lots de 24 échantillons et colonnes 7 à 12 pour les lots de 48 échantillons).
15. Chargez la plaque de fixation de l'ADN sur le collecteur pour le vide en plaçant le code à barres vers la droite.
16. Avant de placer la plaque de fixation sur le collecteur BVS, inspectez visuellement les puits pour détecter la présence éventuelle d'obstructions.
Cela pourrait limiter le flux des réactifs sous vide.
17. Si vous utilisez des lots de 24 ou 48 échantillons, couvrez les puits non utilisés et scellez avec un opercule en aluminium. Cochez la case **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (La plaque de fixation de l'ADN est-elle scellée?), puis sélectionnez **OK**.

18. Chargez les bacs de réactifs sur le porteur de réactifs comme suit, puis sélectionnez **OK**.

Taille du lot d'échantillons	Type de porteur	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48	Réactif	47	Tampon d'élution, 16 ml	1
			Protéinase K, 11 ml	2
96	Réactif	47	Tampon d'élution, 16 ml	1
			Protéinase K, 15 ml	2

19. Transférez les réactifs précisés dans les réservoirs à puits profonds, chargez ensuite les réservoirs sur les porteurs de puits profonds comme suit.

20. Sélectionnez **OK**.

Taille du lot d'échantillons	Type de porteur	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48	Puits profond	39 à 44	Tampon de lavage II, 125 ml	1
			Tampon de lavage I, 125 ml	2
			Alcool éthylique à 100 %, 60 ml	3
			Tampon de lyse, 100 ml	4
			Eau sans DNase ni RNase, 60 ml	5
96	Puits profond	39 à 44	Tampon de lavage II, 200 ml	1
			Tampon de lavage I, 125 ml	2
			Alcool éthylique à 100 %, 100 ml	3
			Tampon de lyse, 100 ml	4
			Eau sans DNase ni RNase, 100 ml	5

21. Attendez que la vérification automatique du volume de réactifs soit terminée.

22. Confirmez que la vidange du système d'aspiration est vide (il est recommandé qu'elle soit à moitié vide), puis sélectionnez **OK**.

23. Confirmez le placement de tous les porteurs, du matériel de laboratoire et des réactifs, puis sélectionnez **OK** dans l'écran Extraction Deck Verification (Vérification de la plateforme d'extraction).

24. Observez le système ML STAR pendant les étapes automatisées.



Vous devez invalider manuellement les débordements d'échantillons non détectés par le système avant la contamination des puits voisins.

25. Après la dernière étape de création du vide, retirez la plaque de fixation de l'ADN et nettoyez la surface inférieure avec de l'alcool éthylique à 70 %.
26. Scellez tous les puits ouverts de la plaque de fixation de l'ADN et placez cette dernière sur la plaque à puits profonds vide de plasma final.
27. Centrifugez l'assemblage des plaques de fixation de l'ADN et de plasma final à 5 600 × g pendant 10 minutes avec le frein activé.
28. Sélectionnez **OK**.
29. Pendant la centrifugation de la plaque de fixation de l'ADN, terminez le nettoyage du système de vide :
 - a. Retirez le collecteur pour le système de vide, puis sélectionnez **OK**.
 - b. Attendez que l'élimination automatisée des déchets soit terminée.
 - c. Nettoyez le collecteur pour le vide et l'intérieur du système de vide avec de l'alcool éthylique à 70 % et remplacez ensuite le collecteur pour le vide.
 - d. Cochez la case **Manifold is on Vacuum** (Collecteur sur vide) pour lancer le transfert de la plaque d'élution sur le collecteur pour le vide, puis sélectionnez **OK**.
30. Après la centrifugation, descellez les puits remplis d'échantillons sur la plaque de fixation de l'ADN.
31. Placez la plaque de fixation de l'ADN en haut de la plaque d'élution de l'ADN acellulaire qui se trouve sur le collecteur pour le vide.
32. Chargez la plaque de fixation de l'ADN en plaçant le code à barres vers la droite, puis sélectionnez **OK**.
33. Observez le système ML STAR pendant les étapes automatisées.
34. Après l'étape d'incubation, cochez la case **Plates are assembled as indicated** (Les plaques sont assemblées comme indiqué). Confirmez que l'assemblage des plaques de fixation de l'ADN acellulaire et d'élution de l'ADN acellulaire sont sur une base de support (si requis par la centrifugeuse).
35. Scellez les puits non couverts sur la plaque de fixation de l'ADN.
36. Centrifugez à 5 600 × g pendant 2 minutes en maintenant le frein activé, puis sélectionnez **OK**.
37. Inspectez visuellement la plaque d'élution de l'ADN acellulaire pour que les volumes dans les puits soient uniformes.

Le volume voulu est d'environ 55 µl.
38. Scellez et conservez la plaque d'élution de l'ADN acellulaire pour la préparation des bibliothèques.
39. Lorsque le gestionnaire de flux de travail vous avertira, assurez-vous que la plateforme de chargement du système ML STAR n'est pas entravée afin de permettre au système ML STAR de décharger les porteurs.
40. Sélectionnez **Unload** (Décharger) pour décharger la plateforme.
41. Déchargez tous les porteurs, nettoyez la plateforme du système ML STAR, puis sélectionnez **OK**.
42. Entrez les commentaires sur les puits touchés, puis sélectionnez **OK**.
43. Effectuez l'une des opérations suivantes :
 - Pour passer à l'étape de préparation des bibliothèques, sélectionnez **Yes** (Oui).
 - Pour quitter, sélectionnez **Exit** (Quitter).

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Si vous arrêtez, scellez la plaque d'éluion de l'ADN acellulaire et entreposez-la pendant tout au plus 7 jours entre -25 et -15 °C.

Préparation des librairies

Préparation

1. Examinez visuellement les boîtes de préparation des librairies et d'accessoires pour confirmer que les trousseaux ne sont pas périmés.
2. Préparez les réactifs suivants. Inscrivez le nom des réactifs sur les tubes réservoirs et les réservoirs à puits profonds.

Réactif	Stockage	Instructions
A-Tailing Mix (Mélange d'extension homopolymérique A)	-25 à -15 °C	Dégelez à la température ambiante. Agitez pour mélanger, puis centrifugez brièvement.
cfDNA Elution Plate (Plaque d'éluion de l'ADN acellulaire)	-25 à -15 °C	Si la plaque était entreposée, confirmez qu'elle ne l'était pas pendant plus de 7 jours et décongelez à la température ambiante. Agitez à 1 500 tr/min pendant 1 minute. Centrifugez à 1 000 × g pendant 20 secondes.
End Repair Mix (Mélange de réparation des extrémités)	-25 à -15 °C	Dégelez à la température ambiante. Agitez pour mélanger.
Hybridization Buffer (Tampon d'hybridation)	-25 à -15 °C	Dégelez à la température ambiante. Agitez pour mélanger. Entreposez de nouveau après l'utilisation.
Ligation Mix (Mélange de ligation)	-25 à -15 °C	Dégelez à la température ambiante. Agitez pour mélanger, puis centrifugez brièvement.
NIPT DNA Adapter Plate (Plaque d'adaptateur d'ADN DPNI)	-25 à -15 °C	Dégelez à la température ambiante. Agitez pour mélanger. Centrifugez à 1 000 × g pendant 20 secondes.
Resuspension Buffer (Tampon de resuspension)	2 à 8 °C	Agitez pour mélanger. Entreposez de nouveau après l'utilisation.
Sample Purification Beads (Billes de purification d'échantillon)	2 à 8 °C	Laissez reposer pendant 30 minutes pour amener à la température ambiante. Agitez vigoureusement avant chaque utilisation. Mélangez par agitation ou inversion jusqu'à ce que toutes les billes soient en suspension et que le mélange soit homogène.



ATTENTION

Lorsque vous descellez la plaque d'adaptateur d'ADN DPNI, faites preuve d'extrême prudence pour éviter la contamination croisée due à l'aérosol entre les puits. Ceci pourrait causer des résultats incorrects.

3. Si la plaque d'éluion de l'ADN acellulaire a été conservée congelée, préparez-la comme suit.
 - a. Décongelez à température ambiante.
 - b. Agitez à 1 500 tr/min pendant 1 minute.
 - c. Centrifugez à 1 000 × g pendant 20 secondes.
4. Écrivez « Librairies » sur l'étiquette d'une nouvelle plaque à embase pleine et collez un code à barres sur la plaque.
5. Préparez de l'alcool éthylique à 80 % à partir d'alcool éthylique absolu. Combinez 40 ml d'alcool éthylique à 100 % et 10 ml d'eau sans DNase ni RNase. Inversez pour mélanger.
6. Assurez-vous que la commande thermique du système ML STAR est activée.

Dilution des enzymes

1. Combinez un mélange d'extension homopolymérique A et un tampon de resuspension dans un tube à bouchon vissé. Agitez pour mélanger, puis centrifugez brièvement.

Taille du lot d'échantillons	Mélange d'extension homopolymérique A (µl)	Tampon de resuspension (µl)
24, 48	900	1 200
96	1 800	2 400

2. Combinez un mélange de ligation et un tampon de resuspension dans un tube à bouchon vissé. Agitez pour mélanger, puis centrifugez brièvement.

Taille du lot d'échantillons	Mélange de ligation (µl)	Tampon de resuspension (µl)
24, 48	230	1 713
96	440	3 278

Procédure

1. Sélectionnez **OK** pour commencer la préparation des librairies. Si la méthode **VeriSeq NIPT Method** n'est pas déjà ouverte :
 - a. Ouvrez l'AppLauncher (Lanceur d'application) et sélectionnez **VeriSeq NIPT Method** (Méthode DPNI VeriSeq).
 - b. Entrez l'identifiant du lot et le nom de l'utilisateur, puis sélectionnez **OK**.

2. Confirmez que les consommables suivants sont préparés comme il est indiqué à l'écran Reagent Preparation (Préparation des réactifs) :
 - Mélange d'extension homopolymérique A, mélange de ligation et alcool éthylique à 80 %
 - Billes de purification d'échantillon, mélange de réparation des extrémités et plaque d'adaptateur d'ADN DPNI
3. Cochez les cases, puis sélectionnez **OK**.
4. Balayez les codes à barres de la boîte de préparation de librairies.
5. Entrez le nom de l'utilisateur ou les initiales du préparateur des réactifs, puis sélectionnez **OK**.
6. Balayez les codes à barres de la boîte d'accessoires.
7. Entrez le nom de l'utilisateur ou les initiales du préparateur des réactifs, puis sélectionnez **OK**.
8. Chargez les embouts sur les porteurs d'embouts comme suit, puis sélectionnez **OK** pour chacun des porteurs.

Taille du lot d'échantillons	Type de porteur	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24	Embout	1 à 6	Embouts, 50 µl	1
		7 à 12	Embouts, 300 µl	1, 2
48	Embout	1 à 6	Embouts, 50 µl	1, 2
		7 à 12	Embouts, 300 µl	1, 2, 3, 4
96	Embout	1 à 6	Embouts, 50 µl	1, 2, 3, 4
		7 à 12	Embouts, 300 µl	1, 2, 3, 4, 5

9. Si vous arrêtez le protocole après l'extraction d'ADN acellulaire, chargez les embouts comptés dans les porteurs d'embouts comme suit.

Taille du lot d'échantillons	Type de porteur	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48, 96	Embout	49 à 54	Embouts, 1 000 µl	1
			Embouts, 300 µl	2
			Embouts, 50 µl	3

10. Entrez l'emplacement du premier embout pour chacun des supports d'embouts, sélectionnez **OK**.

11. Confirmez que les codes à barres sont collés, chargez les plaques (code à barres orienté vers la droite) sur le porteur de plaques comme suit, puis sélectionnez **OK**.

Taille du lot d'échantillons	Type de porteur	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48, 96	Multiflex	19 à 24	Plaque d'éluion de l'ADN acellulaire avec un code à barres	1
			Plaque d'adaptateur d'ADN DPNI avec un code à barres	2
			Nouvelle plaque à embase pleine de 96 puits, librairies avec un code à barres	3
			Nouvelles plaques à embase pleine de 96 puits	4, 5

12. Chargez le porteur à puits profonds comme suit, puis sélectionnez **OK**.

Taille du lot d'échantillons	Type de porteur	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48, 96	Puits profond	39 à 44	50 ml d'alcool éthylique à 80 % dans un réservoir à puits profonds	1
			Nouvelles plaques à embase pleine de 96 puits	2, 3, 4, 5

13. Chargez les bacs de réactifs sur le porteur de réactifs comme suit, puis sélectionnez **OK**.

Taille du lot d'échantillons	Type de porteur	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48, 96	Réactif	47	Mélange de réparation des extrémités, 2,5 ml	1
			Mélange d'extension homopolymérique A préparé (volume total)	2
			Mélange de ligation préparé (volume total)	3
			Billes de purification d'échantillon, 10 ml	4
			Tampon d'hybridation, 12 ml	5

14. Conservez le reste des 12 ml du tampon d'hybridation (HT1) dans le récipient pour le regroupement.

15. Assurez-vous que les porteurs, le matériel de laboratoire et les réactifs sont chargés correctement, puis sélectionnez **OK** à l'écran Library Deck Verification (Vérification de la plateforme de librairies).
16. Attendez que la vérification automatique du volume de réactifs soit terminée.
17. Observez le système ML STAR pendant les étapes automatisées.
18. Lorsque le gestionnaire de flux de travail vous avertira, assurez-vous que la plateforme de chargement du système ML STAR n'est pas entravée afin de permettre au système ML STAR de décharger les porteurs.
19. Sélectionnez **Unload** (Décharger) pour décharger la plateforme.
20. Inspectez la plaque de librairies pour que les volumes dans les puits soient uniformes.



ATTENTION

Si les volumes des puits ne sont pas uniformes, les échantillons risquent de produire des résultats inexacts.

21. Si elle doit être entreposée, scellez et conservez la plaque de librairies.
22. Déchargez les porteurs, nettoyez la plateforme, puis sélectionnez **OK**.
23. Entrez les commentaires sur les puits touchés, puis sélectionnez **OK**.
24. Effectuez l'une des opérations suivantes :
 - Pour passer à la quantification des librairies, sélectionnez **Yes** (Oui).
 - Pour quitter, sélectionnez **Exit** (Quitter).

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Si vous arrêtez, scellez la plaque de librairies avant de l'entreposer. La plaque de librairies demeure stable jusqu'à 7 jours après la date de préparation, à une température entre -25 et -15 °C.

Quantification des librairies

Préparation

1. Préparez les réactifs suivants :

Réactif	Stockage	Instructions
DNA Quantification Reagent (Réactif pour quantification d'ADN)	2 à 8 °C	Protégez le réactif de la lumière. Décongelez à température ambiante pendant de 30 à 150 minutes. (nous vous recommandons de retirer le réactif au début de la procédure de préparation des librairies). Agitez pour mélanger, puis centrifugez brièvement.

Réactif	Stockage	Instructions
DNA Quantification Standard (Standard de quantification d'ADN)	2 à 8 °C	Agitez pour mélanger, puis centrifugez brièvement.
Resuspension Buffer (Tampon de resuspension)	2 à 8 °C	Agitez pour mélanger.

2. Si la plaque de librairies a été conservée congelée, préparez-la comme suit.
 - a. Si elle était entreposée, confirmez qu'elle ne l'était pas pendant plus de 7 jours et décongelez-la à la température ambiante.
 - b. Agitez pour mélanger.
 - c. Centrifugez à 1 000 x g pendant 1 minute.
3. Mettez le fluorimètre sous tension 10 minutes avant l'utilisation.
4. Collez un code à barres de plaque sur une nouvelle plaque de 384 puits.
5. Collez un code à barres de plaque sur une nouvelle plaque à embase pleine.

Procédure

1. Sélectionnez **OK** pour commencer la quantification.
2. Si la méthode VeriSeq NIPT Method n'est pas déjà ouverte :
 - a. Ouvrez l'AppLauncher (Lanceur d'application) et sélectionnez **VeriSeq NIPT Method** (Méthode DPNI VeriSeq).
 - b. Entrez l'identification du lot et le nom de l'utilisateur, puis sélectionnez **OK**.
3. Balayez les codes à barres de la boîte d'accessoires.
4. Entrez le nom de l'utilisateur ou les initiales du préparateur des réactifs, puis sélectionnez **OK**.
5. Chargez les embouts sur le porteur d'embouts comme suit, sélectionnez **OK**.

Taille du lot d'échantillons	Type de porteur	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48	Embout	1 à 6	Support d'embouts, 300 µl	1
			Support d'embouts, 50 µl	2
96	Embout	1 à 6	Support d'embouts, 300 µl	1
			Support d'embouts, 50 µl	2, 3

6. Confirmez que les codes à barres sont apposés.
7. Si nécessaire, descellez la plaque de librairies.
8. Chargez les plaques (code à barres orienté vers la droite) sur le porteur Multiflex comme suit, puis sélectionnez **OK**.

Taille du lot d'échantillons	Type de porteur	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48, 96	Multiflex	19 à 24	Nouvelles plaques à embase pleine avec un code à barres	1
			Nouvelle plaque de 384 puits avec un code à barres	2
			Plaque de librairies avec un code à barres	3
			Nouvelles plaques à embase pleine de 96 puits	4, 5

9. Chargez les tubes de réactifs sans bouchon sur le porteur de tubes comme suit, puis sélectionnez **OK**.

Taille du lot d'échantillons	Type de porteur	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48, 96	Tube	46	Standard de quantification d'ADN	1
			Réactif pour quantification d'ADN	2

10. Chargez les bacs de réactifs sur le porteur de réactifs comme suit, puis sélectionnez **OK**.

Taille du lot d'échantillons	Type de porteur	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48, 96	Réactif	47	Nouveau tube de réactif (vide)	1
			Tampon de resuspension, 16 ml	2

11. Si vous arrêtez le protocole après la préparation des librairies, chargez les embouts comptés dans les porteurs d'embouts comme suit.

Taille du lot d'échantillons	Type de porteur	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48, 96	Embout	49 à 54	Embouts, 1 000 µl	1
			Embouts, 300 µl	2
			Embouts, 50 µl	3

12. Entrez l'emplacement du premier et du dernier embouts pour chacun des supports d'embouts, sélectionnez **OK**.
13. Assurez-vous que les porteurs, le matériel de laboratoire et les réactifs sont chargés correctement, puis sélectionnez **OK** dans l'écran Quant Deck Verification (Vérification de la plateforme de quantification).
14. Attendez que la vérification automatique du volume de réactifs soit terminée.
15. Observez le système ML STAR pendant les étapes automatisées.
16. Lorsque le gestionnaire de flux de travail vous avertira, assurez-vous que la plateforme de chargement du système ML STAR n'est pas entravée afin de permettre au système ML STAR de décharger les porteurs.
17. Sélectionnez **Unload** (Décharger) pour décharger la plateforme.
18. Déchargez la plaque de librairies.
- Inspectez la plaque pour que les volumes dans les puits soient uniformes.
 - Scellez la plaque de librairies et entreposez-la à température ambiante jusqu'à ce que l'analyse des données fluorimétriques soit terminée.
19. Déchargez les plaques de 96 puits restantes et assurez-vous que les volumes de tous les puits sont uniformes.
- Des erreurs évidentes de volumes peuvent indiquer un problème avec les étapes liées au pipetage.
20. Déchargez la plaque de 384 puits et assurez-vous qu'il y ait du liquide dans les puits appropriés.
21. Scellez la plaque avec un opercule en aluminium.
22. Centrifugez à 1 000 × g pendant 20 secondes.
23. Incubez à température ambiante pendant 10 minutes, à l'abri de la lumière.
24. Déchargez tous les porteurs.
25. Nettoyez la plateforme du système ML STAR, puis sélectionnez **OK**.



ATTENTION

Ne jetez pas les réactifs de quantification avant d'avoir les données en main. Vous aurez besoin des réactifs si vous devez reprendre la quantification.

26. Après l'incubation, retirez l'opercule en aluminium et chargez la plaque de 384 puits sur le lecteur de microplaques. Veillez à utiliser la plaque d'adaptateur mauve (référence : 0310-4336) fournie par Molecular Devices ou équivalent le cas échéant, selon l'instrument utilisé.
 - Assurez-vous que A1 se trouve dans le coin supérieur gauche lorsque vous le chargez.
27. Double-cliquez sur le modèle VeriSeq NIPT pour l'ouvrir dans SoftMax Pro.
28. Sélectionnez **New Experiment** (Nouvelle expérience) dans l'onglet Home (Accueil).
29. Sélectionnez **Read** (Lecture).
30. Exportez les données dans un fichier .XML, comme suit :
 - a. Faites un clic droit sur **Plate** (Plaque), puis sélectionnez **Rename** (Renommer).
 - b. Balayez le code à barres de la plaque de quantification, puis sélectionnez **OK**.
 - c. Dans le coin supérieur gauche de l'écran, sélectionnez l'icône de la plaque, puis sélectionnez **Export** (Exporter) dans le menu.
 - d. Cochez la case **Expt name**, réglez l'option de la date de la plaque à Raw (Brute), réglez le format du fichier sortant à XML, puis sélectionnez **OK**.
 - e. Définissez le chemin et le nom du fichier de sortie, puis sélectionnez **Save** (Enregistrer).L'ordinateur Hamilton doit être en mesure d'accéder à l'emplacement du fichier. N'utilisez pas d'espaces dans le nom ou le chemin du fichier.

Analyse

1. Sur le système ML STAR, dans l'écran Scanner Information (Information du scanner), entrez l'identifiant du fluorimètre.
2. Entrez les commentaires sur l'analyse du fluorimètre, puis sélectionnez **OK**.
3. Allez dans le dossier de quantification *.xml qui contient les données du fluorimètre, puis sélectionnez **OK**.
4. Passez en revue les résultats de l'analyse de la courbe standard et de la concentration des échantillons, puis sélectionnez **OK**.
5. Si vous devez rebalayer la plaque, sélectionnez **Rescan** (Rebalayer).

Les échantillons ont une durée de vie limitée et ils sont sensibles à la lumière. Lorsque nécessaire, effectuez immédiatement un nouveau balayage.
6. Entrez les commentaires sur les puits touchés, puis sélectionnez **OK**.
7. Évaluez les résultats et poursuivez comme suit.
 - Si les résultats réussissent la spécification, passez à l'étape [Regroupement des bibliothèques, page 41](#). Pour les caractéristiques, consultez les mesures quantitatives de CQ et le tableau des limites dans le *Guide du VeriSeq NIPT Solution v2 Software (document n° 1000000067940)*.
 - Si les résultats échouent la spécification, le système met fin à la méthode. Répétez les procédures de quantification en commençant par la [Préparation, page 36](#).

8. Effectuez l'une des opérations suivantes :

- Pour passer à l'étape [Regroupement des librairies, page 41](#), sélectionnez **Yes** (Oui).
- Pour quitter, sélectionnez **Exit** (Quitter).

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Si vous arrêtez, scellez la plaque de librairies avant de l'entreposer. La plaque de librairies demeure stable pendant un entreposage de tout au plus 7 jours cumulatifs entre -25 et -15 °C.

Regroupement des librairies

Préparation

1. Préparez les réactifs suivants :

Réactif	Stockage	Instructions
Hybridization Buffer (Tampon d'hybridation)	-25 à -15 °C	Dégelez à la température ambiante. Agitez pour mélanger. Entreposez de nouveau après l'utilisation.

2. Si la plaque de librairies a été conservée congelée, préparez-la comme suit.
 - a. Si elle était entreposée, confirmez qu'elle ne l'était pas pendant plus de 7 jours et décongelez-la à la température ambiante.
 - b. Agitez à 1 500 tr/min pendant 1 minute.
 - c. Centrifugez à 1 000 × g pendant 20 secondes.
 - d. Pipettez pour mélanger.
3. Écrivez « Groupement A » sur l'étiquette d'un tube de groupement vide. Pour 96 échantillons, écrivez « Groupement B » sur l'étiquette d'un deuxième tube de groupement vide.
4. Sauvegardez le programme de dénaturation suivant sur le thermocycleur doté d'un couvercle chauffant.
 - a. Choisissez l'option Preheated Lid (Couvercle préchauffé) et réglez-la à 102 °C.
 - b. Définissez le volume de réaction à 50 µl.
 - c. Définissez la vitesse de variation de température au maximum (≥ 2 °C par seconde).
 - d. Incubez à 96 °C pendant 10 minutes, puis à 4 °C pendant 5 secondes.
 - e. Maintenez à 4 °C.

Procédure

1. Placez la plaque de librairies sur le thermocycleur préprogrammé et lancez le programme de dénaturation. Ne dénaturez pas la plaque de librairies avant que la quantification ait passé les mesures de CQ parce que vous pourriez vouloir reprendre la quantification.
2. Centrifugez la plaque de librairies à 1 000 × g pendant 20 secondes.
3. Sélectionnez **OK** pour commencer le regroupement des librairies.

4. Si la méthode VeriSeq NIPT Method n'est pas ouverte :
 - a. Ouvrez l'AppLauncher (Lanceur d'application) et cliquez sur **VeriSeq NIPT Method** (Méthode DPNI VeriSeq).
 - b. Entrez l'identification du lot et le nom de l'utilisateur, puis sélectionnez **OK**.
5. Sélectionnez la concentration du groupement, puis sélectionnez **OK**.
La densité des amplifiats visée se situe entre 220 et 260 K/mm².

REMARQUE Une augmentation des concentrations de groupement et/ou des volumes de groupement pourrait être nécessaire pour les lots de 24 échantillons afin de maintenir des densités d'amplifiats similaires à celles obtenues avec les lots de 48/96 échantillons.

6. Si le Workflow Manager (Gestionnaire de flux de travail) vous le demande, effectuez l'une des opérations suivantes :
 - Pour charger une feuille d'échantillons, sélectionnez la feuille d'échantillons associée au lot, puis sélectionnez **Load** (Charger).
 - Pour utiliser les valeurs par défaut du système pour les types d'échantillons restants, le rapport sur le sexe ou le type de dépistage, sélectionnez **Use Default** (utiliser les valeurs par défaut) pour chacun des paramètres.
Pour obtenir des renseignements sur la création d'une feuille d'échantillons, consultez le *Guide du logiciel VeriSeq NIPT Solution v2 (document n° 1000000067940)*.
7. Sélectionnez **Start** (Commencer) pour lancer le minuteur afin de dénaturer la plaque.
8. Chargez les embouts dans les porteurs d'embouts comme suit.

Taille du lot d'échantillons	Type de porteur	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48, 96	Embout	7 à 12	Embouts avec filtre, 50 µl	1

9. Chargez la plaque de librairies dénaturées (code à barres orienté vers la droite) sur le porteur Multiflex comme suit, puis sélectionnez **OK**.

Taille du lot d'échantillons	Type de porteur	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48, 96	Multiflex	19 à 24	Plaque de librairies dénaturées (avec un code à barres)	1

10. Chargez les tubes de groupement sur le porteur de tubes comme suit, puis sélectionnez **OK**.

Taille du lot d'échantillons	Type de porteur	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48	Tube	46	Nouveau tube de 2 ml, Groupement A	1
96	Tube	46	Nouveau tube de 2 ml, Groupement A	1
			Nouveau tube de 2 ml, Groupement B	2

11. Chargez les bacs de réactifs sur le porteur de réactifs comme suit, puis sélectionnez **OK**.

Taille du lot d'échantillons	Type de porteur	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48, 96	Réactif	47	Tampon d'hybridation, 3 ml	1

12. Chargez les embouts dans les porteurs d'embouts comme suit.

Taille du lot d'échantillons	Type de porteur	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48, 96	Embout	49 à 54	Embouts avec filtre, 1 000 µl	1
			Embouts avec filtre, 300 µl	2
			Embouts avec filtre, 50 µl	3

13. Entrez l'emplacement du premier et du dernier embouts pour chacun des supports d'embouts, sélectionnez **OK**.

14. Assurez-vous que les porteurs, le matériel de laboratoire et les réactifs sont chargés correctement.

15. À l'écran Pooling Deck Verification (Vérification de la plateforme de regroupement), sélectionnez **OK**.

16. Observez le système ML STAR pendant les étapes automatisées.

17. Entrez les commentaires sur les puits touchés, puis sélectionnez **OK**.

18. Lorsque le gestionnaire de flux de travail vous avertira, assurez-vous que la plateforme de chargement du système ML STAR n'est pas entravée afin de permettre au système ML STAR de décharger les porteurs.

19. Sélectionnez **Unload** (Décharger) pour décharger la plateforme.

20. Déchargez le porteur de tubes.

21. Bouchez chacun des tubes de groupement, agitez, puis centrifugez brièvement.

22. Sélectionnez **OK**.

23. Séquencez les librairies dès que possible après le regroupement. Scellez la plaque de librairies et entreposez-la entre -25 °C et -15 °C jusqu'à 7 jours pour permettre un regroupement.

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Si vous arrêtez, bouchez les tubes de groupement et entreposez-les pendant tout au plus 7 jours entre -25 et -15 °C.

Préparation des bibliothèques regroupées pour le séquençage

Préparation

1. Préparez les réactifs suivants :

Réactif	Stockage	Instructions
Tubes de groupement	-25 à -15 °C	S'ils étaient entreposés, décongelez-les à la température ambiante. Agitez brièvement. Centrifugez brièvement.

2. Préparez le système de séquençage nouvelle génération en remplissant les champs suivants dans le Local Run Manager VeriSeq NIPT Module :
 - a. Run Name (Nom de l'analyse)
 - b. [Facultatif] Run Description (Description de l'analyse)
 - c. Pool Barcode (Code à barres du groupement)

**ATTENTION**

Le code à barres du groupement entré dans le module LRM doit correspondre à celui entré dans le gestionnaire de flux de travail. Le logiciel d'analyse rejette les configurations d'analyse incorrectes et exige un reséquençage.

Pour obtenir plus de renseignements sur l'utilisation du Local Run Manager VeriSeq NIPT Module, consultez le *Guide du logiciel VeriSeq NIPT Solution v2 (document n° 1000000067940)*.

Procédure

1. Combinez les volumes suivants à la cartouche de réactifs, puis mélangez avec une pipette.
 - Tampon d'hybridation (900 µl)
 - Groupement A 450 µl (450 µl)
2. Procédez au séquençage au moyen d'un système de séquençage nouvelle génération, conformément au guide du système. Guide de référence de votre instrument de séquençage nouvelle génération. Pour le NextSeq 550Dx, consultez le *Guide de référence de l'instrument NextSeq 550Dx (document n° 1000000009513)* ou la *notice d'accompagnement du NextSeq 550Dx (document n° 1000000043133)*.
3. Confirmez que la configuration de l'analyse est correcte lorsque le système vous posera la question.

4. Si nécessaire, répétez cette procédure pour le groupement B.
 - Pour atteindre la gamme de densité des amplifiats, la plaque de bibliothèques peut être regroupée en utilisant une concentration de groupement différente sur l'instrument Hamilton. Le regroupement invalide le groupement initial.
 - D'un autre côté, le rapport de groupement de HT1 (450 µl + 900 µl) peut être modifié pour atteindre la gamme de densité des amplifiats visée.

Séquençage nouvelle génération

VeriSeq NIPT Solution v2 peut être utilisée avec un système de séquençage nouvelle génération comportant les caractéristiques suivantes :

- en mesure d'effectuer des lectures appariées 2 x 36;
- compatible avec les adaptateurs d'index dans le VeriSeq NIPT Sample Prep;
- chimie à deux canaux;
- production automatique de fichiers .BCL (données brutes provenant de l'appareil de séquençage);
- 400 millions de lectures appariées par analyse;
- compatible avec VeriSeq NIPT Assay Software v2.

L'instrument NextSeq 550Dx est compatible avec VeriSeq NIPT Solution v2.

Analyse des données de séquençage

Lorsque le séquençage est terminé, les données de séquençage sont automatiquement envoyées au VeriSeq NIPT Assay Software v2 aux fins d'analyse et de production de rapport. Le rapport comprend les classifications pour chacun des échantillons du lot et une évaluation de tous les indicateurs de l'analyse du CQ. L'analyse, de la fin du séquençage à l'obtention des résultats, prend environ 4 heures pour un lot de 48 échantillons. Pour obtenir des renseignements détaillés sur l'analyse de données et le fichier produit, consultez le *Guide du VeriSeq NIPT Solution v2 Software (document n° 1000000067940)*.

Interprétation des résultats

L'algorithme de VeriSeq NIPT Solution v2 utilise un modèle statistique sophistiqué qui combine plusieurs types différents de renseignements provenant de la collection de fragments de bibliothèque séquencés à lecture appariée. Ce modèle est utilisé pour détecter les régions du génome qui sont sous ou surreprésentées dans la bibliothèque de chaque échantillon. Mais surtout, ce modèle permet de déterminer si le degré de sous ou surreprésentation est quantitativement cohérent à un événement d'aneuploïdie dans le génome fœtal en ce qui a trait au niveau de fraction fœtale estimé dans la bibliothèque.

Pour tous les chromosomes, les données de séquençage à lecture appariée sont alignées sur le génome de référence (HG19). Les lectures alignées non dupliquées uniques sont regroupées dans des compartiments de 100 kb. Les comptages des compartiments correspondants sont ajustés pour le biais GC et selon la couverture

génomique spécifique à la région établie précédemment. En utilisant ces comptages de compartiments normalisés, les scores statistiques sont obtenus pour chaque autosome en comparant les régions de couverture pouvant être affectées par l'aneuploïdie avec le reste des autosomes. Un logarithme de rapport de vraisemblance (LRV) est calculé pour chaque échantillon en tenant compte de ces scores basés sur la couverture et de la fraction fœtale estimée. Le LRV correspond à la probabilité qu'un échantillon soit affecté, compte tenu de la couverture observée et de la fraction fœtale par rapport à la probabilité qu'un échantillon ne soit pas affecté compte tenu de la même couverture observée. Le calcul de ce rapport prend également en compte l'incertitude estimée dans la fraction fœtale. Pour les calculs ultérieurs, le logarithme naturel du ratio est utilisé. Le logiciel de test évalue le LRV pour chaque chromosome ciblé et chaque échantillon pour fournir la détermination d'aneuploïdie.

Pendant la création du lot, vous devez définir le type d'échantillon (simple ou jumeau), le type de dépistage (de base ou pangénomique) et le signalement du chromosome sexuel (oui, non et ACS) désiré pour chaque échantillon. Ensemble, ces options permettent de déterminer quels renseignements sont signalés pour chaque échantillon.

Pour tous les types d'échantillons, le type de dépistage permet de déterminer quelles anomalies autosomiques sont signalées. Pour le dépistage de base, seuls les événements de trisomie panchromosomique touchant les chromosomes 13, 18 et 21 sont signalés. Pour le dépistage pangénomique, la délétion ou la duplication chromosomique partielle ou panchromosomique de tout chromosome autosomique sont signalées. La longueur de la plus petite délétion ou duplication chromosomique partielle pouvant faire l'objet d'un signalement est de 7 Mb.

Pour les échantillons simples, vous pouvez désactiver la fonction de signalement des chromosomes sexuels. Vous pouvez aussi configurer l'appareil pour signaler les aneuploïdies chromosomiques sexuelles en indiquant ou non le sexe des échantillons euploïdes.

Pour les échantillons de jumeaux, si la valeur Yes (Oui) est sélectionnée pour le signalement des chromosomes sexuels, le résultat sera limité au signalement de la présence ou de l'absence d'un chromosome Y dans la bibliothèque. L'aneuploïdie des chromosomes sexuels ne peut pas être signalée dans les échantillons de jumeaux.

La mention ANOMALY DETECTED (anomalie détectée) indique que les dépistages des échantillons sont positifs pour une anomalie ou plus cohérents avec le type de dépistage sélectionné et l'option de signalement des chromosomes sexuels. Lorsqu'une anomalie est détectée, le rapport fournit une description de l'anomalie dans la note cytogénétique.

Le logiciel VeriSeq NIPT Assay Software v2 emploie des statistiques obtenues pendant le séquençage pour fournir une estimation de la fraction fœtale (EFF) pour chacun des échantillons. L'EFF est une estimation de la composante fœtale d'ADN acellulaire, laquelle est récupérée par le test et déclarée comme un pourcentage arrondi pour chacun des échantillons. L'écart-type moyen de cette estimation pour tous les échantillons est de 1,3 %. L'EFF ne doit pas être utilisée seule pour exclure des échantillons au moment de déclarer les résultats.

Pour produire des définitions de représentation chromosomique, le VeriSeq NIPT Assay Software v2 utilise un test de fiabilité individuel d'aneuploïdie fœtale (iFACT, individualized Fetal Aneuploidy Confidence Test), un indicateur de seuil dynamique qui indique si le système a généré une couverture de séquençage suffisante,

d'après la fraction fœtale estimée pour chaque échantillon. Les signalements négatifs sont seulement indiqués si l'échantillon répond au seuil du test iFACT. Si un échantillon n'atteint pas ce seuil, l'évaluation de CQ affiche FAILED iFACT (échec du test iFACT) et le système ne génère aucun résultat.

Outre le test iFACT, le logiciel VeriSeq NIPT Assay Software v2 évalue plusieurs autres indicateurs de CQ au cours de l'analyse. Les indicateurs supplémentaires comprennent les évaluations de l'uniformité de la couverture des régions génomiques de référence et la répartition des longueurs de fragments d'ADN acellulaire. L'évaluation de CQ affiche soit un avertissement du CQ, soit un échec du CQ pour tout indicateur situé hors de la plage acceptable. En cas d'échec du CQ, le système ne génère pas de résultat pour l'échantillon. En cas d'échec du CQ d'un échantillon, celui-ci peut être retraité tant qu'il y a suffisamment de volume plasmatique dans le tube de prélèvement.

VeriSeq NIPT Solution v2 génère les données à utiliser dans un rapport final. Elle ne produit pas de rapport final pour le patient. Les clients sont responsables de l'élaboration et du contenu du rapport final à remettre au médecin au point de service. Illumina n'est pas responsable de l'exactitude des mots utilisés dans le rapport final du client.



ATTENTION

Vérifiez les estimations de la fraction fœtale de tous les échantillons. Si les estimations de la fraction fœtale sont similaires pour tous les échantillons d'un même cycle, une fusion des échantillons peut s'être produite et avoir eu un impact sur les résultats. Contactez l'assistance technique d'Illumina pour obtenir de l'aide au dépannage.

Caractéristiques de performance

Les données suivantes décrites dans les sections sur la performance clinique et la performance analytique ont été générées au moyen des protocoles et des matières décrits dans le Mode d'emploi qui commence par le plasma. Toutes les données de séquençage pour cette section ont été générées par un système de séquençage NextSeq 500/550 ou un système de séquençage NextSeq 550Dx comportant les caractéristiques suivantes :

	NextSeq 500/550	NextSeq 550Dx
Logiciel sur instrument	NextSeq Control Software 4.0	NextSeq Operating Software 1.3
Version de la trousse de réactifs	Trousse de réactifs NextSeq 500/550 High Output v2.5 (75 cycles)	Trousse de réactifs NextSeq 550Dx High Output v2.5 (75 cycles)
Méthode de séquençage	Analyse de séquençage à lecture appariée de 2 x 36 en mode de débit élevé	Analyse de séquençage à lecture appariée de 2 x 36 en mode de débit élevé

Étude clinique

La précision clinique de VeriSeq NIPT Solution v2 a été démontrée en évaluant des échantillons de plasma provenant de femmes enceintes d'un seul enfant ou de jumeaux. Les échantillons ont été obtenus à partir de banques d'échantillons de plasma anonymisés qui avaient été obtenus auparavant à partir d'échantillons de sang entier périphériques. Plus de 45 000 échantillons ont été pris en compte pour leur inclusion dans l'étude. Ces échantillons ont fait l'objet d'un dépistage prénatal préalable pour les aneuploïdies chromosomiques fœtales et les délétions et duplications partielles de 7 Mb ou plus. Tous les échantillons provenant de grossesses atteintes, et un sous-groupe d'échantillons consécutifs, étaient admissibles à une analyse si les résultats cliniques étaient disponibles et si les critères d'inclusion des échantillons étaient respectés. Au total, 2 335 échantillons ont été utilisés dans l'ensemble d'analyse. De ce nombre, 2 328 échantillons provenaient de grossesses simples et sept échantillons provenaient de grossesses gémellaires.

De ces échantillons, 28 (1,2 %, 28/2 335) ont échoué le CQ du test au premier essai pendant l'analyse des données de séquençage terminées :

- 27 échecs iFACT (un XO, 26 non atteints)
- Un échec lié à des données qui dépassaient les seuils attendus

Données démographiques et caractéristiques des grossesses

L'âge de la mère, l'âge gestationnel et le trimestre de la grossesse sont résumés au [Tableau 7](#) pour les échantillons ayant fait l'objet d'un dépistage du génome entier, y compris les échantillons mosaïques connus. La majorité (98 %) des échantillons de test représentent le premier trimestre de la grossesse.

Les données démographiques ont été analysées entre les cohortes de base et pangénomiques et il n'y avait aucune différence entre elles. Les données démographiques et les caractéristiques des grossesses étaient semblables, que la présence d'une mosaïque soit incluse ou non.

Tableau 7 Données démographiques et caractéristiques des grossesses

Statistiques sommaires	Génome entier (y compris les mosaïques connues)
Nombre d'échantillons	2 307*
Âge maternel – années	
Moyenne	35,08
Écart-type	4,04
Médiane	34,95
25e percentile, 75e percentile	32,31, 37,79
Minimum, maximum	20,22, 53,02
Âge gestationnel à la prise de sang – semaines	
Moyenne	10,93
Écart-type	1,20
Médiane	10,57
25e percentile, 75e percentile	10,29, 11,14
Minimum, maximum	10,00, 27,86
Trimestre de la grossesse – n (%)	
< Premier (< 14 semaines)	2 252 (98 %)
Deuxième	54 (2 %)
Troisième (≥ 27 semaines)	1 (0 %)

* Les échantillons finaux présentés contenaient sept jumeaux.

Performance clinique

Les résultats du test de VeriSeq NIPT Solution v2 ont été comparés aux résultats de l'évaluation standard de la référence clinique. Tous les échantillons de l'étude comportaient des résultats de l'évaluation standard de la référence clinique (vérité clinique) liés à la présence d'une aneuploïdie chromosomique fœtale et de délétions et duplications partielles de 7 Mb ou plus. Le résultat de l'évaluation standard de la référence clinique des échantillons utilisés dans cette étude dépendait des résultats de l'analyse chromosomique ou de l'examen physique du nouveau-né ayant un dépistage négatif au DPNI basé sur le SNG. Du personnel de recherche qualifié a effectué la classification des données relatives à la norme de référence clinique conformément au document de codage médical du promoteur.

Les méthodes d'analyse chromosomique comprenaient le caryotypage, l'hybridation in situ en fluorescence (FISH, fluorescence in situ hybridization) ou l'hybridation génomique comparative des chromosomes en microréseau (CMA, chromosome microarray). L'analyse chromosomique a été effectuée sur des échantillons de sang périphérique ou de salive de nouveau-nés ou de bébés, de produits de conception (PDC), d'amniocytes, de villosités chorales, de tissus placentaires ou de sang de cordon ombilical postnatal.

Le mosaïcisme est défini comme étant la présence de deux populations cellulaires ou plus de composition chromosomique différente chez une même personne. Les populations cellulaires proviennent du même zygote. Le type et le degré de mosaïcisme varient et dépendent du moment de la réalisation de la mosaïque pendant l'embryogenèse et le développement fœtal. Différents types de mosaïcisme apparaissent dans les diagnostics prénataux sur la distribution de populations cellulaires normales ou anormales sur le cytotrophoblaste, le mésenchyme ou le fœtus¹⁰. Bien que le mosaïcisme puisse être observé avec toute anomalie chromosomique, sa prévalence dans les trisomies rares est plus élevée que dans les trisomies des chromosomes 21, 18 et 13 (T21, T18 et T13)¹¹. Dans l'évaluation de la performance, les cas de mosaïcisme ont été inclus dans l'analyse du génome entier puisque l'objectif de ce type de dépistage pour ce test est de détecter les rares aneuploïdies autosomiques (RAA).

Performance du dépistage de base

Pour le dépistage de base, les anomalies comprennent la T21, T18 et T13. Au total, 2 243 échantillons simples et jumeaux ont été inclus dans l'analyse. Une trisomie T21 a été détectée correctement dans toutes les sept grossesses jumeaux, lesquelles ne sont donc pas mentionnées dans le tableau suivant.

Tableau 8 Sensibilité et spécificité de VeriSeq NIPT Solution v2 pour la détection des trisomies 21, 18 et 13 lors d'un dépistage de base pour des grossesses uniques (à l'exclusion des mosaïques connues)

	T21	T18	T13
Sensibilité	> 99,9 % (130/130)	> 99,9 % (41/41)	> 99,9 % (26/26)
IC bilatéral à 95 %	97,1 %, 100 %	91,4 %, 100 %	87,1 %, 100 %
Spécificité	99,90 % (1 982/1 984)	99,90 % (1 995/1 997)	99,90 % (2 000/2 002)
IC bilatéral à 95 %	99,63 %, 99,97 %	99,64 %, 99,97 %	99,64 %, 99,97 %

La performance du test pour le dépistage de base, comme le montre le [Tableau 8](#), est calculée en excluant un sous-groupe de 64 échantillons atteints de RAA, de délétions ou de duplications autosomiques partielles ou d'un mosaïcisme connu. Ces 64 échantillons comprenaient huit T21 et trois T18 en mosaïque. Il a été déterminé que cinq de ces onze échantillons étaient touchés par l'anomalie détectée par le logiciel VeriSeq NIPT Assay Software v2.

Performance du dépistage pangénomique

En ce qui concerne le dépistage pangénomique, les anomalies comprennent les trisomies, les monosomies et les délétions ou duplications partielles de 7 Mb ou plus. Les échantillons utilisés pour le dépistage pangénomique contenaient 36 échantillons comportant un mosaïcisme connu. Au total, 2 307 échantillons simples et jumeaux ont été analysés. Une anomalie du chromosome 21 (T21) a été détectée correctement dans toutes les sept grossesses jumeaux, lesquelles ne sont donc pas mentionnées dans le tableau suivant.

Performance du dépistage pangénomique pour toute anomalie

Tableau 9 Sensibilité et spécificité de VeriSeq NIPT Solution v2 pour la détection de toute anomalie lors du dépistage pangénomique (y compris les mosaïques connues)

	Sensibilité	Spécificité
Estimation de % (n/N)	95,5 % (318/333)	99,34 % (1 954/1 967)
IC bilatéral à 95 %	92,7 %, 97,3 %	98,87 %, 99,61 %

Performance du dépistage pangénomique pour les rares aneuploïdies autosomiques

Tableau 10 Sensibilité et spécificité de VeriSeq NIPT Solution v2 pour la détection des rares aneuploïdies autosomiques (RAA) lors du dépistage pangénomique (y compris les mosaïques connues)

	Sensibilité	Spécificité
Estimation de % (n/N)	96,4 % (27/28)	99,80 % (2 001/2 005)
IC bilatéral à 95 %	82,3 %, 99,4 %	99,49 %, 99,92 %

Performance du dépistage pangénomique pour les délétions ou les duplications partielles

Tableau 11 Sensibilité et spécificité de VeriSeq NIPT Solution v2 pour la détection des délétions et duplications partielles de 7 Mb ou plus lors du dépistage pangénomique (y compris les mosaïques connues)

	Sensibilité	Spécificité
Estimation de % (n/N)	74,1 % (20/27)	99,80 % (2 000/2 004)
IC bilatéral à 95 %	55,3 %, 86,8 %	99,49 %, 99,92 %

Différences de performance entre le dépistage de base et le dépistage pangénomique

La méthodologie de notation pour les trisomies courantes et les aneuploïdies chromosomiques sexuelles est la même pour le dépistage de base et le dépistage pangénomique. Le dépistage de base n'applique l'algorithme qu'aux T21, T18 et T13. Cependant, le dépistage pangénomique évalue toutes les trisomies ainsi que les RAA et les délétions et duplications partielles.

Il y a deux différences entre les rapports de performance du dépistage de base et du dépistage pangénomique. En premier lieu, les échantillons comprenant un cas de mosaïcisme connu à la fois pour les trisomies courantes et pour les RAA et les délétions et duplications partielles étaient inclus dans le dépistage pangénomique pour l'obtention de données sur la performance. En deuxième lieu, le dépistage pangénomique peut privilégier la détection d'une duplication ou d'une délétion partielle à celle d'une trisomie complète. La présence d'une trisomie complète en plus d'une duplication ou délétion partielle peut être vue en consultant le score RLV fourni dans le rapport complémentaire.

Inclusion des mosaïques dans le dépistage pangénomique

Le mosaïcisme est indiqué comme une limite pour ce test. En présence de mosaïcisme, le signal fœtal d'une anomalie est réduit et peut donc être plus difficile à détecter sans compromettre la spécificité globale du test. Cependant, comme le mosaïcisme est plus pertinent pour le contenu élargi, les échantillons avec mosaïcisme sont inclus dans le dépistage pangénomique.

Des 64 échantillons inclus dans le dépistage pangénomique, mais non dans le dépistage de base, 36 échantillons ont été définis comme ayant un mosaïcisme selon l'évaluation standard de la référence clinique. De ces 36 échantillons, 23 définitions correspondaient à la classification de l'évaluation standard de la référence clinique.

Détection des délétions ou duplications partielles par rapport aux aneuploïdies panchromosomiques

VeriSeq NIPT Solution v2 comporte des options de menu à la fois pour le dépistage de base et le dépistage pangénomique. Lors du dépistage de base, un résultat indiquant ANOMALY DETECTED (anomalie détectée) est seulement affiché lorsqu'une aneuploïdie complète est détectée sur les chromosomes 21, 18 ou 13, et si les critères de contrôle de la qualité sont respectés. Lors du dépistage pangénomique, le système détecte l'aneuploïdie dans tous les autosomes et les événements de délétion et duplication partielles d'au moins 7 Mb.

Lorsque vous utilisez le dépistage pangénomique, dans les cas où un événement relatif au chromosome entier et un événement relatif aux VNC dans le même chromosome dépassent le seuil LRV, le système privilégie un événement de délétion ou duplication partielle à la détection pangénomique si la taille de la délétion ou de la duplication partielle est inférieure ou égale à 75 % du chromosome sur lequel l'événement est détecté. Si la région de délétion ou duplication partielle détectée est supérieure à 75 % de la taille du chromosome, l'événement est rapporté comme étant une trisomie ou une monosomie complète du chromosome en entier dans le cas où le seuil LRV est également dépassé de manière simultanée pour le chromosome entier. Par conséquent, des délétions et duplications importantes qui touchent 75 % ou moins de la taille du chromosome peuvent indiquer une aneuploïdie panchromosomique.

Dans tous les échantillons, le score LRV de la classification panchromosomique est fourni dans le rapport complémentaire. Le score LRV doit être examiné en tenant compte du seuil précisé dans la [Probabilités de détection à 95 % pour les régions moyennes selon leur taille pour VeriSeq NIPT Solution v2, page 63](#) avant d'en interpréter le résultat. Par exemple, une définition de VNC où les scores LRV chromosomiques dépassant le seuil établi constitue une donnée supplémentaire permettant de conclure à une aneuploïdie panchromosomique. Consultez le [Tableau 12](#) pour voir un exemple.

Dans l'étude clinique, il y avait deux échantillons de grossesses uniques ayant des duplications très importantes (une sur le chromosome 21 et une sur le chromosome 18) qui étaient inférieures à 75 % de la taille relative du chromosome (voir le [Tableau 12](#)). Les deux événements ont été rapportés comme étant des duplications partielles plutôt qu'une trisomie complète pour ce chromosome. Les scores RVL pour ces événements étaient au-dessus du seuil représentatif d'un résultat atteint pour une trisomie complète. En cas de message de duplication partielle ou de trisomie complète, la prise en charge de suivi d'un signalement positif de DPNI offre le test de confirmation pour le patient par l'entremise d'un diagnostic prénatal.

Tableau 12 Exemples d'événements de duplication importante signalés lors du dépistage pangénomique

	Vérité clinique	Extrant du système pangénomique	Taille de l'anomalie (Mb)	% du chromosome	Scores RLV
Échantillon 1	Trisomie 21 simple	Duplication partielle sur le 21	22,50	48,9	19,43
Échantillon 2	Trisomie 18 simple	Duplication partielle sur le 18	47,00	60,2	12,99

Consultez le *guide du logiciel VeriSeq NIPT Solution v2 (document n° 1000000067940)* pour de plus amples renseignements sur les mesures de contrôle de la qualité utilisées pour présenter les résultats d'aneuploïdies.

Chromosomes sexuels

Les résultats des chromosomes sexuels de VeriSeq NIPT Solution v2 ont été comparés à ceux de l'évaluation standard de la référence clinique et ils sont résumés dans le tableau suivant. Le pourcentage de concordance a été calculé pour chacun des chromosomes sexuels de chacun des résultats de l'évaluation standard de la référence clinique. Le pourcentage de concordance a été calculé comme suit : nombre d'échantillons pour lesquels la définition du chromosome sexuel de VeriSeq NIPT Solution v2 correspond à la classification de l'évaluation standard de la référence clinique, divisé par le nombre total d'échantillons ayant la même classification de l'évaluation standard de la référence clinique.

Tableau 13 Pourcentage de concordance pour la classification du sexe du fœtus*

Classification	Caryo-type	Phénotype tiré de l'examen physique du nouveau-né		Résultats cytogénétiques							Man-quant	
		Fém-inin	Mas-culin	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY	Autre**		
Anomalie non détectée	XX	997	0	21	0	2	0	0	0	0	0	0

Classification		Phénotype tiré de l'examen physique du nouveau-né		Résultats cytogénétiques								
		Fém-inin	Mas-culin	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY	Autre**	Man-quante	
Anomalie non détectée	Caryo-type XY	0	966	0	15	0	0	0	0	0	0	1
Anomalie détectée	XO	0	0	0	0	19	0	0	0	1	0	0
Anomalie détectée	XXX	0	0	0	0	0	17	0	0	0	1	0
Anomalie détectée	XXY	0	0	0	0	0	0	23	0	0	1	0
Anomalie détectée	XYY	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0
Total		997	966	21	15	21	17	23	12	2		1
Pourcentage de concordance		100	100	100	100	90,5	100	100	91,7	Sans objet		Sans objet

* Cinq grossesses gémellaires ont été correctement classées comme ayant un Y. Deux grossesses ont été correctement classées comme n'ayant pas de Y.

** Les autres résultats cytogénétiques étaient XXXXX et XXYY.

Valeur prédictive positive et valeur prédictive négative de VeriSeq NIPT Solution v2

La valeur prédictive positive (VPP) et la valeur prédictive négative (VPN) du test fournissent des renseignements sur la capacité du test à étayer les décisions cliniques d'après la sensibilité du test, la spécificité du test et la probabilité avant le test que le fœtus était atteint de trisomie (prévalence). Puisque la VPP et la VPN dépendent de la prévalence et que la prévalence de ces aneuploïdies peut varier chez différentes populations, la VPP et la VPN ont été calculées pour une gamme de valeurs de prévalence plausibles en fonction des valeurs de sensibilité et de spécificité observées lors du dépistage de base (sans mosaïque connue) de l'étude de précision clinique. Le [Tableau 17](#) est basé sur le dépistage pangénomique (comportant des mosaïques connues).

Tableau 14 Prévalence de la trisomie 21, VPP et VPN lors du dépistage de base (sans les mosaïques connues)

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

Tableau 15 Prévalence de la trisomie 18, VPP et VPN lors du dépistage de base (sans les mosaïques connues)

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

Tableau 16 Prévalence de la trisomie 13, VPP et VPN lors du dépistage de base (sans les mosaïques connues)

Prévalence (%)	VPP (%)	VPN (%)
0,01	9,10	> 99,99
0,02	16,68	> 99,99
0,05	33,37	> 99,99
0,10	50,05	> 99,99
0,20	66,73	> 99,99

Tableau 17 Prévalence d'une anomalie, VPP et VPN lors du dépistage pangénomique (avec les mosaïques connues)

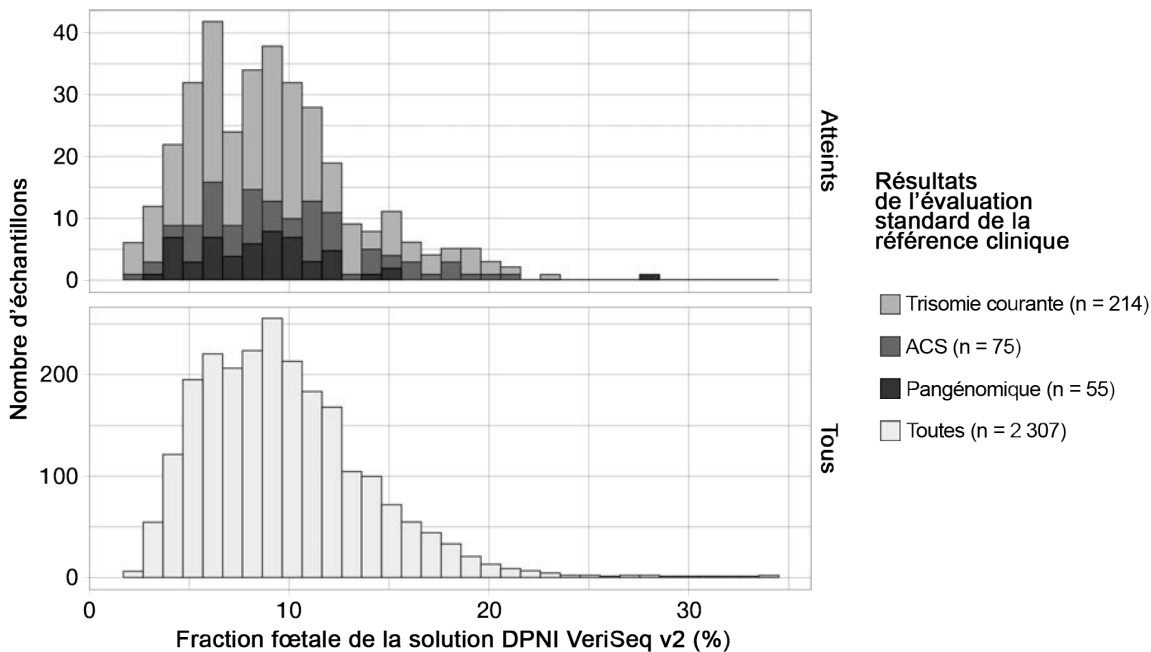
Prévalence (%)	VPP (%)	VPN (%)
0,01	1,42	> 99,99
0,02	2,81	> 99,99
0,05	6,74	> 99,99

Prévalence (%)	VPP (%)	VPN (%)
0,10	12,64	> 99,99
0,20	22,45	99,99
0,50	42,07	99,98
1,00	59,34	99,95
1,50	68,75	99,93
2,00	74,68	99,91

Distribution de la fraction fœtale

Les estimations de la distribution de la fraction fœtale (FF) de VeriSeq NIPT Solution v2 à partir du dépistage pangénomique avec mosaïque sont présentées à la catégorie des résultats sur la Norme de référence clinique à la [Figure 1](#).

Figure 1 Distribution de la fraction fœtale



Cinq (5) échantillons comportaient des anomalies dans plusieurs catégories.
 Les trisomies courantes comprennent des échantillons comportant des trisomies 21, 18 ou 13.
 Les échantillons pangénomiques comprennent des RAA ou des délétions ou duplications partielles.

Les estimations de la FF allaient de 2 à 34 % globalement avec une médiane de 9 % et un écart interquartile (IQ) de 6 à 12 %. L'estimation de la FF médiane pour des trisomies courantes et les événements détectés lors du dépistage pangénomique est de 8 % et de 9 % pour les ACS. L'écart dans les estimations de la FF était constant pour tous les résultats. Il n'y a aucune variation apparente dans la distribution de la FF dans les trisomies courantes, les ACS, les événements détectés lors du dépistage pangénomique ou tous les échantillons utilisés dans l'analyse pangénomique.

Performance dans les cas de grossesses gémellaires

Estimation de la performance pour les trisomies 13, 18 et 21, et la présence d'un chromosome Y, dans les cas de grossesses gémellaires

En raison de la faible prévalence des trisomies 21, 18 et 13 dans les cas de grossesse gémellaires, seul un petit nombre d'échantillons de jumeaux atteints était disponible aux fins de l'étude clinique. Pour estimer la performance de VeriSeq NIPT Solution v2 dans les cas de grossesses gémellaires, des modèles *in silico* basés sur des observations provenant d'échantillons cliniques ont été utilisés pour simuler des populations de grossesses gémellaires. La simulation était cohérente avec la population visée. La distribution de la fraction fœtale a été déterminée à partir d'environ 4 500 échantillons de type gémellaire et comparée à la distribution déterminée à partir d'environ 120 000 échantillons de type simple. La distribution de la fraction fœtale conditionnelle à l'état d'aneuploïdie a été déterminée à partir de définitions putatives de type simple (1 044 trisomies 21, 307 trisomies 18 et 192 trisomies 13). La combinaison des deux distributions permet les inférences liées à la détection d'aneuploïdie dans les échantillons de type gémellaire. Des groupes de jumeaux dizygotes et monozygotes ont été simulés et une moyenne pondérée représentant leur prévalence au sein de la population visée a été calculée (deux groupes de jumeaux dizygotes pour un groupe de jumeaux monozygotes) pour obtenir une estimation de la sensibilité. Pour obtenir une estimation de la spécificité, des groupes de jumeaux non atteints ont été simulés.

La fraction de chaque échantillon de type simple atteint de trisomie (« fraction atteinte ») a été calculée de manière différente pour chaque catégorie d'échantillon :

- Pour les jumeaux monozygotes, la fraction atteinte de chaque échantillon a été établie à 1,0, car, dans ce cas, la trisomie touche les deux jumeaux.
- Pour les jumeaux dizygotes, il a été présumé que seulement un jumeau a été touché (il est extrêmement rare que les deux jumeaux dizygotes soient atteints). Les valeurs de la fraction atteinte ont été simulées au moyen de la distribution connue des ratios de la fraction fœtale déterminée à partir des échantillons cliniques de type gémellaire dont le sexe ne concorde pas. Une approche conservatrice a été adoptée selon laquelle il est présumé que le jumeau atteint présente toujours la fraction fœtale la plus basse parmi les deux jumeaux. Un facteur de correction a été appliqué aux fractions fœtales dont la moyenne est plus basse pour les grossesses avec trisomie 13 et 18.
- Pour les jumeaux non atteints, la fraction atteinte de chaque échantillon a été établie à zéro.

Pour les jumeaux atteints de trisomie 18 ou de trisomie 13, la fraction fœtale correspondant à la fraction atteinte de l'échantillon a été réduite. La réduction était proportionnelle à la réduction moyenne de la fraction fœtale observée dans les données cliniques portant sur les trisomies 18 ou 13 de type simple ou les euploïdies de type simple.

La fraction fœtale globale et la fraction atteinte de chaque échantillon simulé ont ensuite été utilisées pour calculer un score d'aneuploïdie au moyen de l'algorithme normalisé de VeriSeq NIPT Solution v2. La sensibilité a été calculée en considérant la fréquence à laquelle les scores d'aneuploïdies des jumeaux simulés atteints étaient supérieurs à la limite correspondante pour l'aneuploïdie. Parallèlement, la spécificité a été calculée en

considérant la fréquence à laquelle les scores d'aneuploïdies des jumeaux simulés non atteints étaient inférieurs à la limite correspondant pour l'aneuploïdie (Tableau 18). Les intervalles de confiance à 95 % ont été estimés en fonction du nombre d'échantillons cliniques réels de type gémellaire parmi l'ensemble des données initiales, lesquels ont été classés selon qu'ils sont atteints ou non par la trisomie en cause.

Pour estimer la sensibilité au chromosome Y dans des échantillons de jumeaux, des ensembles de jumeaux XY-XY et XX-XY ont été simulés. Une moyenne pondérée représentant leur prévalence dans la population visée a été utilisée (1 XY-XY : 1 XX-XY). Pour estimer la spécificité au chromosome Y chez des jumeaux, un ensemble de jumeaux XX-XX a été simulé. Les valeurs de fraction fœtale globales ont été simulées en fonction de la distribution connue de la fraction fœtale dans des échantillons cliniques de jumeaux.

Pour les jumeaux XY-XY et XX-XY, les scores de chromosome Y correspondant ont été estimés à l'aide de la relation connue entre la fraction fœtale et les scores de chromosome Y dans des échantillons cliniques de type simple classés comme étant de sexe masculin. Pour les jumeaux XX-XY seulement, les valeurs de fraction fœtale atteintes (c.-à-d., de sexe masculin) ont été simulées à l'aide de la distribution connue des rapports de fraction fœtale observés entre des jumeaux fraternels, comme définie à partir d'échantillons cliniques de jumeaux de sexe différent. Une approche conservatrice a été utilisée là où la fraction atteinte était sélectionnée de façon à ce qu'elle puisse correspondre au plus petit des deux jumeaux. Pour chaque échantillon XX-XY simulé, le score de chromosome Y a été multiplié par la fraction atteinte.

Pour les jumeaux XX-XX, les scores de chromosome Y ont été échantillonnés à partir des scores observés dans des échantillons cliniques de type simple classés comme étant de sexe féminin. Le score de chromosome Y et la fraction fœtale globale ont ensuite été utilisés pour classer chaque échantillon simulé dans la catégorie « présence d'un chromosome Y » ou « absence d'un chromosome Y » à l'aide de l'algorithme standard de VeriSeq NIPT Solution v2.

La sensibilité a été calculée en déterminant à quelle fréquence les jumeaux XY-XY ou XX-XY étaient classés correctement comme ayant une « présence d'un chromosome Y ». La spécificité a été calculée en déterminant à quelle fréquence les jumeaux XX-XX étaient classés correctement comme ayant une « absence d'un chromosome Y ». Les intervalles de confiance à 95 % ont été estimés en fonction du nombre d'échantillons cliniques réels de type gémellaire parmi l'ensemble des données initiales qui ont été classés comme ayant une « présence d'un chromosome Y » ou une « absence d'un chromosome Y ».

Tableau 18 Estimations pour les trisomies 21, 18 et 13 au sein de la population simulée des grossesses gémellaires

	Trisomie 21	Trisomie 18	Trisomie 13	Présence de Y
Sensibilité	96,4 %	95,7 %	93,6 %	> 99,9 %
IC bilatéral à 95 %	(86,4 %, 98,9 %)	(68,3 %, 99,4 %)	(64,1 %, 98,9 %)	(99,9 %, > 99,9 %)
Spécificité	99,9 %	> 99,9 %	> 99,9 %	> 99,9 %
IC bilatéral à 95 %	(99,8 %, > 99,9 %)	(99,9 %, > 99,9 %)	(99,9 %, > 99,9 %)	(99,7 %, > 99,9 %)

Le [Tableau 18](#) présente les estimations ponctuelles et les intervalles de confiance à 95 % estimés relativement à la sensibilité et à la spécificité de VeriSeq NIPT Solution v2 pour la détection des trisomies 21, 18 et 13, et la présence de Y à partir d'une population simulée de grossesses gémellaires représentative de la population visée. Les intervalles de confiance ont été estimés en fonction du nombre d'échantillons de type gémellaire ayant réussi le contrôle de qualité, classés selon qu'ils sont atteints ou non par la trisomie en cause. Le calcul de la sensibilité présume que les deux tiers des grossesses gémellaires atteintes sont dizygotes et que l'un des jumeaux est atteint, tandis que le tiers des grossesses gémellaires atteintes sont monozygotes et que les deux jumeaux sont atteints.

Les estimations présentées au [Tableau 18](#) portent uniquement sur des grossesses gémellaires. En raison d'une prévalence encore plus faibles, les données concernant les grossesses d'ordre élevé (triplets ou plus) sont insuffisantes pour établir des modèles statistiques appropriés permettant d'estimer la précision de la détection de cas d'aneuploïdie.

Performance analytique

Précision

Pour évaluer et quantifier la précision du test, une nouvelle analyse des données à l'aide du logiciel d'analyse des échantillons de VeriSeq NIPT Solution v2, provenant de deux études précédentes réalisées avec VeriSeq NIPT Solution, a été effectuée :

- Une étude de reproductibilité multicentres qui comportait trois séquences d'analyse par trois utilisateurs dans trois centres utilisant un seul lot de réactif, soit neuf analyses au total.
- Une étude de précision intralaboratoire qui comportait 12 analyses dans un seul centre à l'aide de deux ML STAR, deux systèmes d'instruments de séquençage, et trois lots de réactifs de séquençage.

L'objectif de l'étude de précision était de quantifier la précision du test pour la détection de la trisomie 21 (T21) et du chromosome Y, ainsi que d'estimer la variabilité entre les différents appareils, les différentes trousse de préparation des bibliothèques et des différents lots de réactifs de séquençage.

Un groupement de la T21 ayant une fraction fœtale de 5 % a été créé en combinant l'ADN acellulaire extrait du plasma maternel de femmes enceintes (dont le fœtus est atteint de la T21) et l'ADN acellulaire extrait du plasma de femmes non enceintes. Un groupement d'ADN acellulaire ayant une fraction fœtale mère-enfant de sexe masculin (fœtus XY) de 10 % a aussi été créé. Le panel d'échantillons pour chaque étude et pour chaque analyse comportait 4 réplicats du groupement d'échantillons atteints de la T21 ayant une fraction fœtale de 5 % et 20 réplicats du groupement d'ADN acellulaire ayant une fraction fœtale mère-enfant de sexe masculin de 10 %. Les tests des deux études ont été réalisés sur une période de 10 jours au total et comptaient en tout 21 analyses.

La T21 et la présence d'un chromosome Y ont été choisies pour effectuer l'analyse en fonction de la représentativité des affections cliniques et de la complexité de la détection des anomalies. Puisqu'il est le plus petit autosome humain, la taille du chromosome 21 a un impact direct sur la sensibilité de la détection de la T21, en particulier en présence de faibles valeurs de fraction fœtale, comme celles que l'on retrouvait dans cette étude. Le chromosome Y, présent dans le plasma maternel, est exclusivement d'origine fœtale et, par conséquent, plus facile à détecter lors du test.

L'écart-type et l'écart moyen observés pour le score RLV du chromosome 21 et les valeurs chromosomiques normalisées (VCN) du chromosome Y ont démontré que l'écart-type (ÉT) du réplicat était la plus grande source de variabilité. La variation entre les centres, les appareils et les lots de réactifs ajoutait une quantité négligeable de variabilité, comme le démontre la différence entre l'ÉT global et l'ÉT reproduit dans le [Tableau 19](#) et le [Tableau 20](#).

Tableau 19 Résumé de l'écart-type (ÉT) de la réponse au séquençage multicentres (reproductibilité)

Réponse	N	Moyenne	ÉT des réplicats	Reproductibilité globale de l'ÉT*
Score LRV du chromosome 21	36	34,43	11,36	11,36
VCN du chromosome Y	180	190,56	7,96	10,20

* Le résultat global comprend la variabilité liée au centre, à l'utilisateur, à l'analyse, à la journée et au réplicat.

Tableau 20 Résumé de la précision de la réponse au séquençage intralaboratoire

Réponse	N	Moyenne	ÉT des réplicats	ÉT global intralaboratoire*
Score LRV du chromosome 21	48	36,01	9,07	10,25
VCN du chromosome Y	240	198,68	7,63	7,82

* Le résultat global comprend la variabilité liée à l'appareil de séquençage, au lot de réactif, à l'utilisateur, à l'analyse, à la journée et au réplicat.

Une autre étude a été effectuée pour comparer la précision du séquençage (écart-type total) de VeriSeq NIPT Solution v2 en utilisant les versions 2.0 et 2.5 d'une Flow Cell. L'étude comportait deux types de Flow Cell (v.2.0 et v2.5), trois lots de trousse de séquençage, quatre systèmes d'instruments et deux analyses de séquençage, pour un total de 48 analyses dans un seul centre. Un groupement de séquençage a été préparé à partir des plaques d'ADN acellulaire qui étaient préparées manuellement. Le panel d'échantillons comportait 4 réplicats du groupement d'échantillons atteints de la T21 ayant une fraction fœtale de 5 % et 20 réplicats du groupement d'ADN acellulaire ayant une fraction fœtale mère-enfant de sexe masculin (fœtus XY) de 10 %. Les résultats de l'étude sont présentés au [Tableau 21](#) et confirment qu'il n'y a aucune différence dans la précision du séquençage lorsqu'on utilise la Flow Cell v2.0 par rapport à la Flow Cell v2.5.

Tableau 21 Résumé de la précision de la réponse au séquençage pour la Flow Cell v2.0 par rapport à la Flow Cell v2.5.

Réponse	Nombre d'observations par version	ÉT global v2.0*	ÉT global v2.5*	Résultat statistique**
Score LRV du chromosome 21	96	9,56	8,44	Équivalent statistique (valeur de p = 0,25)
VCN du chromosome Y	480	7,74	7,38	Équivalent statistique (valeur de p = 0,38)

* Le résultat global comprend la variabilité liée à l'appareil de séquençage, au lot de réactif, à l'analyse, à la journée et au réplicat.

** Basé sur le test F d'égalité des mesures de dispersion (écarts-types au carré).

Contamination croisée

Le gestionnaire de flux de travail de la préparation d'échantillons de VeriSeq NIPT Solution a évalué la contamination croisée. Les groupements plasmatiques provenant de femmes non enceintes (XX) et d'hommes adultes (XY) ont été testés selon un modèle de jeu de dames dans quatre plaques de 96 puits chacune. N = 48 pour chaque échantillon de sexe féminin et de sexe masculin par plaque, pour un total de 192 échantillons de sexe féminin et de 192 échantillons de sexe masculin. Aucun des échantillons du sexe féminin n'affiche une couverture du chromosome Y statistiquement supérieure au contexte estimé, ce qui indique que les échantillons du sexe masculin sur la même plaque n'ont pas contaminé les échantillons du sexe féminin. Aucune contamination croisée détectable n'a été observée dans VeriSeq NIPT Solution.

Substances potentiellement interférentes

L'impact des substances potentiellement interférentes a été évalué avec VeriSeq NIPT Solution en évaluant la performance du test en présence de telles substances.

L'albumine, la bilirubine, l'hémoglobine et les triglycérides (endogènes) ont tous été injectés dans des groupements de plasma maternel provenant de femmes enceintes non atteintes (foetus XX). Ils ont été testés à deux concentrations pour chaque substance de test (n = 16 pour chaque test). Aucune interférence n'a été observée dans les performances du test.

Tableau 22 Substances potentiellement interférentes (endogènes)

Substance de test	Test à concentration faible (mg/ml)	Test à concentration élevée (mg/ml)
Albumine	35	50
Bilirubine	0,01	0,15
Hémoglobine	100	200
Triglycéride	1,5	5

L'ADN génomique (ADNg) maternel que l'on trouve naturellement dans le plasma peut aussi potentiellement interférer dans les performances du test et il peut être extrait en même temps que l'ADN acellulaire fœtal. Les quantités d'ADN génomique de 1,6, 3,3 et 4,9 ng par échantillon (ce qui correspond à 1, 2 et 3 écarts-types au-dessus de la moyenne attendue de la concentration d'ADNg après 7 jours d'entreposage du sang entier¹²) ont été ajoutées à l'ADN acellulaire extrait du plasma maternel de femmes enceintes d'un fœtus de sexe féminin (XX) non affecté. Par la suite, les échantillons ont été testés dans VeriSeq NIPT Solution (n = 16 pour chaque concentration). Aucune interférence n'a été observée dans les performances du test en présence des quantités élevées d'ADNg.

Vingt substances potentiellement interférentes (exogènes) à base de médicaments fréquemment utilisés ou prescrits pendant la grossesse ont été testées conformément aux lignes directrices EP7-A2 (Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline-Second Edition). Les 20 substances potentiellement interférentes ont été combinées dans quatre groupements, injectées dans le plasma maternel de femmes

enceintes d'un fœtus de sexe féminin (XX) non affecté et testées dans VeriSeq NIPT Solution (N = 16 pour chaque groupement). Aucune interférence n'a été observée dans les performances du test en présence de ces substances exogènes.

Tableau 23 Substances potentiellement interférentes (exogènes)

Groupement 1	Groupement 2	Groupement 3	Groupement 4
Acétaminophène	Diphenhydramine	Albutérol	Cétirizine
Acétylcystéine	Érythromycine	Bupropion	Dextrométhorphan
Bisoprolol	Guaifénésine	Caféine	Acide ascorbique
Citalopram	Héparine	Sertraline	Métoprolol
Desloratadine	Lidocaïne	Fluorure de sodium	Nadolol

Limite de détection

La limite de détection (LDD) est définie comme étant le niveau de fraction fœtale correspondant à la probabilité de détection à 95 % d'une affection recherchée, comme la T21. Des études et des analyses statistiques ont été effectuées pour évaluer la LDD de VeriSeq NIPT Solution v2 pour différentes affections courantes.

La probabilité de détection d'une affection recherchée dans un échantillon atteint traité par VeriSeq NIPT Solution v2 dépend principalement de trois facteurs :

- la fraction fœtale;
- la profondeur de séquençage;
- la taille et la complexité de la région génomique examinée.

En supposant une profondeur de séquençage constante, une anomalie spécifique est plus facile à détecter dans un échantillon comportant un pourcentage de fraction fœtale plus élevé que dans un échantillon comportant un pourcentage de fraction fœtale plus faible. Inversement, en supposant une fraction fœtale constante, une anomalie spécifique est plus facile à détecter dans un échantillon comportant une profondeur de séquençage plus élevée que dans un autre comportant une profondeur de séquençage plus faible. Enfin, les anomalies que l'on retrouve dans des régions génomiques plus petites ou plus complexes sont plus difficiles à détecter que celles présentes dans des régions génomiques plus grandes ou moins complexes, en supposant une fraction fœtale et une profondeur de séquençage constantes.

Pour déterminer la LDD de la T21, les échantillons comportant des mélanges d'échantillons regroupés de T21 et des échantillons regroupés non atteints ont été analysés. Les deux types d'analytes ont été mélangés sur une série de titrage pour créer un ensemble de sept niveaux de fraction fœtale (0, 2, 3, 4, 5, 6 et 10 %). Chaque niveau était bien représenté avec 10 répliqués au total.

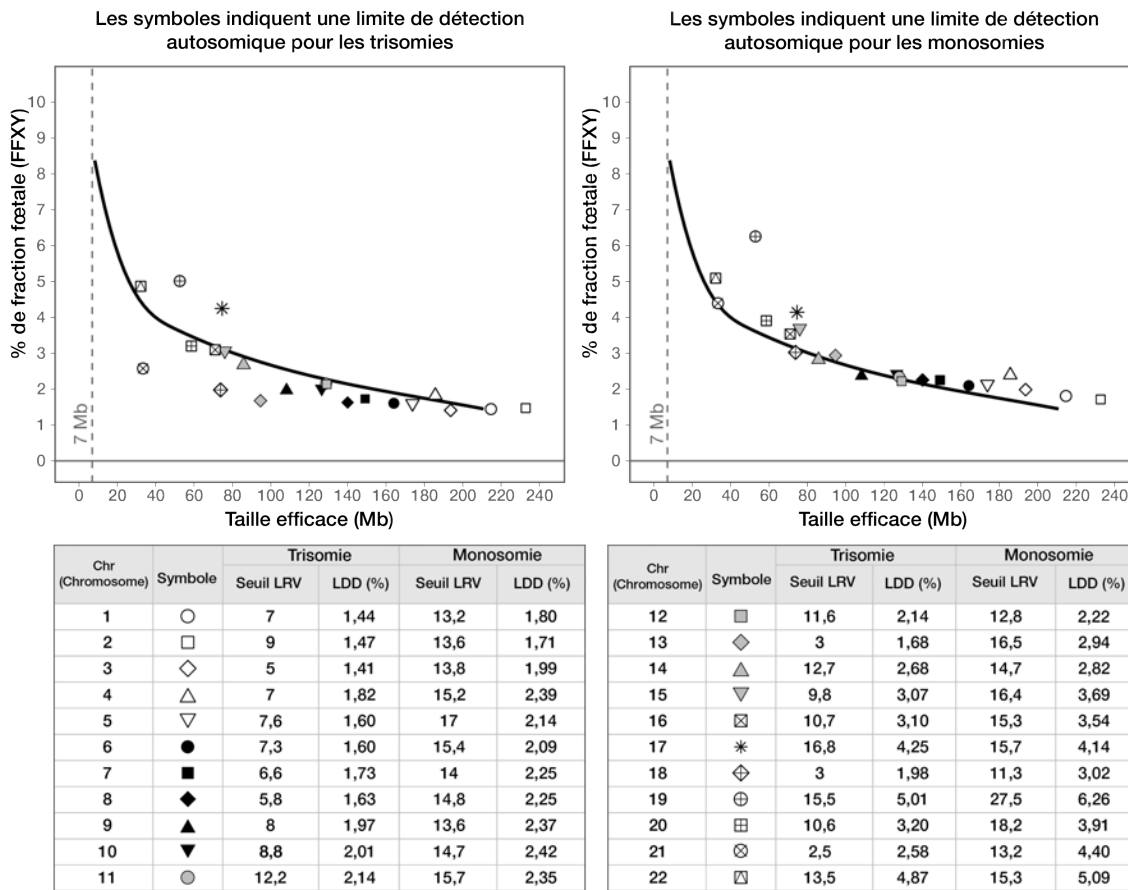
Pour améliorer davantage la résolution de la grille de fraction fœtale pour l'analyse de la LDD, les données tirées de cette étude ont été combinées aux données tirées de la dilution *in silico*. Les effets de la dilution et du titrage expérimentaux ont été simulés par le mélange contrôlé des données de séquençage. Les données tirées de ce

titrage in silico portaient sur un ensemble de 14 niveaux de fraction fœtale (1,25, 1,50, 1,75, 2,00, 2,25, 2,50, 2,75, 3,00, 3,25, 3,50, 3,75, 4,00, 4,25 et 4,50 %) avec 32 réplicats pour chaque niveau. Une analyse par la méthode des probits a été effectuée sur les données obtenues pour déterminer la LDD de la T21.

De façon indépendante, un modèle statistique utilisant la fraction fœtale, la profondeur de séquençage et la taille ou la complexité génomique a été élaboré pour prédire la probabilité de détection de toute anomalie dans l'échantillon. Ce modèle a été mis au point à partir des données correspondant à un ensemble de 1 405 échantillons XY. La LDD de la T21 prédite par ce modèle correspondait à celle décrite ci-dessus dans l'analyse par la méthodes des probits. Ce modèle statistique a été utilisé pour estimer la valeur de la LDD pour les aneuploïdies sur tous les autosomes et pour les délétions et les duplications partielles.

La Figure 2 présente la probabilité de détection à 95 % des régions moyennes selon leur taille et des limites de détection autosomiques pour toutes les trisomies et toutes les monosomies.

Figure 2 Probabilités de détection à 95 % pour les régions moyennes selon leur taille pour VeriSeq NIPT Solution v2



Dépannage

Dépannage pour VeriSeq NIPT Solution v2

Type d'échec	Résultat possible	Interprétation	Action recommandée	Commentaires
Entrée de plasma insuffisante	Échec du CQ de l'échantillon	Volume de plasma insuffisant.	Reprise d'un nouvel échantillon.	Selon l'inspection visuelle du volume de plasma.
Échec lié à l'échantillon de sang	Aucune séparation du sang en couches	Échantillon non centrifugé.	Vérifiez que la centrifugeuse a fonctionné et que le tube a été soumis à la bonne force de centrifugation. Reprise d'un nouvel échantillon.	
		Mauvais transport ou stockage de l'échantillon (hémolyse de l'échantillon).	Reprise d'un nouvel échantillon.	Les échantillons congelés ne se séparent pas. Des mauvaises conditions de transport ou de stockage de l'échantillon peuvent entraîner l'hémolyse des échantillons.

Type d'échec	Résultat possible	Interprétation	Action recommandée	Commentaires
Échantillon obstrué ou écoulement lent	Contamination du plasma	Les échantillons individuels peuvent obstruer la plaque de fixation si l'échantillon de plasma est considérablement contaminé.	Inspectez l'échantillon. Si le plasma restant dans le tube est rouge ou laiteux, annulez l'échantillon et demandez une reprise. Si l'échantillon semble normal, testez de nouveau l'échantillon.	
	Débordement de l'échantillon	Inspection visuelle inadéquate de chaque tube pour vérifier l'adéquation de l'échantillon.	Invalidez tous les échantillons des puits voisins touchés par le débordement.	Peut indiquer un transport ou un stockage incorrect des échantillons avant leur traitement. Vous devez exclure les échantillons non appropriés du traitement.
	Défaillance de l'équipement	Digestion inadéquate de la matière pendant l'extraction.	Testez de nouveau l'échantillon. Si le problème persiste dans l'emplacement du puits avec d'autres échantillons, veuillez communiquer avec l'assistance technique d'Illumina.	

Type d'échec	Résultat possible	Interprétation	Action recommandée	Commentaires
Échec du CQ de l'analyse d'échantillons individuels	Échec du CQ du séquençage	<p>Les causes possibles sont les suivantes :</p> <ul style="list-style-type: none"> Quantité insuffisante de matériel génétique Mauvais transfert lors de la manipulation de l'échantillon Échec du réactif de séquençage 	Vérifiez l'annotation de l'échantillon. Vérifiez si les échantillons précédents ont donné des résultats semblables dans la position relative de la plaque. Testez de nouveau l'échantillon.	Indique soit l'introduction d'un apport d'échantillon insuffisant, soit un mauvais transfert vers le système ML STAR. La quantité insuffisante de matériel génétique peut être attribuable à une quantité insuffisante d'ADN acellulaire dans le plasma ou l'ADN cellulaire cause une surdilution de l'échantillon pour le séquençage.
	Faible taux de FF ou de sites non exclus (SNE)	Données insuffisantes pour produire un rapport exact.	Testez de nouveau à partir du plasma.	

Type d'échec	Résultat possible	Interprétation	Action recommandée	Commentaires
Échec du CQ de la quantification	Échec de l'analyse de quantification. Médiane du lot sous le minimum	Résultats insuffisants du traitement.	Répétez la quantification. Si la reprise produit un échec, veuillez communiquer avec l'assistance technique d'Illumina.	Des indicateurs ne dépassant pas une courbe de standards indiquent un problème avec la préparation de la librairie (p. ex. utilisation d'éthanol qui n'est pas de qualité biologique) ou un problème relatif au processus de quantification.
	Échec de l'analyse de quantification.	Échec de la courbe standard.	Répétez la quantification. Si la reprise produit un échec, veuillez communiquer avec l'assistance technique d'Illumina.	
Échec du regroupement	Échec du regroupement de l'échantillon	L'analyse du regroupement n'est pas en mesure de calculer les bons volumes du groupement.	Évaluez de nouveau la concentration cible du groupement. Lancez de nouveau l'analyse du regroupement.	

Dépannage du système VeriSeq NIPT Microlab STAR

Étape du processus	Code d'erreur	Texte de l'erreur	Description	Solution de l'utilisateur
Création du lot	EM0044	Le numéro d'identification du lot contient des caractères interdits.	Les champs de données de VeriSeq NIPT Solution v2 n'acceptent que les chiffres, les lettres, les traits de soulignement et les tirets.	Renommez le lot en optant pour un nom qui ne contient aucun caractère spécial.
Création du lot	EM0051	L'identifiant du lot compte plus de 36 caractères.	VeriSeq NIPT Solution v2 limite la longueur du nom du lot à 36 caractères ou moins.	Renommez le lot en optant pour un nom qui compte moins de 36 caractères.
Création du lot	EM0076	Incapable d'établir une connexion avec le VeriSeq Onsite Server v2.	VeriSeq Onsite Server v2 ne répond pas aux demandes de données du gestionnaire de flux de travail.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Assurez-vous que le système ML STAR est connecté au réseau. 2. Assurez-vous que le VeriSeq Onsite Server v2 fonctionne. 3. Vérifiez que le système ML STAR peut se connecter au VeriSeq Onsite Server v2 (au moyen d'une commande Ping). 4. Vérifiez le flacon à déchets du système d'aspiration. Si le flacon à déchets est rempli à plus de 50 %, videz-le. 5. Si les étapes précédentes ne règlent pas le problème, communiquez avec l'assistance technique d'Illumina.

Étape du processus	Code d'erreur	Texte de l'erreur	Description	Solution de l'utilisateur
Création du lot	EM0118	Le lot a subi un échec et il ne peut plus être traité.	Le lot précisé a déjà subi un échec et il ne peut subir aucun autre traitement.	Le dossier du lot sur le VeriSeq Onsite Server v2 indique que le lot choisi a subi un échec. Aucun autre traitement n'est permis. Créez un autre lot avec les échantillons requis.
Création du lot	Sans objet	Ce lot a déjà terminé le traitement. Aimeriez-vous le regrouper de nouveau?	Le lot indiqué a été traité par le regroupement. Le seul traitement possible est de le regrouper de nouveau.	Effectuez un nouveau regroupement comme suit. <ul style="list-style-type: none"> • Sélectionnez Re-Pool (Regrouper de nouveau). • Interrompez la méthode et vérifiez que le nom du lot est correct avant le nouveau regroupement.
Isolation du plasma	WP0087	Doublons des codes à barres des échantillons chargés.	Des échantillons aux codes à barres identiques ont été chargés dans le système.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Suivez les commandes du gestionnaire de flux de travail pour trouver les échantillons en double. 2. Retirez les échantillons en double, puis remplacez-les ou changez leurs étiquettes. 3. Rechargez les échantillons.
Isolation du plasma	EP0102	Les échantillons indiqués dans la feuille d'échantillons n'ont pas été chargés.	Les échantillons de la feuille d'échantillons ne font pas partie des codes à barres chargés.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Suivez les commandes du gestionnaire de flux de travail pour trouver les échantillons manquants. 2. Effectuez l'une des actions suivantes : <ul style="list-style-type: none"> • Ajoutez les échantillons manquants au lot et rechargez les échantillons. • Interrompez la méthode et modifiez la feuille d'échantillons au besoin. Relancez la méthode.

Étape du processus	Code d'erreur	Texte de l'erreur	Description	Solution de l'utilisateur
Chargement de la plaque	Sans objet	Erreur du masque du code à barres Venus.	Le gestionnaire de flux de travail assure l'utilisation de la bonne plaque et du bon lot au moyen de masques de codes à barres Venus.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Vérifiez le chargement de la plaque pour confirmer qu'elle est bien placée. 2. Vérifiez que la plaque chargée est bien la bonne pour le lot indiqué.
Extraction d'ADN acellulaire	WE0150	La pression dans la chambre à vide est trop faible.	Le gestionnaire de flux de travail ne poursuit pas son travail si la sonde indique que la pression de la canalisation à vide est inférieure à 400 Torr.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Vérifiez si la canalisation à vide est pliée ou obstruée. 2. Desserrez les pinces de la tubulure d'évacuation, laissez la pression s'échapper et resserrez complètement les pinces de la tubulure. 3. Vérifiez si le dispositif de commande de vide et la pompe sont mis en marche. 4. Si le problème persiste, veuillez communiquer avec l'assistance technique d'Illumina.
Extraction d'ADN acellulaire	WE0153	La pression dans la chambre à vide est trop élevée.	Si la pression du vide mesurée est trop élevée avant de commencer le contrôle de la pression, le système pourrait mal fonctionner.	À l'arrière du dispositif de commande, vérifiez si toute la tubulure et tous les raccords pour vide sont bien branchés.

Étape du processus	Code d'erreur	Texte de l'erreur	Description	Solution de l'utilisateur
Extraction d'ADN acellulaire	WE0996	Le vide n'est pas maintenu.	Le problème d'échec du processus de vide doit être résolu avant de continuer.	<p>Vérifiez que ce problème est résolu avant de sélectionner OK.</p> <ol style="list-style-type: none"> Vérifiez si la plaque de fixation est bien collée contre le collecteur pour le vide. D'une main gantée, appuyez avec force sur la plaque de fixation. Tendez l'oreille pour entendre le son de la création du vide et observez l'écoulement de l'eau dans la plaque de fixation. Activez l'option « trace view » (voir les traces) sur le gestionnaire de flux de travail. Lorsque la lecture de la pression aura bien atteint au moins 50 unités de pression de moins que la lecture de la pression ambiante, sélectionnez OK pour poursuivre l'extraction d'ADN acellulaire. Si la lecture de pression requise n'est pas atteinte pendant le temps accordé, sélectionnez OK pour poursuivre avec le premier chargement de lysat. Mettez la méthode en pause après que le lysat soit répandu sur la plaque de fixation. Remplacez la plaque de fixation et appuyez fortement sur elle. Si le lysat ne s'écoule pas dans la plaque, communiquez avec l'assistance technique d'Illumina.

Étape du processus	Code d'erreur	Texte de l'erreur	Description	Solution de l'utilisateur
Extraction d'ADN acellulaire	WM0219	Si le vide est activé, interrompez manuellement la pompe.	Le vide peut demeurer activé après l'interruption de la méthode pendant l'extraction.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sur le dispositif de commande du vide, appuyez sur le bouton Power (Mise en marche) pour désactiver le vide. 2. Attendez 10 secondes et appuyez de nouveau sur le bouton Power (Mise en marche) pour activer le vide.
Extraction d'ADN acellulaire	EE0477	Une erreur s'est produite pendant le mouvement d'une plaque (erreur iSWAP).	Si une erreur iSWAP se produit (abaissement de la plaque, échec du ramassage, etc.), le système vous demandera de terminer le mouvement de la plaque manuellement.	<p>Assurez-vous qu'il est possible de récupérer la plaque (sans renverser de matière).</p> <ul style="list-style-type: none"> • Si la plaque ne peut pas être récupérée, interrompez l'analyse. • Si la plaque peut être récupérée, suivez les instructions à l'écran pour terminer le transfert de la plaque manuellement.
Extraction d'ADN acellulaire	EE0519	Le code à barres balayé ne correspond pas au code à barres de la plaque de fixation inscrit au dossier.	Le code à barres de la plaque de fixation chargée ne correspond pas à celui de la plaque retirée.	Assurez-vous que le code à barres de la plaque à charger correspond à celui inscrit au dossier (voir le registre des traces pour connaître le bon code à barres).

Étape du processus	Code d'erreur	Texte de l'erreur	Description	Solution de l'utilisateur
API (Interface de programmation d'applications)	EA0372	Incapable d'établir une connexion avec le serveur de données.	VeriSeq Onsite Server v2 ne répond pas aux demandes de données du gestionnaire de flux de travail.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Assurez-vous que le système ML STAR est connecté au réseau. 2. Assurez-vous que le VeriSeq Onsite Server v2 fonctionne. 3. Vérifiez que le système ML STAR peut se connecter au VeriSeq Onsite Server v2 (au moyen d'une commande Ping).
	EA0774	Erreur de connexion. La connexion au serveur de l'interface de programmation d'applications n'a pas été validée.	VeriSeq Onsite Server v2 a cessé de répondre aux demandes de données du gestionnaire de flux de travail.	<p>Vérifiez les points suivants :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Assurez-vous que le système ML STAR est connecté au réseau. 2. Vérifiez que le système ML STAR peut se connecter au VeriSeq Onsite Server v2 (au moyen d'une commande Ping). 3. Assurez-vous que le VeriSeq Onsite Server v2 fonctionne.
	EA0780	Code 403 : demande invalide La transaction actuelle n'est pas valide.	Les données transmises ne respectent pas la logique du flux de travail du système.	Vérifiez les détails sur l'erreur pour obtenir de plus amples renseignements. Les entrées trop longues ou qui ne respectent pas la liste des caractères acceptables font partie des causes fréquentes.

Références

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 R.J., SUTHERLAND G.R., SCHAFFER L.G. *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling.* 4e édition. New York (NY) : Oxford University Press. 2012.
3. AKOLEKAR, R., BETA, J., PICCIARELLI, G., OGILVIE, C., D'ANTONIO, F. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015 Jan;45(1):16-26. doi: 10.1002/uog.14636.
4. American College of Obstetricians and Gynecologists. Screening For Fetal Aneuploidy. *Practice Bulletin No. 163.* *Obstet Gynecol.* 2016; 127(5):e123-137.
5. GIL M.M., ACCURTI V., SANTACRUZ B., PLANA M.N., NICOLAIDES K.H. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2017 Avr 11. doi: 10.1002/uog.17484.
6. BIANCHI D., PARKER R., WENTWORTH K. et al. DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening. *N Engl J Med.* 2014;370(9):799-808. doi:10.1056/nejmoa1311037.
7. BENN P., BORRELL A., CHIU R.W. et al. Position statement from the Chromosome Abnormality Screening Committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis. *Prenat Diagn* 35 (2015): 725-34.
8. GREGG A.R., SKOTKO B.G., BENKENDORF J.L. et al. Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med.* 2016: doi:10.1038/gim.2016.97.
9. DONDORP W., DE WERT G., BOMBARD Y. et al. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy and beyond: challenges of responsible innovation in prenatal screening. *Eur J Hum Genet.* 2015 Nov;23(11):1438-50.
10. GRATI et al. Fetoplacental mosaicism: potential implications for false-positive and false-negative noninvasive prenatal screening results. *Genetics in Medicine* 16 (2014): 620–624.
11. WELLESLEY et al. Rare chromosome abnormalities, prevalence and prenatal diagnosis rates from population-based congenital anomaly registers in Europe. *European Journal of Human Genetics* 20 (2012): 521-526.
12. NORTON S., LECHNER J., WILLIAMS T., FERNANDO M. et al. A Stabilizing Reagent Prevents Cell-free DNA Contamination by Cellular DNA in Plasma During Blood Sample Storage and Shipping as Determined by Digital PCR. *Clin. Biochem.* 2013;46: 1561–1565. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2013.06.002.
13. BIANCHI D.W. et al. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet Gynecol* 119 (2012): 890-901.

14. EHRICH M. et al. Genome-wide cfDNA screening: clinical laboratory experience with the first 10,000 cases. *Genet Med* 19 (2017): 1332-1337.
15. FIORENTINO F. et al. The clinical utility of genome-wide cfDNA screening. *Prenat Diagn* 37 (2017): 593-601.
16. PERTILE M.D. et al. Rare autosomal trisomies, revealed by maternal plasma DNA sequencing, suggest increased risk of feto-placental disease. *Sci Transl Med* 9 (2017): eaan1240.

Historique des révisions

Document	Date	Description des modifications
Document n° 1000000078751 v08	Août 2022	Mise à jour du numéro de référence du flux de travail Suppression de la consigne de pipetter pour mélanger si la plaque de librairies était congelée.
Document n° 1000000078751 v07	Mai 2022	Division de la section Limites de la procédure de manière à inclure la section Rapports de VeriSeq NIPT Solution v2 avec les deux premiers points. Le reste du texte a été maintenu sous un nouvel en-tête Limites du test. Suppression <ul style="list-style-type: none">• VeriSeq de toutes les étiquettes de réactifs.• Application d'un code à barres sur la plaque d'adaptateur d'ADN VeriSeq NIPT dans Préparation des librairies. Ajout <ul style="list-style-type: none">• Le mot « certifiée » à « eau sans DNase/RNase ».• Un des lecteurs de microplaques suivants, ou équivalent et SpectraMax M2, M3, M4, M5 et remarque.• Dans la section VeriSeq NIPT Microlab STAR pour expliquer les actions à entreprendre durant un événement de gestion des erreurs.• Une remarque pour inspecter visuellement les puits.• Consignes pour les lots de 24 et 48 échantillons dans les sections de protocole.• Étapes lors de l'utilisation de la plaque d'adaptateur mauve ou équivalent.• Texte dans la section Données démographiques et caractéristiques des grossesses de manière à inclure les résultats du premier trimestre de la grossesse.• Puce dans les spécifications des plaques à puits profonds de manière à inclure la résistance au couple. Mise à jour

Document	Date	Description des modifications
		<ul style="list-style-type: none"> • Texte relatif aux noms de lots uniques à des fins de clarté et ajout d'un exemple. • Symboles et mise en forme des remarques, avertissements et mises en garde. • Sous-puces des résultats de test. • Remplacement de « thiocyanate de guanidine » par « chlorhydrate de guanidine ». • Remplacement de CVS par BVS (Basic Vacuum System). • Texte relatif à l'utilisation du dépistage pangénomique et du score LRV. • Spécifications : spécifications des bacs de réactifs, plaques à puits profonds, plaques à 384 puits, plaques à 96 puits.
<p>Document n° 1000000078751 v06</p>	<p>Août 2021</p>	<p>Mise à jour de l'adresse du représentant autorisé de l'UE.</p>

Document	Date	Description des modifications
Document n° 1000000078751 v05	Décembre 2020	<p>Mise à jour des sections Principes procéduraux, Avertissements et précautions, et Étiquetage des produits avec des clarifications supplémentaires pour répondre aux demandes réglementaires.</p> <p>Mises à jour mineures du contenu dans le protocole pour correspondre au style et à l'organisation actuels d'Illumina.</p> <p>Correction de la description du chromosome 21 comme « deuxième plus petit autosome humain » à « plus petit autosome humain » dans la section Précision du chapitre Performance analytique.</p> <p>Ajout de mises en garde concernant l'utilisation incorrecte des réservoirs et les risques de fusion d'échantillons dans les sections Préparation du plasma et Interprétation des résultats.</p> <p>Ajout de nouvelles références de serveurs et de logiciels pour la publication de nouvelles mises à jour de modèles de serveurs et de références de logiciels.</p> <p>Ajout de mises en garde dans les informations de protocole et de dépannage pour traiter et prévenir les débordements d'échantillons.</p> <p>Mise à jour des ingrédients actifs du réactif pour quantification d'ADN standard dans la boîte d'accessoires pour les aligner sur la fiche signalétique.</p> <p>Mise à jour des conventions d'appellation du Local Run Manager de VeriSeq NIPT module pour assurer la cohérence avec les autres documents.</p> <p>Ajout d'un historique des révisions.</p>
Document n° 1000000078751 v04	Octobre 2020	Corrections mineures.
Document n° 1000000078751 v03	Septembre 2020	Mise à jour de la liste des documents pour présenter les spécifications des appareils de laboratoire ainsi que les options compatibles connues.

Document	Date	Description des modifications
Document n° 1000000078751 v02	Février 2020	<p>Mise à jour de la présentation des informations sur les performances cliniques afin de mieux illustrer les différences entre le dépistage de base et le dépistage pangénomique.</p> <p>Ajout de nouvelles différences de performance entre le dépistage de base et le dépistage pangénomique.</p> <p>Suppression des informations contradictoires sur le caractère facultatif du rapport complémentaire dans la section « Principes procéduraux ».</p> <p>Mise à jour de la convention d'appellation du VeriSeq NIPTWorkflow Manager v2 dans tout le document à des fins de cohérence stylistique.</p> <p>Mise à jour de l'étiquetage des adresses Illumina en Australie et aux Pays-Bas pour tenir compte des changements récents.</p>
Document n° 1000000078751 v01	Août 2019	Suppression d'un doublon dans les étapes d'extraction de l'ADNc causé par une erreur du logiciel de publication.
Document n° 1000000078751 v00	Mai 2019	Publication originale.

Brevets et marques de commerce

Ce document et son contenu sont exclusifs à Illumina, Inc. et à ses sociétés affiliées (« Illumina »); ils sont exclusivement destinés à l'usage contractuel de son client dans le cadre de l'utilisation du ou des produits décrits dans les présentes et ne peuvent servir à aucune autre fin. Ce document et son contenu ne seront utilisés ou distribués à aucune autre fin ni communiqués, divulgués ou reproduits d'aucune façon sans le consentement écrit préalable d'Illumina. Illumina ne cède aucune licence en vertu de son brevet, de sa marque de commerce, de ses droits d'auteur ou de ses droits traditionnels ni des droits similaires d'un tiers quelconque par ce document.

Les instructions contenues dans ce document doivent être suivies strictement et explicitement par un personnel qualifié et adéquatement formé de façon à assurer l'utilisation correcte et sûre du ou des produits décrits dans les présentes. Le contenu intégral de ce document doit être lu et compris avant l'utilisation de ce ou ces produits.

SI UN UTILISATEUR NE LIT PAS COMPLÈTEMENT ET NE SUIT PAS EXPLICITEMENT TOUTES LES INSTRUCTIONS CONTENUES DANS LES PRÉSENTES, IL RISQUE DE CAUSER DES DOMMAGES AU(X) PRODUIT(S), DES BLESSURES, NOTAMMENT AUX UTILISATEURS ET À D'AUTRES PERSONNES, AINSI QUE D'AUTRES DOMMAGES MATÉRIELS, ANNULANT AUSSI TOUTE GARANTIE S'APPLIQUANT AU(X) PRODUIT(S).

ILLUMINA DÉCLINE TOUTE RESPONSABILITÉ DÉCOULANT DE L'UTILISATION INAPPROPRIÉE DU OU DES PRODUITS DÉCRITS DANS LES PRÉSENTES (Y COMPRIS LEURS COMPOSANTES ET LE LOGICIEL).

© 2022 Illumina, Inc. Tous droits réservés.

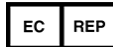
Toutes les marques de commerce sont la propriété d'Illumina, Inc. ou de leurs détenteurs respectifs. Pour obtenir des renseignements sur les marques de commerce, consultez la page www.illumina.com/company/legal.html.

Coordonnées



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, Californie 92122 États-Unis
+ (1) 800 809 ILMN (4566)
+ (1) 858 202 4566 (en dehors de l'Amérique du Nord)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

CE
2797



Illumina Netherlands B.V.
Steenoven 19
5626 DK Eindhoven
Pays-Bas

Commanditaire australien

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

Étiquette du produit

Pour voir la liste complète des symboles qui figurent sur l'emballage et l'étiquetage du produit, reportez-vous à la légende des symboles sur le site support.illumina.com, à l'onglet *Documentation* propre à votre trousse.

Un résumé de l'innocuité et des performances (SSP) est disponible sur la page

<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>, après le lancement de la base de données européenne sur les dispositifs médicaux (Eudamed). Il est lié à l'UDI-DI de base (0081627002NIPTRP).