

## Pakningsvedlegg

TIL IN VITRO-DIAGNOSTISK BRUK

## Tiltenkt bruk

VeriSeq™ NIPT Solution v2 er en *in vitro*-diagnostisk test som skal brukes som en screeningtest for å påvise genetiske anomalier i helgenom hos foster fra prøver fra maternalt, perifert fullblod hos gravide kvinner i svangerskapsuke 10 eller senere. VeriSeq NIPT Solution v2 bruker helgenomsekvensering for å detektere partielle duplikasjoner og slettinger for alle autosomer samt aneuploidistatus for alle kromosomer. Testen har et alternativ som gjør det mulig å be om rapportering av aneuploidi av kjønnskromosomer (SCA). Dette produktet må ikke brukes som det eneste grunnlaget for diagnose eller andre behandlingsbeslutninger ved graviditet.

VeriSeq NIPT Solution v2 omfatter: VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 for VeriSeq NIPT Microlab STAR, VeriSeq NIPT Sample Prep og VeriSeq Onsite Server v2 med VeriSeq NIPT Assay Software v2. VeriSeq NIPT Solution v2 er beregnet for bruk med en neste generasjons sekvenser.

## Oppsummering og forklaring av analysen

Føtale kromosomavvik, særlig aneuploidi, som innebærer et unormalt antall kromosomer, er en vanlig årsak til reproduksjonsforstyrrelser, medfødte anomalier, forsinket utvikling og intellektuell funksjonsnedsettelse. Aneuploidi rammer ca. 1 av 300 levendefødte, og tallene er mye høyere ved spontanabort eller dødfødsel.<sup>1,2</sup> Inntil nylig fantes det to typer prenatale tester for disse avvikene: diagnostiske tester eller screening. Diagnostiske tester innebærer invasive prosedyrer som fostervannsprøve eller morkakeprøve. Disse testmetodene anses å være gullstandarden for deteksjon av føtal aneuploidi. De er imidlertid assosiert med en risiko for spontanabort på mellom 0,11 % og 0,22 %.<sup>3</sup> Konvensjonell blodprøvescreening medfører ingen risiko for spontanabort ettersom metoden er ikke-invasiv, men den er mindre presis enn diagnostiske tester. Deteksjonsgraden for trisomi 21 varierer mellom 69–96 %, avhengig av den spesifikke screeningen, mors alder og gestasjonsalder på testtidspunktet.<sup>4</sup> Det er viktig å notere seg at metoden har falskt positive rater på ca. 5 %, noe som kan føre til invasive diagnostiske tester for å bekrefte resultatet, og dermed risiko for prosedyrerelatert spontanabort.<sup>4</sup> Ultralydscreeninger kan også påvise kromosomavvik, men det er med mer uvisshet enn disse andre metodene.

Føtal aneuploidi for kromosom 21, 18, 13, X og Y kan detekteres med en høy grad av sikkerhet gjennom ikke-invasiv prenatal testing (NIPT) ved hjelp av helgenomsekvensering av cellefritt DNA (cfDNA) fra maternelt plasma fra en gestasjonsalder på minst 10 uker. En nylig gjennomført metaanalyse av flere kliniske studier rapporterte at den vektete sammenslåtte deteksjonsraten og spesifisiteten for trisomi 21 og trisomi 18 ved singleton-graviditeter var som følger: trisomi 21 99,7 % og 99,96 % og trisomi 18 97,9 % og 99,96 %.<sup>5</sup> Én studie antyder at bruk av NIPT som primærscreening ved alle graviditeter kan føre til en 89 % reduksjon i antall bekreftende invasive prosedyrer.<sup>6</sup>

Gitt den betydelige reduksjonen av falskt positive rater med NIPT sammenlignet med konvensjonell blodprøvescreening, har mange medisinske fagorganisasjoner uttrykt støtte for bruken av NIPT ved flere indikasjoner.

Mer spesifikt støtter International Society for Prenatal Diagnosis, American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) /Society for Maternal Fetal Medicine (SMFM), American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) og European Society of Human Genetics/American Society of Human Genetics et tilbud av NIPT til alle gravide kvinner.<sup>7,8,9</sup> Rådgivning før testing, informert samtykke og diagnostiske tester for å bekrefte et positivt cfDNA-screeningresultat anbefales.<sup>4</sup>

VeriSeq NIPT Solution v2 er en ikke-invasiv in vitro-diagnostisk (IVD) test som bruker helgenomsekvensering av cfDNA-fragmenter fra maternelle, perifere fullblodsprøver fra gravide kvinner i minst 10. svangerskapsuke. Testen har to ulike screeningtyper: basis og helgenom. Basisscreeningen gir kun informasjon om aneuploidistatus for kromosomene 21, 18, 13, X og Y. Helgenomscreeninger gir partielle duplikasjoner og slettinger for alle autosomer samt aneuploidistatus for alle kromosomer. Begge screeningtypene tilbyr et alternativ for rapportering av kjønnskromosom-aneuploidi (SCA) med eller uten rapportering av fosterets kjønn. Rapporteringsalternativet for SCA kan slås av. Hvis rapporteringsalternativet for SCA er slått av, rapporteres heller ikke fosterets kjønn. Du finner mer informasjon om alternativene for kjønnsrapportering i *programvareveiledningen for VeriSeq NIPT Solution v2 (dokumentnr. 1000000067940)*.

## Prosedyreprinsipper

VeriSeq NIPT Solution v2 er en automatisert løsning for NIPT-tester i laboratoriemiljøer, som omfatter automatisert prøveklargjøring og analyse av sekvenseringsdata. VeriSeq NIPT Sample Prep er spesialiserte engangsreagenser som brukes sammen med VeriSeq NIPT Microlab STAR til å klargjøre partier med 24, 48 eller 96 prøver for NGS-sekvensering. Helgenom paired-end-sekvenseringsdata analyseres av en spesialisert programvare, VeriSeq NIPT Assay Software v2, og det genereres en rapport med kvalitative resultater.

Arbeidsflyten består av følgende prosedyrer: prøvetaking, plasmaisolering, cfDNA-ekstraksjon, bibliotekklargjøring, bibliotekkvantifisering, biblioteksammenslåing, sekvensering og analyse, som er nærmere beskrevet nedenfor:

- **Prøvetaking** – 7–10 ml maternelt perifert fullblod samles i et Streck cellefritt DNA-blodprøverør (BCT), som forhindrer cellelysering og genomisk kontaminasjon og stabiliserer fullblod.
- **Plasmaisolering** – Innen 5 dager etter prøvetaking isoleres plasma fra maternelt perifert fullblod ved hjelp av standard sentrifugeringsteknikker. VeriSeq NIPT Microlab STAR aspirerer plasmaet og fordeler det i en 96-brønners dypbrønnsplate for etterfølgende behandling. Hvis det blir nødvendig å utføre en ny test, kan prøver rekorkes og oppbevares ved 4 °C i ytterligere 5 dager (opptil totalt 10 dager etter prøvetaking).



### FORSIKTIG

Overskridelse av de ovennevnte oppbevaringstidene kan føre til høyere feilrate hos de enkelte prøvene.

- **cfDNA-ekstraksjon** – Rensing av cfDNA fra plasma oppnås gjennom adsorpsjon på en bindingsplate, vasking av bindingsplaten for å fjerne kontaminanter samt eluering.
- **Bibliotekklargjøring** – De rensede cfDNA-fragmentene gjennomgår en end repair-prosess for å konvertere 5'- og 3'-overheng til butte ender. Deretter tilsettes nukleotidet deoksyadenosin til 3'-endene for å skape et enkelttrådet overheng. Indekserte adaptore som inneholder et enkelttrådet 3'-deoksytymidin-overheng liggeres deretter på de bearbejdede cfDNA-fragmentene. Det ligerte DNA-et renses ved hjelp av kuler for revers immobilisering i fast fase. Hver prøve i et sett på 24, 48 eller 96 mottar en unik indeksert adapter. Adapterne har to formål:

**FORSIKTIG**

Vær ekstremt forsiktig for å unngå krysskontaminasjon av indeksene, noe som kan føre til feil resultater.

- Indekser tillater prøveidentifisering ved etterfølgende sekvensering.
- Indekserte adaptore inneholder sekvenser som gjør det mulig å fange biblioteker på den faste overflaten på en sekvenserende strømningscelle for klyngegenerering og etterfølgende sekvensering.
- **Kvantifisering** – Bibliotekproduktet kvantifiseres ved hjelp av et fluorescerende fargestoff med en konsentrasjon som bestemmes gjennom sammenligning med en DNA-standardkurve.
- **Biblioteksammenslåing og sekvensering** – Prøvebibliotekene slås sammen til blandinger med 24 eller 48 prøver i justerte mengder for å minimere variasjon i dekning. Hver blanding blir deretter sekvensert ved hjelp av et nestegenerasjons sekvenseringssystem.
- VeriSeq NIPT Solution v2 inkluderer ikke sekvenseringsutstyr og forbruksmateriell.
- **Analyse** – For hver prøve består analysen av følgende:
  - Identifisering av bibliotekfragmenter per indekssekvens og innretting av paired-end-avlesingene mot et humant referansegenom.
  - Estimering av bibliotekets føtale fraksjon ved å kombinere informasjon fra fordelingen av både lengdene og de genomiske koordinatene til bibliotekfragmentene.
  - Etter å ha tatt hensyn til kjente avvik detekterer en statistisk modell regioner i genomet som er under- eller overrepresentert i biblioteket på en måte som samsvarer med en anomali ved det estimerte nivået for føtal fraksjon.
  - NIPT-rapporten gir sammenfattende resultater for den valgte testmenyen, der ANOMALY DETECTED (ANOMALI DETEKTERT) eller NO ANOMALY DETECTED (INGEN ANOMALI DETEKTERT) angis sammen med en estimert føtal fraksjon for prøver som består QC-kontrollen.
  - Tilleggsrapporten gir kvantitative metrikker som kjennetegner hver anomali som er detektert.

# Prosedyremessige begrensninger

## Analysens begrensninger

- Evidens som støtter sensitivitet og spesifisitet for testen dekker singleton- og tvillinggraviditeter. Denne bruksanvisningen inneholder ikke sensitivitets- eller spesifisitetsdata for graviditeter med trillinger eller flere.
- VeriSeq NIPT Solution v2 er ikke beregnet for deteksjon av polyploidi, som triploidi.
- VeriSeq NIPT Solution v2 er ikke beregnet for deteksjon av omstruktureringer av balanserte kromosomer.
- Analysen krever maternelle, perifere fullblodsprøver fra kvinner som er i minst 10. svangerskapsuke.
- For basisscreeninger ser VeriSeq NIPT Solution v2-testen etter spesifikke kromosomavvik. Resultater rapportert som NO ANOMALY DETECTED (INGEN ANOMALI DETEKTERT) eliminerer ikke muligheten for kromosomavvik i de testede kromosomene. Et negativt resultat eliminerer ikke muligheten for at graviditeten har andre kromosomavvik, genetiske sykdommer eller fødselsdefekter (f.eks. manglende lukning av nevrالرør).
- For helgenomscreeninger kan store slettinger og duplikasjoner som er mindre enn 75 % av kromosomets størrelse, tyde på aneuploidi av hele kromosomet.
- For helgenomscreeninger er visse regioner ekskludert fra analysen. En liste over slike svartelistede regioner er tilgjengelig på Illuminas hjemmeside for kundestøtte. Deteksjon av genomisk anomali utføres kun på ikke-ekskluderte regioner.
- Rapportering av fosterets kjønn er ikke tilgjengelig i alle regioner på grunn av lokale bestemmelser som begrenser rapportering av kjønn.
- Basert på evidens i litteraturen kan cellefrie, DNA-baserte screeningsresultater påvirkes av visse maternelle og føtale faktorer. Noen av disse er oppført nedenfor, men er ikke begrenset til følgende:
  - nylig blodoverføring hos mor
  - tidligere organtransplantasjon/stamcelletransplantasjon hos mor
  - autoimmun sykdom hos mor
  - neoplasmer (godartede og ondartede) hos mor
  - mosaisisme hos mor
  - kopitallsvariasjon hos mor
  - føtoplacental mosaisisme / begrenset morkakemosaikk
  - fosterdød / forsvunnet tvilling

## VeriSeq NIPT Solution v2-rapportering

- VeriSeq NIPT Solution v2 er en screeningstest og skal ikke betraktes isolert fra andre kliniske funn og testresultater. Konklusjoner om føtal tilstand og graviditetsrelaterte behandlingsbeslutninger skal ikke baseres på resultatene av NIPT-screeningen alene.<sup>7</sup>
- VeriSeq NIPT Solution v2 rapporterer følgende:
  - Basisscreeningen tester overrepresentasjon av kromosomene 13, 18 og 21.
  - Helgenomscreeningen tester under- og overrepresentasjon av alle autosomer, inkludert partielle slettinger og duplikasjoner på minst 7 Mb.
  - For singleton-graviditeter der Yes (Ja) eller SCA er valgt som alternativ for kjønnsrapportering, rapporteres følgende kjønnskromosomanomalier: XO, XXX, XXY og XYY.
  - For singleton-graviditeter der Yes (Ja) er valgt som alternativ for kjønnsrapportering, rapporteres fosterets kjønn.
  - Tilstedeværelsen av et Y-kromosom ved tvillinggraviditeter.

## Produktkomponenter

VeriSeq NIPT Solution v2 (delenr. 20030577) består av følgende prøveklargjøring:

- VeriSeq NIPT Sample Prep (24 prøver) (delenr. 20025895)
- VeriSeq NIPT Sample Prep (48 prøver) (delenr. 15066801)
- VeriSeq NIPT Sample Prep (96 prøver) (delenr. 15066802)

VeriSeq NIPT Solution v2 (delenr. 20030577) består av følgende programvarekomponenter:

- VeriSeq NIPT Assay Software v2 (delenr. 20047024), forhåndsinstallert på VeriSeq Onsite Server v2.
  - VeriSeq Onsite Server v2 (delenr. 20028403 eller 20047000) eller en eksisterende VeriSeq Onsite Server (delenr. 15076164 eller 20016240) som er oppgradert til v2.
- VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 (delenr. 20044988), forhåndsinstallert på VeriSeq NIPT Microlab STAR.
  - VeriSeq NIPT Microlab STAR (delenr. Hamilton Company Reno: 95475-01 (115 V) og 95475-02 (230 V), Hamilton Company Bonaduz: 806288).
- Local Run Manager VeriSeq NIPT-modul (delenr. 20044989).

# Reagenser

## Reagenser som følger med

Illumina leverer følgende reagenser: VeriSeq NIPT Sample Prep (24 prøver) (delenr. 20025895), VeriSeq NIPT Sample Prep (48 prøver) (delenr. 15066801) og VeriSeq NIPT Sample Prep (96 prøver) (delenr. 15066802). VeriSeq NIPT Sample Prep er konfigurert for bruk med VeriSeq NIPT Microlab STAR (ML STAR) (delenr. 95475-01, 95475-02 eller 806288), som leveres av Hamilton Company.

### VeriSeq NIPT Sample Prep, ekstraksjonsboks

Tabell 1 VeriSeq NIPT Extraction Box (24) og (48), delenr. 20025869 og 15066803

Reagensnavn på etikett	Antall beholdere i settet	Aktive ingredienser	Oppbevaring
Lysis Buffer	1	Guanidinhydroklorid i bufret vandig løsning	15 °C til 30 °C
Wash Buffer I	1	Guanidinhydroklorid og isopropanol i bufret vandig løsning	15 °C til 30 °C
Wash Buffer II	1	Bufret vandig løsning som inneholder salter	15 °C til 30 °C
Elution Buffer	1	Bufret vandig løsning	15 °C til 30 °C
Proteinase Buffer	1	Glyserol i bufret vandig løsning	15 °C til 30 °C
Proteinase K	3	Frysetørket proteinase K	15 °C til 30 °C

Tabell 2 VeriSeq NIPT Extraction Box (96), delenr. 15066807

Reagensnavn på etikett	Antall beholdere i settet	Aktive ingredienser	Oppbevaring
Lysis Buffer	1	Guanidinhydroklorid i bufret vandig løsning	15 °C til 30 °C
Wash Buffer I	1	Guanidinhydroklorid og isopropanol i bufret vandig løsning	15 °C til 30 °C
Wash Buffer II	2	Bufret vandig løsning som inneholder salter	15 °C til 30 °C
Elution Buffer	1	Bufret vandig løsning	15 °C til 30 °C
Proteinase Buffer	1	Glyserol i bufret vandig løsning	15 °C til 30 °C
Proteinase K	4	Frysetørket proteinase K	15 °C til 30 °C

**VeriSeq NIPT Sample Prep, bibliotekklargjøringsboks**

Tabell 3 VeriSeq NIPT Library Prep Box (24) og (48), delenr. 20026030 og 15066809

Reagensnavn på etikett	Antall beholdere i settet	Aktive ingredienser	Oppbevaring
End Repair Mix	1	DNA-polymerase og dNTP-er i bufret vandig løsning	-25 °C til -15 °C
A-Tailing Mix	1	DNA-polymerase og dATP i bufret vandig løsning	-25 °C til -15 °C
Ligation Mix	1	DNA-ligase i bufret vandig løsning	-25 °C til -15 °C
Hybridiseringsbuffer	1	Bufret vandig løsning	-25 °C til -15 °C
NIPT DNA Adapter Plate	1	Oligonukleotider i bufret vandig løsning	-25 °C til -15 °C

Tabell 4 VeriSeq NIPT Library Prep Box (96), delenr. 15066810

Reagensnavn på etikett	Antall beholdere i settet	Aktive ingredienser	Oppbevaring
End Repair Mix	1	DNA-polymerase og dNTP-er i bufret vandig løsning	-25 °C til -15 °C
A-Tailing Mix	2	DNA-polymerase og dATP i bufret vandig løsning	-25 °C til -15 °C
Ligation Mix	2	DNA-ligase i bufret vandig løsning	-25 °C til -15 °C
Hybridiseringsbuffer	1	Bufret vandig løsning	-25 °C til -15 °C
NIPT DNA Adapter Plate	1	Oligonukleotider i bufret vandig løsning	-25 °C til -15 °C

**VeriSeq NIPT Sample Prep, tilbehørsboks**

Tabell 5 VeriSeq NIPT Accessory Box, delenr. 15066811

Reagensnavn på etikett	Antall beholdere i settet	Aktive ingredienser	Oppbevaring
DNA Binding Plate	1	Mikroplate i propylen med modifisert silikonmembran	2 °C til 8 °C

Reagensnavn på etikett	Antall beholdere i settet	Aktive ingredienser	Oppbevaring
Resuspension Buffer	1	Bufret vandig løsning	2 °C til 8 °C
Sample Purification Beads	1	Paramagnetiske perler, i fast fase, i bufret vandig løsning	2 °C til 8 °C
DNA Quantification Reagent	1	DNA-interkalerende fargestoff i DMSO	2 °C til 8 °C
DNA Quantification Standard	1	dsDNA-standard, ikke-spesifikt DNA og natriumazid i bufret vandig løsning	2 °C til 8 °C

## VeriSeq NIPT Sample Prep, rør og etiketter

Tabell 6 Workflow Tubes and Labels, delenr. 15071543

Artikkelnavn på etikett	Antall artikler i settet	Oppbevaring
Label (LBL)–Plate Barcode	9	15 °C til 30 °C
Label (LBL)–Deep-well Plate Barcode	12	15 °C til 30 °C
Tube (TB)–Empty Pooling Tube	5	15 °C til 30 °C

## Reagenser som ikke følger med

### Reagenser som er påkrevd, men som ikke følger med

- Sekvenseringsreagenser og forbruksmateriell som kreves til et nestegenerasjons sekvenseringssystem (NGS-system)
- Sertifisert DNase/RNase-fritt vann
- Etanol, 100 % (alkoholinnhold 200) for molekylær biologisk kvalitet

**MERK** Etanol av ikke-molekylær biologisk kvalitet kan ha negativ innvirkning på analysens ytelse.

### Valgfrie reagenser som ikke følger med

- Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) for kontroll uten mal (NTC)



## Oppbevaring og håndtering

1. Romtemperatur defineres som 15 °C til 30 °C.
2. Alle reagenser er kun til engangsbruk. Når reagensene er klargjort for bruk, skal de brukes umiddelbart.
3. Hvis emballasjen eller innholdet i komponentene i VeriSeq NIPT Solution er skadet eller åpnet, må du kontakte Illumina kundeservice.
4. Reagensene er stabile når de oppbevares som anvist frem til den angitte utløpsdatoen på settets etiketter. Du finner informasjon om oppbevaringsforhold i kolonnen Storage (Oppbevaring) i tabellene i [Reagenser på side 6](#). Ikke bruk reagenser som har gått ut på dato.
5. Endringer i de leverte reagensenes fysiske utseende kan indikere nedbryting av materialene. Hvis det forekommer endringer i det fysiske utseendet (for eksempel åpenbare endringer i reagensfarge eller uklarhet sammen med mikrobiell kontaminasjon), skal ikke reagensene brukes.
6. Følg følgende beste praksis ved håndtering av Sample Purification Beads:
  - Frys aldri kulene.
  - La kulene nå romtemperatur før bruk.
  - Umiddelbart før bruk skal kulene roteres til de er godt suspendert og fargen er homogen.
7. Lysis Buffer, Wash Buffer I, Wash Buffer II, Elution Buffer og Proteinase Buffer kan danne synlig bunnfall eller krystaller. Før de brukes, skal de roteres kraftig og deretter kontrolleres visuelt for å påse at det ikke er bunnfall til stede.
8. Frys aldri fullblod etter prøvetaking.
9. Sekvenser biblioteker så snart som mulig etter sammenslåing. Sammenslåtte biblioteker er stabile i opptil syv dager ved –25 °C til –15 °C. Ingen ytterligere denaturering er nødvendig hvis de oppbevares under disse forholdene i den angitte tidsperioden.

## Utstyr og materiell

### Utstyr og materiell som er påkrevd, men som ikke følger med

#### Nødvendig utstyr, medfølger ikke

Utstyr	Leverandør
Et nestegenerasjons sekvenseringssystem (NGS) med følgende kapasitet: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 x 36 bp paired-end-sekvensering</li> <li>• Kompatibel med doble indeksadaptere for VeriSeq NIPT-prøveklargjøring</li> <li>• Automatisk produksjon av BCL-filer</li> <li>• Tokanals kjemi</li> <li>• 400 millioner paired-end-avlesninger per kjøring</li> <li>• Kompatibelt med VeriSeq NIPT Assay Software v2 eller et NextSeq 550Dx-sekvenseringssystem</li> </ul>	Instrumentleverandør eller Illumina, delnr. 20005715
Fryser, -25 °C til -15 °C	Generell laboratorieleverandør
Mikrosentrifuge	Generell laboratorieleverandør
Hjelpemiddel for dråpeteller	Generell laboratorieleverandør
Kjøleskap, 2 °C til 8 °C	Generell laboratorieleverandør
20 µl enkanals dråpetellere	Generell laboratorieleverandør
200 µl enkanals dråpetellere	Generell laboratorieleverandør
1000 µl enkanals dråpetellere	Generell laboratorieleverandør
Vortekser	Generell laboratorieleverandør
Sentrifuge og rotorenhet for blodprøvetakingsrør	

Utstyr	Leverandør
<p>Tilsvarende:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Nedkjølt sentrifuge med kapasitet på 1600 × g uten bremsefunksjon</li> <li>Svingbøtterotor med bøtter</li> <li>Bøtteinnsatser, plass til 24, 48 eller 96 rør, 76 mm minimumsdybde</li> <li>Innsatsadaptere for å støtte 16 x 100 mm blodprøvetakingsrør</li> </ul> <p>Anbefalt:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Sentrifuge i Allegra X12R-serien, 1600 g</li> <li>Allegra-sentrifuge GH-3.8-rotor med bøtter</li> <li>Allegra sentrifugebøttedeksler, sett med to</li> <li>Allegra sentrifugeadapterenheter, 16 mm, sett med fire</li> </ul>	<p>Generell laboratorieleverandør</p> <p>Beckman Coulter, artikkelnr. 392304 (120 V eller 230 V)</p> <p>Beckman Coulter, artikkelnr. 369704</p> <p>Beckman Coulter, artikkelnr. 392805</p> <p>Beckman Coulter, artikkelnr. 359150</p>
Sentrifuge- og rotorenhet for mikroplater	
<p>Tilsvarende:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Sentrifuge med kapasitet på 5600 × g</li> <li>Svingplaterotor med 96-brønners platebærere, 76,5 mm minimumsdybde</li> <li>Multifuge X4 Pro-MD 120V TX-1000BT</li> <li>Sorvall Legend XTR-sentrifuge</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>HIGHPlate 6000-mikroplaterotor</li> <li>Rotor high plate 6000</li> </ul> <p>Støttebase for mikroplater</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Anbefalt: <ul style="list-style-type: none"> <li>MicroAmp 96-brønners støttebase</li> <li>96-brønners PCR-platebærer</li> </ul> </li> </ul>	<p>Generell laboratorieleverandør</p> <p>Thermo Scientific VWR, katalognummer 76326-254</p> <p>Thermo Fisher Scientific, katalognr. 75004521 (120 V) eller katalognr. 75004520 (230 V)</p> <p>Thermo Fisher Scientific, katalognr. 75003606</p> <p>Thermo Scientific VWR, katalognummer 97040-244</p> <p>Thermo Fisher Scientific, katalognr. 4379590</p> <p>Thermo Fisher Scientific, katalognr. AB-0563/1000</p>
<p>Én av følgende mikroplatelesere eller tilsvarende (fluorometer) med SoftMax Pro v6.2.2 eller nyere:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Gemini XPS</li> <li>SpectraMax M2, M3, M4 og M5 <ul style="list-style-type: none"> <li>Lilla innsats følger med mikroplateleseren for bruk i arbeidsprosess</li> </ul> </li> </ul>	
	<p>Molecular Devices, delenr. XPS</p> <p>Molecular Devices, delenr. M2, M3, M4 og M5</p>

Utstyr	Leverandør
SpectraMax High-Speed USB, seriell adapter	Molecular Devices, delenr. 9000-0938
Termosykler med følgende spesifikasjoner <ul style="list-style-type: none"> <li>• Oppvarmet lokk</li> <li>• 4 til 98 °C temperaturområde</li> <li>• ±2 °C temperaturnøyaktighet</li> <li>• 2 °C per sekund minimumshastighet for rampe</li> <li>• Kompatibel med Twin.tec PCR-plate, 96-brønners, full kant</li> </ul>	Generell laboratorieleverandør
VeriSeq NIPT Microlab STAR	Hamilton, delenr. 95475-01 (115 V), delenr. 95475-02 (230 V) eller delenr. 806288 (for Hamilton Company Bonaduz)
VeriSeq Onsite Server v2 eller en oppgradert VeriSeq Onsite Server	Illumina, delenr. 20028403 eller 20047000 (v2), delenr. 15076164 eller delenr. 20016240 (oppgradert)
Ved bruk av et NextSeq 550Dx-sekvenseringssystem: <ul style="list-style-type: none"> <li>• NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5, 75 sykluser</li> </ul>	Illumina, delenr. 20028870

### Valgfritt utstyr, medfølger ikke

Utstyr	Leverandør
Pluggo avkorkingssystem	LGP Consulting, delenr. 4600 4450
SpectraMax SpectraTest FL1 fluorescensvalideringsplate	Molecular Devices, delenr. 0200-5060
Rørrotator, 15 ml rør, 40 o/min, 100–240 V	Thermo Scientific, katalognr. 88881001 (USA) eller katalognr. 88881002 (EU)

### Materiell som er påkrevd, men som ikke følger med

Forbruksmateriell	Leverandør
1000 µl ledende, usterile filterspisser	Hamilton, delenr. 235905
300 µl ledende, usterile filterspisser	Hamilton, delenr. 235903
50 µl ledende, usterile filterspisser	Hamilton, delenr. 235948

Forbruksmaterieill	Leverandør
<p>Dypbrønnsreservoar med følgende spesifikasjoner:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• SLAS 1–2004 mikroplateformat med 96 brønner med pyramideformet eller kjegleformet bunn og en minimumskapasitet på 240 ml.</li> <li>• Polypropylen med preferanse for lav DNA-binding for all prøvekontaktoverflater.</li> <li>• Interne dimensjoner (væsknivå) er kompatible med automatisert aspirasjons- og dispenseringstrinn for VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Høydedimensjoner er kompatible med automatiserte bevegelser i VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> </ul>	<p>Generell laboratorieleverandør</p> <p>Kompatible reservoarer:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Corning Axygen, produktnr. RES-SW96-HP-SI</li> <li>• Agilent, produktnr. 201246-100</li> </ul>
<p>Reagensbeholder med følgende spesifikasjoner:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Beholder som sitter godt, men ikke tvunget på plass, i bæreren til VeriSeq NIPT Microlab STAR med konisk bunn og 20 ml minimumskapasitet.</li> <li>• Polypropylen uten RNase/DNase.</li> <li>• Interne reservoardimensjoner (væsknivå) genererer væsknivåer ved hjelp av analysereagensvolumer som er kompatible med automatiserte aspirerings- og dispenseringstrinn for VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Høydedimensjoner er kompatible med automatiserte bevegelser i VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> </ul>	<p>Generell laboratorieleverandør</p> <p>Kompatible beholdere:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Roche, produktnr. 03004058001</li> </ul>
<p>Dypbrønnsplater med følgende spesifikasjoner:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• SLAS 1–2004, 3–2004 og 4–2004 mikroplateformat med 96 brønner med pyramideformet eller kjegleformet bunn og en minimumskapasitet på 2 ml per brønn.</li> <li>• Gjennomskinnelig polypropylen med preferanse for materiale med lav DNA-binding for all prøvekontaktoverflater.</li> <li>• Brønndimensjoner genererer væsknivåer som er kompatible med automatiserte aspirasjons- og dispenseringstrinn for VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Platekant der det er mulig å plassere platestrekkoder for å kreve plassering med sikker, flat overflatevedheft.</li> <li>• Momentresistent ramme som tåler minst 5600 x g.</li> <li>• Platehøydedimensjoner er kompatible med automatiserte bevegelser i VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> </ul>	<p>Generell laboratorieleverandør</p> <p>Kompatible plater:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Eppendorf, delenr. 0030505301</li> <li>• Eppendorf, delenr. 30502302</li> <li>• USA Scientific, delenr. 1896-2000</li> </ul>

Forbruksmaterieill	Leverandør
Plate med 384 brønner og følgende spesifikasjoner: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mikroplate med 384 brønner, optimalisert for lave volum med en minimum brønncapasitet på 50 µl.</li> <li>• Svart, ugjennomsiktig polystyren med lysblokkering og lav DNA-binding for alle prøvekontaktoverflater.</li> <li>• Brønndimensjoner genererer væsknivåer som er kompatible med automatiserte aspirasjons- og dispenseringstrinn for VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Platehøydedimensjoner er kompatible med automatiserte bevegelser i VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Platekant der det er mulig å plassere platestrekkoder på påkrevd plassering med sikker, flat overflatevedheft.</li> </ul>	Generell laboratorieleverandør  Kompatible plater: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Corning, produktnr. 3820</li> </ul>
Plate med 96 brønner og følgende spesifikasjoner: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mikroplate med en momentresistent ramme som tåler minst 5600 x g og 96 gjennomskinnelige brønner med konformet bunn, forhøyede kanter og en minimumskapasitet på 150 µl per brønn.</li> <li>• Polypropylen uten RNase/DNase med lav DNA-binding for alle prøvekontaktoverflater.</li> <li>• Brønndimensjoner genererer væsknivåer som er kompatible med automatiserte aspirerings- og dispenseringstrinn for VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Platehøydedimensjoner er kompatible med automatiserte bevegelser i VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Platekant der det er mulig å plassere platestrekkoder på påkrevd plassering med sikker, flat overflatevedheft.</li> <li>• Kompatibel med termosyklere for denaturering.</li> </ul>	Generell laboratorieleverandør  Kompatible plater: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Eppendorf, delenr. 0030129512</li> <li>• Eppendorf, delenr. 30129580</li> <li>• Eppendorf, delenr. 30129598</li> <li>• Eppendorf, delenr. 30129660</li> <li>• Eppendorf, delenr. 30129679</li> <li>• Bio-Rad, delenr. HSP9601</li> </ul>
Én av følgende forseglinger: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Microseal 'F'-folie</li> <li>• Folieforseglinger</li> </ul>	Bio-Rad, katalognr. MSF1001 Beckman Coulter, artikkelnr. 538619
Cellefritt DNA BCT CE	Streck, katalognr. 218997
Trykklokk	Sarstedt, bestillingsnr. 65.802
2 ml prøverør med skrukork	Generell laboratorieleverandør
20 µl filterspisser for 20 µl dråpeteller	Generell laboratorieleverandør
200 µl filterspisser for 200 µl dråpeteller	Generell laboratorieleverandør
1000 µl filterspisser for 1000 µl dråpeteller	Generell laboratorieleverandør

Forbruksmateriell	Leverandør
Tilsvarende:	Generell laboratorieleverandør
<ul style="list-style-type: none"> <li>Alkoholbasert hurtigvirkende desinfeksjonsspray</li> <li>Oppløsning med desinfiserende rengjøringsmiddel</li> </ul>	
Anbefalt:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Deionisert vann og 70 % etanol</li> </ul>	

### Valgfritt materiell, medfølger ikke

Forbruksmateriell	Leverandør
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) for kontroll uten mal (NTC)	Generell laboratorieleverandør
Rør, skrukork, 10 ml (kun til kontrollprøver)	Sarstedt, bestillingsnr. 60.551
Rør, skrukork, 50 ml	Generell laboratorieleverandør
25 ml serologiske dråpetellere	Generell laboratorieleverandør
10 ml serologiske dråpetellere	Generell laboratorieleverandør

## Prøvetaking, transport og oppbevaring



### FORSIKTIG

Håndter alle prøver som om de er potensielt smittefarlige stoffer.

- Fullblodsprøver på 7–10 ml må tas i Streck cellefritt DNA-blodprøverør.
- Transport av fullblod må følge alle gjeldende bestemmelser for transport av etiologiske agenser. Raske frakt-/transportmetoder anbefales.
- Under transport skal prøvene oppbevares ved en temperatur på mellom 4 °C og 30 °C. Når prøvene er mottatt, skal de oppbevares ved 2 °C til 8 °C frem til de skal brukes. Tiden mellom blodprøvetaking og initiell plasmaisolering skal ikke overskride 5 dager.
- Hvis det blir nødvendig å utføre en ny test, kan prøver rekorkes og oppbevares ved 4 °C i ytterligere 5 dager (opptil totalt 10 dager etter prøvetaking).



### FORSIKTIG

Overskridelse av de ovennevnte oppbevaringstidene kan føre til høyere feilrate hos de enkelte prøvene.

## Advarsler og forholdsregler

- Denne analysen inneholder proteinase K. Personskade kan forekomme ved innånding, svelging, hudkontakt og øyekontakt. Bruk i et godt ventilert område. Bruk verneklær, unngå å puste inn støv og kast tomme beholdere og ubrukt innhold i samsvar med gjeldende lokale bestemmelser.
- Denne analysen inneholder guanidiniumklorid. Personskade kan forekomme ved innånding, svelging, hudkontakt og øyekontakt. Bruk i et godt ventilert område. Bruk verneklær og kast tomme beholdere og ubrukt innhold i samsvar med gjeldende lokale bestemmelser.
- Denne analysen inneholder isopropanol, et lettantennelig kjemikalie. Må holdes unna varme og åpen ild. Personskade kan forekomme ved innånding, svelging, hudkontakt og øyekontakt. Bruk i et godt ventilert område. Bruk verneklær og kast tomme beholdere og ubrukt innhold i samsvar med gjeldende lokale bestemmelser.
- Denne analysen inneholder dimetylsulfoksid, en etsende og brennbar væske. Personskade kan forekomme ved innånding, svelging, hudkontakt og øyekontakt. Bruk i et godt ventilert område. Bruk verneklær og kast tomme beholdere og ubrukt innhold i samsvar med gjeldende lokale bestemmelser.
- For å unngå dannelse av farlige gasser må du ikke kaste avfall fra cfDNA-ekstraksjon (som inneholder guanidinhydroklorid) sammen med avfall som inneholder klor (natriumhypokloritt).
- Håndter alle prøver som om de inneholder potensielt smittefarlige stoffer.
- Bruk rutinemessige forholdsregler for laboratoriet. Ikke pipetter med munnen. Ikke spis, drikk eller røyk i utpekte arbeidsområder. Bruk engangshansker og laboratoriefrakk ved håndtering av prøver og analysereagenser. Vask hendene grundig etter å ha håndtert prøvene og analysereagensene.
- Ikke bruk noen analysekomponenter etter utløpsdatoen som er angitt på etiketten på analyseboksen. Ikke bytt om analysekomponenter fra ulike analysevarepartier. Analysepartier kan identifiseres på etiketten på analyseboksen. Oppbevar analysekomponentene ved angitt temperatur.
- For å hindre nedbrytning av prøver eller reagenser må du påse at all natriumhypoklorittdamp fra rengjøring er fullstendig oppløst før protokollen startes.
- Hvis du unnlater å følge prosedyrene som beskrevet, kan det resultere i feil resultater eller betydelig reduksjon i prøve kvaliteten.
- Alvorlige uønskede hendelser knyttet til dette produktet skal umiddelbart rapporteres til Illumina og aktuelle myndigheter i landet der brukeren og pasienten befinner seg.
- Hvis du ønsker informasjon om helse, miljø og sikkerhet, kan du se sikkerhetsdatabladene (SDS) på [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html).



## Prosedyremessige merknader

### Unngå kontaminasjon

- Bruk nye spisser og nytt forbruksmaterieil.
- Bruk aerosolresistente spisser for å redusere risikoen for overførings- og krysskontaminasjon mellom prøver.
- På grunn av risikoen for kontaminasjon må du være ekstremt nøye med å påse at brønninnholdet ikke forlater brønnen. Innholdet skal ikke sprute. Sentrifuger etter hvert roteringstrinn.
- Følg gjeldende bestemmelser for god laboratoriepraksis og hygiene ved håndtering av blod og derivater av blod.
- Ikke bruk klorbasert aerosolspray ved bibliotekklargjøring. Kontaminasjon av klorrester kan føre til analysefeil.
- Ved fjerning av forsegling på plater er det viktig å plassere platen på et fast, flatt underlag og holde godt tak i platen. Forseglingen fjernes langsomt, og unngå at den kommer i kontakt med avdekkede brønner. Ikke berør avdekkede brønner eller forstyr innholdet. Krysskontaminasjon fra brønn til brønn kan gi feil resultater.

### Rengjøring av plattformen på VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Kontroller at plattformen er ren før bruk. Utfør ukentlig vedlikehold minst én gang i uken ved å følge disse rengjøringsinstruksjonene.
- Fjern alle avtakbare holdere og rengjør med en alkoholbasert hurtigvirkende desinfeksjonsspray, deionisert vann og 70 % etanol, og la dem tørke. Hvis de er svært skitne, kan du legge dem i en oppløsning med desinfiserende rengjøringsmiddel, skylle med det alkoholbaserte desinfeksjonsmiddelet, og la dem tørke.
- Åpne frontdekselet og tørk av plattformen med en klut dynket med deionisert vann og 70 % etanol. Det er viktig å kontrollere at glideblokkene er rene.
- Fjern BVS-manifolden (grunnleggende vakuumanifold), og rengjør manifold, pakning og de innvendige rommene i BVS med en klut. Unngå å rengjøre pakningen med etanol, ettersom materialet kan bli sprøtt.
- Tøm spissavfallet for CORE 96-hodet og den frittstående kanalen.
- Fjern den frittstående kanalens utmatingsplate for spisser på avfallsstasjonen for spisser og rengjør den: Spray deionisert vann og 70 % etanol rett på overflaten, og tørk av. Dra en ny plastpose over rammen og fest den igjen. Sett den rene utmatingsplaten for spisser tilbake på plass.
- Spray deionisert vann og 70 % etanol rett på overflaten til CORE 96-hodets avfallsboks og renne, og tørk dem rene.

- Hvis det er vanskelig å fjerne avleiringer fra spissavfall, tørker du med en klut fuktet med DNase/RNase-fritt vann til avleiringene er fjernet. Kast kluten i henhold til gjeldende bestemmelser. Steriliser deretter med det alkoholbaserte desinfeksjonsmiddelet.
- Fukt en lofri klut eller bomullspinne med 70 % etanol. Rengjør laserskannervinduet på strekkodeleseren. Bruk den samme kluten eller bomullspinnen til å rengjøre hver brønn i CPAC-plateadapteren. Hvis du bruker en klut, må du trykke kluten ned i hver brønn på adapteren med den runde enden på en penn for å sikre at innsiden av brønnen blir ordentlig rengjort.
- Rengjør de frittstående kanalene:
  - På de frittstående kanalene må du rengjøre utmatingshylsen for spisser (ytre del av pipetteringskanalene) med en lofri klut dynket med deionisert vann og 70 % etanol. (Se *referanseveiledningen for Hamilton Microlab STAR nr. 15070074.*)
  - Rengjør stoppskiven og O-ringene på pipetteringshodet (ytre del av pipetteringskanalene) med en lofri klut dynket med deionisert vann og 70 % etanol.
- Rengjør CORE 96-hodet:
  - Bruk den samme lofrie kluten dynket med deionisert vann og 70 % etanol til å rengjøre dekselet på 96-hodet og den nedre delen av stoppskivene.
  - Bruk den samme kluten, eller en stoffremse dynket med deionisert vann og 70 % etanol, og dra den rundt sidene på pipettekanalene på 96-hodet for å rengjøre O-ringene. Gjenta denne prosedyren for hver pipettekanal på 96-hodet.
- Spray front- og sidedekselet med deionisert vann og 70 % etanol, og tørk av.
- Rengjør Autoload-beskyttelsesbåndet med en klut dynket med deionisert vann og 70 % etanol, og tørk av uten å presse.
- Når plattformen og komponentene er helt tørre, setter du holderne tilbake på plass.

**MERK** Feilaktig rengjøring og vedlikehold av ML STAR kan føre til krysskontaminasjon og dårlig analyseytelse.

## Kvalitetskontroll

Kontrollmateriale med kjente ytelseskarakteristikker kan evalueres for å detektere forskjeller i behandling og tekniske prosedyrer i laboratoriet.

Kjøring av en kontrollprøve eller en kontroll uten mal (NTC) reduserer det totale antallet ukjente maternelle prøver som kan behandles med hver prøveklargjøring.

Ikke overskrid to NTC-prøver per parti med 24 eller 48 prøver, eller fire NTC-prøver per parti med 96 prøver.

# Bruksanvisning

## Tips og teknikker

Med mindre et sikkert stoppunkt er spesifisert i protokollen, går du umiddelbart videre til neste trinn.

### Strekkoder for plater

- Strekkoder for plater med høy kant starter med PL.
- Strekkoder for dypbrønnsplater starter med DW.
- Fest strekkodene på siden av platene med høy kant og dypbrønnsplatene, inntil kolonne 12.
- Last platene med strekkoden vendt mot høyre for å aktivere automatisert skanning.

### Forsegling av platen og fjerning av forsegling

- Vær ekstremt forsiktig for å unngå krysskontaminasjon – det skal ikke være synlig væske på undersiden av forseglingen.
  - Sørg for at den avdekkede undersiden av forseglingen ikke kommer i kontakt med avdekkede brønner.
  - Ikke berør avdekkede brønner.
- Du må alltid forsegle 96-brønnersplaten før følgende trinn i protokollen:
  - Sentrifugeringstrinn
  - Termosyklusstrinn
- Du forseglar platen ved å påføre folieforseglingen på platen og deretter forsegle. Sørg for at det påføres trykk over hele platen, og at forseglingen er tett over hver enkelt brønn.
- Gjør følgende før forseglingen fjernes fra platen:
  - Sentrifuger 96-brønnersplaten på 1000 × g i 20 sekunder.
  - Plasser platen på et flatt underlag, og deretter fjernes forseglingen langsomt.

### VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Før bruk må du utføre og dokumentere obligatorisk vedlikehold i henhold til produsentens instruksjoner.
- Observer ML STAR under de automatiserte trinnene. Kontroller om det finnes meldinger og instruksjoner i grensesnittet for VeriSeq NIPT Workflow Manager v2.
- Sørg for at frontdekselet er på plass under drift.
- Sørg for at plattformen er fri for gjenstander under drift.
- Hvis du får opp alternativknappen **Exclude** (Utelukk) under en håndtering av en feilhendelse, må du under alle omstendigheter avstå fra å velge dette alternativet. Hvis metoden ikke kan gå videre etter håndteringen av en feilhendelse eller har begrensede håndteringsalternativer, avbryter du kjøringen.
- Hvis VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 ber om det under platevakuumtrinnene, må du hjelpe til med å opprette en forsegling mellom platen og vakuummanifolden manuelt.

- La systemet fjerne spisser fra adapteren automatisk. Ikke fjern spisser manuelt med mindre programvaren ber om det.
- Fjern brukte reagenser og bruk forbruksmateriell når Workflow Manager ber om det.
- Tøm vakuumavfallet hver dag. Den første avfallskurven skal aldri være mer enn halvfull. For mye vakuumavfall kan skade vakuumpumpen og redusere vakuumeffekten i systemet.
- For 24, 48 og 96 prøvepartier lastes et fullt stativ med de individuelt talte 8-kanalspissene inn før metode startes.

## Behandle prøver

### Prosedyre

1. Fullfør følgende trinn for hver aliquot:
  - a. Sentrifuger strekkodede prøver på 1600 × g i 10 minutter ved 4 °C med bremsen av.
  - b. Fjern prøverørene når sentrifugen har stoppet helt.Start plasmaisolering innen 15 minutter etter sentrifugering. Hvis det går mer enn 15 minutter, må du sentrifugere på nytt.
2. Inspiser hvert rør for prøvens egnethet ved å verifisere følgende krav:
  - Prøvevolumet er som forventet.
  - Tydelig separasjon mellom lagene av røde blodceller og plasma i prøvene er synlig etter sentrifugering.
  - Plasmanivået er minst 1,5 ml over buffy coat.
  - Prøven er ikke kraftig hemolysert (dvs. plasma ser ikke mørkerødt ut).
  - Prøven er ikke lipemisk (dvs. plasma ser ikke melkehvitt ut).
  - Prøven har ingen koagler.



#### FORSIKTIG

Prøver som ikke er oppbevart eller håndtert riktig, kan bli uegnede. Hvis uegnede prøver prosesseres gjennom arbeidsflyten, kan de tilstoppe bindingsplaten under ekstraksjoner og forårsake at prøver strømmer over i nærliggende brønner.

3. Ta lokket av rørene og last dem på rørholderne. Last alle prøver og eventuelle plasmakontroller for partiet.



#### FORSIKTIG

Hvis du får opp alternativet Exclude (Utelukk) under håndtering av en feilhendelse, skal du ikke velge det. Hvis metoden ikke kan gå videre etter håndteringen av en feilhendelse og du har begrensede alternativer for feilhåndtering, avbryter du kjøringen.

## Isolere plasma

### Klargjøring

1. Merk 1 dypbrønnsplate med «Intermediært plasma» og sett på en strekkode.
2. Merk 1 dypbrønnsplate med «Sluttplasma» og sett på en strekkode.
3. For 24, 48 og 96 prøvepartier lastes et fullt stativ med de individuelt talte 8-kanalspissene inn før metoden startes.



#### FORSIKTIG

Sørg for å bruke riktig platetype for plater med intermediært plasma og sluttplasma. Bruk av en dypbrønnsbeholder i stedet for en dypbrønnsplate fører til at prøver blir slått sammen og kan føre til feil resultater.

### Prosedyre

1. Åpne AppLauncher, og velg deretter **VeriSeq NIPT Method**.
2. Angi en unik parti-ID og brukernavn, og velg deretter **OK**.  
Parti-ID kan inneholde ≤ 26 tegn. Du kan bruke tall, bokstaver, understrek ( \_ ) eller bindestrek ( - ). For eksempel: 2025-10-16\_Batch3.  
Parti-ID-en skiller ikke mellom små og store bokstaver. Parti-ID-er som skiller mellom store og små bokstaver, anses ikke som unike.  
Partinavn må være unike, og må ikke bare avvike når det gjelder små og store bokstaver. For eksempel er ikke partinavnene Batch01 og batch01 unike. Samme regel gjelder navn på prøve-ID-er.
3. Velg **New Batch** (Nytt parti).
4. Etter initiering velger du **OK** for å begynne plasmaisolering.
5. Utfør ett av følgende trinn:
  - Hvis du vil laste inn et eksisterende prøveark, velger du prøvearket assosiert med partiet, og velger deretter **OK**.
  - For å gå videre uten å velge et prøveark velger du **No Sample Sheet** (Ikke prøveark).Du finner informasjon om hvordan du oppretter et prøveark, i *programvareveiledningen for VeriSeq NIPT Solution v2 (dokumentnr. 1000000067940)*.

**MERK** Prøvetype, singleton eller tvillinger, må registreres nøyaktig for hver prøve for å sikre riktig dataanalyse. Hvis du velger **No Sample Sheet** (Ikke prøveark), må du sørge for å angi standardverdier for prøvene i serviceverktøyene i Workflow Manager. Du finner mer informasjon i *programvareveiledningen for VeriSeq NIPT Solution v2 (dokumentnr. 1000000067940)*.

6. Velg partistørrelse, og velg deretter **OK**.

7. Velg antall kontroller uten mal (NTC-er), og velg deretter **OK**.  
NTC-sporene er alltid de siste sporene som velges. Hvis det for eksempel er to NTC-er i en kjøring med 24 prøver, er det posisjon 23 og 24 som er NTC-er.
8. Kontroller at alle strekkoder er festet på, og last deretter prøvene, spissene og platene (med strekkoden vendt mot høyre) på holderen.
9. Velg **OK** etter hver innlastingsmelding.

Størrelse på prøveparti	Holder-type	Spor	Artikkel	Posisjon
24, 48, 96	Spiss	7–12	1000 µl spisser	5
			1000 µl spisser (kun parti med 96)	4, 5
	Rør	15	Klargjorte blodprøverør 1–24 (for alle partistørrelser)	1–24
	Rør	16	Klargjorte blodprøverør 25–48 (kun partistørrelse 48 og 96)	25–48
	Rør	17	Klargjorte blodprøverør 49–72 (kun partistørrelse 96)	49–72
	Rør	18	Klargjorte blodprøverør 73–96 (kun partistørrelse 96)	73–96
	Multiflex	19–24	Tom dypbrønnsplate, sluttplasma – med strekkode	4
	Multiflex	19–24	Tom dypbrønnsplate, intermediært plasma – med strekkode	5
	Reagens	47	<b>[Valgfritt]</b> Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) – brukes til kontroll uten mal (NTC)	5

10. Sørg for at holderne, laboratoriestyret og reagensene lastes riktig inn.
11. Velg **OK** i skjermbildet Pre-Spin Deck Verification (Verifisering av plattform før sentrifugering).
12. Observer mens ML STAR utfører de automatiserte trinnene.
13. Når Workflow Manager ber om det, må du kontrollere at lasteplattformen på ML STAR er fri for hindringer, slik at ML STAR kan laste ut holderne.
14. Velg **Unload** (Last ut) for å laste av plattformen.
15. Fjern dypbrønnsplaten for intermediært plasma på følgende måte:
  - a. Inspiser platen for å kontrollere at volumet er konsekvent i hver brønn (ingen pipettefeil). Det forventede volumet er 1000 µl.
  - b. Registrer eventuelle inkonsekvenser når prosedyren for plasmaisolering er fullført.
  - c. Forsegl platen, last den forsiktig og sentrifuger på 5600 × g i 10 minutter med bremsen av eller på den laveste innstillingen.

16. Velg **Yes** (Ja) for å gå videre til klargjøring av sluttplasma.
17. Fjern plateforseglingen og sett platen tilbake på holderen.

Størrelse på prøveparti	Holder-type	Spor	Artikkel	Posisjon
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Dypbrønnsplate for intermediært plasma	5

18. Velg avmerkingsboksen **Intermediate Plasma plate has been spun** (Plate med intermediært plasma er blitt sentrifugert), og velg deretter **OK**.
19. Observer mens ML STAR utfører de automatiserte trinnene.
20. Når Workflow Manager ber om det, må du kontrollere at lasteplattformen på ML STAR er fri for hindringer, slik at ML STAR kan laste ut holderne.
21. Velg **Unload** (Last ut) for å laste av plattformen.
22. Når Workflow Manager ber om det, tømmer du holderne og plattformen.
23. Fjern dypbrønnsplaten for sluttplasma.
24. Inspiser platen med tanke på følgende feil:
  - Inkonsekvente volumer i hver brønn. Forventet volum er 900 µl.
  - Synlige celledelleter.
  - Svært uttalt hemolyse.

Hvis du ser unormale celledelleter eller svært uttalt hemolyse, ugyldiggjør du den berørte prøven på slutten av metoden for plasmaisolering eller bruker Batch Manager (Partibehandling). Du finner mer informasjon om partibehandling i *programvareveiledningen for VeriSeq NIPT Solution v2 (dokumentnr. 1000000067940)*.
25. Når Workflow Manager ber om det, velger du **OK**.
26. Legg inn kommentarer om berørte brønner, og velg deretter **OK**.
27. Utfør ett av følgende trinn.
  - Hvis du vil gå videre til cfDNA-ekstraksjon, velger du **Yes** (Ja).
  - Hvis du vil stoppe, velger du **Exit** (Avslutt).

#### SIKKERT STOPPUNKT

Hvis du skal stoppe, forsegler du platen for sluttplasma og oppbevarer den ved 2 °C til 8 °C i opptil 7 dager.

## Ekstrahere cfDNA

### Klargjøring

1. Kontroller ekstraksjons- og tilbehørsboksene visuelt for å bekrefte at settet ikke har gått ut på dato.
2. Klargjør følgende reagenser: Merk reservoarbeholderne og dypbrønnsreservoarene med navnet på reagensene.

Reagens	Oppbevaring	Instruksjoner
Dypbrønnsplate for sluttplasma	2 °C til 8 °C	Hvis platen har vært oppbevart, må du la den stå i 30 minutter for å oppnå romtemperatur. Sentrifuger på 1000 × g i 20 sekunder. Fjern forseglingen på dypbrønnsplaten for sluttplasma før bruk.

3. Tilsett langsomt 3,75 ml Proteinase Buffer til hver reagensflaske med proteinase K.

- Klargjør 3 flasker for 24 og 48 prøver.
- Klargjør 4 flasker for 96 prøver.

4. Sett lokk på proteinase K-flasken, og roter for å resuspendere.



#### FORSIKTIG

Ikke kontaminer gummiproppen. Hvis gummiproppen kommer i kontakt med andre stoffer, kan den kontaminere fremtidige prøver.

5. Bland klargjort proteinase K fra alle flasker i et reagenskar, og merk det som proteinase K.

6. Tilsett 100 ml 100 % EtOH i hver reagensflaske med Wash Buffer II.

- Klargjør 1 flaske for 24 og 48 prøver.
- Klargjør 2 flasker for 96 prøver.

7. Vend flasker med Wash Buffer II for å blande.

8. Merk av i avmerkingsboksene på flaskene med Wash Buffer II.

9. Merk en ny plate med høy kant med «Intermediær», og sett på en platestrekkode.

10. Merk en ny plate med høy kant med «cfDNA-eluering», og sett på en platestrekkode.

11. Merk en ny dypbrønnsplate med «Intermediær for ekstraksjon», og sett på en strekkode for dypbrønnsplate.

12. Sett på en platestrekkode på DNA-bindingsplaten.

13. Sett en folieforsegling på ubrukte brønner for bad med 24 og 48 prøver.

14. Klargjør en rengjøringsoppløsning med 70 % EtOH (70 % EtOH, 30 % DNase/RNase-fritt vann) for å rengjøre vakuumsystemet.

15. Klargjør vakuumsystemet på følgende måte:

- a. Fjern vakuummanifolden og rengjør med 70 % EtOH.  
Unngå å rengjøre pakningen med EtOH, ettersom materialet kan bli sprøtt.
- b. Tøm vakuumavfallet.
- c. Kontroller at ML STAR-vakuumsystemet er på.



## Prosedyre

1. Velg **OK** for å starte cfDNA-ekstraksjon.
2. Hvis **VeriSeq NIPT Method** ikke er åpen:
  - a. Åpne AppLauncher, og velg deretter **VeriSeq NIPT Method**.
  - b. Angi parti-ID og brukernavn, og velg deretter **OK**.
3. Last spisser på spissholderne som beskrevet nedenfor, og velg deretter **OK**.



### FORSIKTIG

Tilsett et fullt stativ med 8-kanalspisser før metoden for 24, 48 og 96 prøvepartier startes.

Størrelse på prøveparti	Holder-type	Spor	Artikkel	Posisjon
24	Spiss	1–6	1000 µl spisser	1
		7–12	300 µl spisser	1
48	Spiss	1–6	1000 µl spisser	1, 2
		7–12	300 µl spisser	1
96	Spiss	1–6	1000 µl spisser	1, 2, 3, 4
		7–12	300 µl spisser	1

4. Last optelte spisser på spissholderne som beskrevet nedenfor.

Størrelse på prøveparti	Holder-type	Spor	Artikkel	Posisjon
24, 48, 96	Spiss	49–54	1000 µl spisser	1
			300 µl spisser	2
			50 µl spisser	3

5. Angi posisjonen til den første og siste spissen for hvert spisstativ, og velg deretter **OK**.
6. Skann ekstraksjonsboksens strekkoder.
7. Angi brukernavnet eller initialene på personen som klargjorde reagensene, og velg deretter **OK**.
8. Skann tilbehørsboksens strekkoder.
9. Angi brukernavnet eller initialene på personen som klargjorde reagensene, og velg deretter **OK**.
10. Kontroller at strekkodene er festet på.
11. Fjern forseglingen på dypbrønnsplaten for sluttplasma ved behov.

12. Last platene (med strekkoden vendt mot høyre) på plateholderen som beskrevet nedenfor, og velg deretter **OK**.

Størrelse på prøveparti	Holder-type	Spor	Artikkel	Posisjon
24, 48, 96	Multiflex	19– 24	Ny plate med høy kant, intermediær, med strekkode	1
			Ny plate med høy kant, cfDNA-eluering, med strekkode	2
			Ny dypbrønnsplate, intermediær for ekstraksjon, med strekkode	4
			Dypbrønnsplate for sluttplasma, med strekkode	5

13. Kontroller at DNA-bindingsplaten har strekkode, og velg deretter **OK**.
14. For delvise platepartier påføres en tilpasset plateforsegling over de ubrukte brønnene (kolonne 4–12 for 24 prøvepartier og kolonne 7–12 for 48 prøvepartier).
15. Last DNA-bindingsplaten på vakuummanifolden med strekkoden vendt mot høyre.
16. Kontroller brønnene med tanke på hindringer før bindingsplaten plasseres på BVS-manifolden. Dette kan hemme flyten av reagenser under vakuum.
17. Dekk til ubrukte brønner og forsegle med folieforsegling ved bruk av 24 eller 48 prøvepartier. Velg avmerkingsboksen **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (Er DNA-bindingsplatekolonner forseglet?), og velg **OK**.
18. Last reagensbeholderne på reagensholderen som beskrevet nedenfor, og velg deretter **OK**.

Størrelse på prøveparti	Holder-type	Spor	Artikkel	Posisjon
24, 48	Reagens	47	16 ml Elution Buffer	1
			11 ml Proteinase K	2
96	Reagens	47	16 ml Elution Buffer	1
			15 ml Proteinase K	2

19. Overfør de spesifiserte reagensene i dypbrønnsreservoarene, og last deretter reservoarene på dypbrønnsholderne som beskrevet nedenfor.
20. Velg **OK**.

Størrelse på prøveparti	Holder-type	Spor	Artikkel	Posisjon
24, 48	Dypbrønn	39–44	125 ml Wash Buffer II	1
			125 ml Wash Buffer I	2
			60 ml 100 % EtOH	3
			100 ml Lysis Buffer	4
			60 ml DNase/RNase-fritt vann	5
96	Dypbrønn	39–44	200 ml Wash Buffer II	1
			125 ml Wash Buffer I	2
			100 ml 100 % EtOH	3
			100 ml Lysis Buffer	4
			100 ml DNase/RNase-fritt vann	5

21. Vent til den automatiserte reagensvolumkontrollen er fullført.
22. Kontroller at vakuumavfallet er tomt (halvfullt anbefales), og velg deretter **OK**.
23. Kontroller plasseringen av alle holdere, laboratoriestyr og reagenser, og velg deretter **OK** i skjermbildet Extraction Deck Verification (Verifisering av ekstraksjonsplattform).
24. Observer ML STAR under de automatiserte trinnene.



Du må ugyldiggjøre overflyt av prøve manuelt dersom det ikke er registrert av systemet før kontamineringen av nærliggende brønner.

25. Etter det siste vakuumtrinnet fjerner du DNA-bindingsplaten og rengjør bunnen med 70 % EtOH.
26. Forsegl brønner som ikke er dekket på DNA-bindingsplaten, og plasser deretter DNA-bindingsplaten på den tomme dypbrønnsplaten for sluttplasma.
27. Sentrifuger DNA-bindingsplaten/platen for sluttplasma på 5600 × g i 10 minutter med bremsen på.
28. Velg **OK**.
29. Fullfør vakuumrengjøringen under sentrifugering av DNA-bindingsplaten:
- Fjern vakuummanifolden, og velg deretter **OK**.
  - Vent til den automatiserte avfallshåndteringen er fullført.
  - Rengjør vakuummanifolden og innsiden av vakuumsystemet med 70 % EtOH, og sett deretter vakuummanifolden tilbake på plass.
  - Velg avmerkingsboksen **Manifold is on Vacuum** (Manifold er på vakuum) for å starte overføringen av elueringsplaten til vakuummanifolden, og velg deretter **OK**.

30. Etter sentrifugering åpnes brønnene som inneholder prøver på DNA-bindingsplaten.
31. Plasser DNA-bindingsplaten oppå cfDNA-elueringsplaten som er på vakuummanifolden.
32. Last DNA-bindingsplaten med strekkoden vendt mot høyre, og velg deretter **OK**.
33. Observer ML STAR under de automatiserte trinnene.
34. Etter inkubasjonstrinnet velger du avmerkingsboksen **Plates are assembled as indicated** (Plater settes sammen som angitt). Kontroller at DNA-bindingsplaten/cfDNA-elueringsplaten står på et stativ (hvis det kreves for sentrifugering).
35. Forsegl brønner som ikke allerede er dekket på DNA-bindingsplaten.
36. Sentrifuger på  $5600 \times g$  i 2 minutter med bremsen på, og velg deretter **OK**.
37. Inspiser cfDNA-elueringsplaten visuelt for å kontrollere at volumet er konsekvent i hver brønn. Det forventede volumet er ca. 55  $\mu$ l.
38. Forsegl og ta vare på cfDNA-elueringsplaten med tanke på bibliotekklargjøring.
39. Når Workflow Manager ber om det, må du kontrollere at lasteplattformen på ML STAR er fri for hindringer, slik at ML STAR kan laste ut holderne.
40. Velg **Unload** (Last ut) for å laste av plattformen.
41. Last ut alle holderne og rengjør plattformen på ML STAR. Velg deretter **OK**.
42. Legg inn kommentarer om berørte brønner, og velg deretter **OK**.
43. Utfør ett av følgende trinn:
  - Hvis du vil fortsette til bibliotekklargjøring, velger du **Yes** (Ja).
  - Hvis du vil stoppe, velger du **Exit** (Avslutt).

## SIKKERT STOPPUNKT

Hvis du skal stoppe, forsegler du cfDNA-elueringsplaten og oppbevarer den ved  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  til  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  i opptil 7 dager.

## Klargjøre biblioteker

### Klargjøring

1. Kontroller bibliotekklargjørings- og tilbehørsboksene visuelt for å bekrefte at settene ikke har gått ut på dato.
2. Klargjør følgende reagenser: Merk reservoarbeholderne og dypbrønnsreservoarene med reagensnavnene.

Reagens	Oppbevaring	Instruksjoner
A-Tailing Mix	-25 °C til -15 °C	Tin ved romtemperatur. Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
cfDNA-elueringsplate	-25 °C til -15 °C	Hvis platen har stått til oppbevaring, må du kontrollere at den ikke har vært oppbevart i mer enn 7 dager, og deretter tine den ved romtemperatur. Roter ved 1500 o/min i 1 minutt. Sentrifuger på 1000 × g i 20 sekunder.
End Repair Mix	-25 °C til -15 °C	Tin ved romtemperatur. Roter for å blande.
Hybridization Buffer	-25 °C til -15 °C	Tin ved romtemperatur. Roter for å blande. <b>Sett tilbake til oppbevaring etter bruk.</b>
Ligation Mix	-25 °C til -15 °C	Tin ved romtemperatur. Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
NIPT DNA Adapter Plate	-25 °C til -15 °C	Tin ved romtemperatur. Roter for å blande. Sentrifuger på 1000 × g i 20 sekunder.
Resuspension Buffer	2 °C til 8 °C	Roter for å blande. <b>Sett tilbake til oppbevaring etter bruk.</b>
Sample Purification Beads	2 °C til 8 °C	La stå i 30 minutter for å oppnå romtemperatur. Roter kraftig før hver bruk. Bland ved å rotere eller snu flasken til alle kulene er i suspensjon og blandingen er homogen.



#### FORSIKTIG

Ved fjerning av forsegling på NIPT DNA-adapterplaten er det utrolig viktig å unngå aerosolkrysskontaminasjon fra brønn til brønn, som kan gi feil resultater.

3. Hvis cfDNA-elueringsplaten ble oppbevart fryst, klargjøres den på følgende måte:
  - a. Tin ved romtemperatur.
  - b. Roter ved 1500 o/min i 1 minutt.
  - c. Sentrifuger på 1000 × g i 20 sekunder.
4. Merk én ny plate med kant med «Bibliotek», og sett på en platestrekkode.

5. Klargjør 80 % EtOH fra absolutt EtOH. Kombiner 40 ml 100 % EtOH og 10 ml DNase/RNase-fritt vann. Bland ved å vende flasken.
6. Kontroller at ML STAR-termostyring er på.

## Fortynne enzymer

1. Kombiner A-Tailing Mix og Resuspension Buffer i et rør med skrukork. Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.

Størrelse på prøveparti	A-Tailing Mix (µl)	Resuspension Buffer (µl)
24, 48	900	1200
96	1800	2400

2. Kombiner Ligation Mix og Resuspension Buffer i et rør med skrukork. Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.

Størrelse på prøveparti	Ligation Mix (µl)	Resuspension Buffer (µl)
24, 48	230	1713
96	440	3278

## Prosedyre

1. Velg **OK** for å starte bibliotekklargjøring. Hvis **VeriSeq NIPT Method** ikke allerede er åpen:
  - a. Åpne AppLauncher, og velg **VeriSeq NIPT Method**.
  - b. Angi parti-ID og brukernavn, og velg deretter **OK**.
2. Kontroller at følgende forbruksmaterieell er klargjort som angitt i skjermbildet Reagent Preparation (Reagensklargjøring):
  - A-Tailing Mix, Ligation Mix og 80 % EtOH
  - Sample Purification Beads, End Repair Mix og NIPT DNA Adapter Plate
3. Velg avmerkingsboksene, og velg deretter **OK**.
4. Skann bibliotekklargjøringsboksens strekkoder.
5. Angi brukernavnet eller initialene på personen som klargjorde reagensene, og velg deretter **OK**.
6. Skann tilbehørsboksens strekkoder.
7. Angi brukernavnet eller initialene på personen som klargjorde reagensene, og velg deretter **OK**.

8. Last spisser på spissholderne som beskrevet nedenfor, og velg deretter **OK** for hver holder.

Størrelse på prøveparti	Holdertype	Spor	Artikkel	Posisjon
24	Spiss	1–6	50 µl spisser	1
		7–12	300 µl spisser	1, 2
48	Spiss	1–6	50 µl spisser	1, 2
		7–12	300 µl spisser	1, 2, 3, 4
96	Spiss	1–6	50 µl spisser	1, 2, 3, 4
		7–12	300 µl spisser	1, 2, 3, 4, 5

9. Hvis du stoppet protokollen etter prosedyren for cfDNA-ekstraksjon, laster du opptelte spisser på spissholderne på følgende måte.

Størrelse på prøveparti	Holdertype	Spor	Artikkel	Posisjon
24, 48, 96	Spiss	49–54	1000 µl spisser	1
			300 µl spisser	2
			50 µl spisser	3

10. Angi posisjonen til den første spissen for hvert spisstativ, og velg deretter **OK**.

11. Kontroller at strekkodene er festet på platene, og last platene (med strekkoden vendt mot høyre) på plateholderen som beskrevet nedenfor, og velg deretter **OK**.

Størrelse på prøveparti	Holdertype	Spor	Artikkel	Posisjon
24, 48, 96	Multiflex	19–24	cfDNA-elueringsplate, med strekkode	1
			NIPT DNA-adapterplate, med strekkode	2
			Ny 96-brønners plate med høy kant, biblioteker, med strekkode	3
			Nye 96-brønners plater med høy kant	4, 5

12. Last dypbrønnsholderen som beskrevet nedenfor, og velg deretter **OK**.

Størrelse på prøveparti	Holdertype	Spor	Artikkel	Posisjon
24, 48, 96	Dypbrønn	39–44	50 ml 80 % EtOH i et dypbrønnsreservoar	1
			Nye 96-brønners plater med høy kant	2, 3, 4, 5

13. Last reagensbeholderne på reagensholderen som beskrevet nedenfor, og velg deretter **OK**.

Størrelse på prøveparti	Holdertype	Spor	Artikkel	Posisjon
24, 48, 96	Reagens	47	2,5 ml End Repair Mix	1
			Klargjort A-Tailing Mix (totalt volum)	2
			Klargjort Ligation Mix (totalt volum)	3
			10 ml Sample Purification Beads	4
			12 ml Hybridization Buffer	5

14. Ta vare på resten av 12 ml hybridiseringsbuffer (HT1) i beholderen for sammenslåing.
15. Kontroller at holderne, laboratoriestyret og reagensene er lastet som anvist, og velg deretter **OK** i skjermbildet Library Deck Verification (Verifisering av plattform for bibliotek).
16. Vent til den automatiserte reagensvolumkontrollen er fullført.
17. Observer ML STAR under de automatiserte trinnene.
18. Når Workflow Manager ber om det, må du kontrollere at lasteplattformen på ML STAR er fri for hindringer, slik at ML STAR kan laste ut holderne.
19. Velg **Unload** (Last ut) for å laste av plattformen.
20. Inspiser bibliotekplaten for å kontrollere at volumet er konsekvent i hver brønn.



### FORSIKTIG

Hvis brønnvolumene ikke er konsekvente, kan prøvene gi feil resultat.

21. Forsegel og behold bibliotekplaten hvis den skal oppbevares.
22. Last ut holderne, rengjør plattformen, og velg deretter **OK**.
23. Legg inn kommentarer om berørte brønner, og velg deretter **OK**.
24. Utfør ett av følgende trinn:
  - Hvis du vil fortsette til bibliotekkvantifisering, velger du **Yes** (Ja).
  - Hvis du vil stoppe, velger du **Exit** (Avslutt).

### SIKKERT STOPPUNKT

Hvis du skal stoppe, forsegler du bibliotekplaten før oppbevaring. Bibliotekplaten er stabil i opptil 7 dager fra klargjøringsdatoen ved  $-25\text{ °C}$  til  $-15\text{ °C}$ .



## Kvantifisere biblioteker

### Klargjøring

1. Klargjør følgende reagenser:

Reagens	Oppbevaring	Instruksjoner
DNA Quantification Reagent	2 °C til 8 °C	Beskyttes mot lys. La tine ved romtemperatur i 30–150 minutter. (Det anbefales at du fjerner reagens i begynnelsen av prosedyren for bibliotekklargjøring.) Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
DNA Quantification Standard	2 °C til 8 °C	Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
Resuspension Buffer	2 °C til 8 °C	Roter for å blande.

2. Hvis bibliotekplaten ble oppbevart fryst, klargjøres den på følgende måte:
  - a. Bekreft at den ikke ble oppbevart i mer enn 7 dager, og deretter tiner du den ved romtemperatur.
  - b. Roter for å blande.
  - c. Sentrifuger ved 1000 x g i 1 minutt.
3. Slå på fluorometeret 10 minutter før det skal brukes.
4. Påfør en platestrekkode på en ny 384-brønnersplate.
5. Påfør en platestrekkode på en ny plate med kant.

### Prosedyre

1. Velg **OK** for å starte kvantifisering.
2. Hvis VeriSeq NIPT Method ikke allerede er åpen:
  - a. Åpne AppLauncher, og velg **VeriSeq NIPT Method**.
  - b. Angi parti-ID og brukernavn, og velg deretter **OK**.
3. Skann tilbehørsboksens strekkoder.
4. Angi brukernavnet eller initialene på personen som klargjorde reagensene, og velg deretter **OK**.
5. Last spisser på spissholderen som beskrevet nedenfor, og velg deretter **OK**.

Størrelse på prøveparti	Holdertype	Spor	Artikkel	Posisjon
24, 48	Spiss	1–6	300 µl spisstativ	1
			50 µl spisstativ	2
96	Spiss	1–6	300 µl spisstativ	1
			50 µl spisstativ	2, 3

6. Kontroller at strekkodene er festet på.
7. Fjern forseglingen fra bibliotekplatene ved behov.
8. Last platene (med strekkoden vendt mot høyre) på Multiflex-holderen som beskrevet nedenfor, og velg deretter **OK**.

Størrelse på prøveparti	Holdertype	Spor	Artikkel	Posisjon
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Nye plater med høy kant, med strekkode	1
			Ny 384-brønnersplate, med strekkode	2
			Bibliotekplate, med strekkode	3
			Nye 96-brønners plater med høy kant	4, 5

9. Last reagensrør uten lokk på rørholderen som beskrevet nedenfor, og velg deretter **OK**.

Størrelse på prøveparti	Holdertype	Spor	Artikkel	Posisjon
24, 48, 96	Rør	46	DNA Quantification Standard	1
			DNA Quantification Reagent	2

10. Last reagensbeholderne på reagensholderen som beskrevet nedenfor, og velg deretter **OK**.

Størrelse på prøveparti	Holdertype	Spor	Artikkel	Posisjon
24, 48, 96	Reagens	47	Ny reagensbeholder (tom)	1
			16 ml Resuspension Buffer	2

11. Hvis du stoppet protokollen etter prosedyren for bibliotekklargjøring, laster du opptelte spisser på spissholderne som beskrevet nedenfor.

Størrelse på prøveparti	Holdertype	Spor	Artikkel	Posisjon
24, 48, 96	Spiss	49–54	1000 µl spisser	1
			300 µl spisser	2
			50 µl spisser	3

12. Angi posisjonen til den første og siste spissen for hvert spisstativ, og velg deretter **OK**.
13. Kontroller at holderne, laboratoriestyret og reagensene er lastet som anvist, og velg deretter **OK** i skjermbildet Quant Deck Verification (Verifisering av plattform for kvantifisering).
14. Vent til den automatiserte reagensvolumkontrollen er fullført.

15. Observer ML STAR under de automatiserte trinnene.
16. Når Workflow Manager ber om det, må du kontrollere at lasteplattformen på ML STAR er fri for hindringer, slik at ML STAR kan laste ut holderne.
17. Velg **Unload** (Last ut) for å laste av plattformen.
18. Last ut bibliotekplaten.
  - a. Inspiser platen for å kontrollere at volumet er konsekvent i hver brønn.
  - b. Forsegl bibliotekplaten og oppbevar den ved romtemperatur til analysen av fluorometriske data er fullført.
19. Last ut de resterende 96-brønnersplatene og kontroller at volumet er konsekvent i hver brønn. Store volumfeil kan tyde på et problem med pipetteringstrinn.
20. Last ut 384-brønnersplaten, og kontroller om det er væske i de riktige brønnene.
21. Forsegl platen med en folieforsegling.
22. Sentrifuger på 1000 × g i 20 sekunder.
23. Inkuber ved romtemperatur i 10 minutter beskyttet mot lys.
24. Last ut alle holdere.
25. Rengjør plattformen på ML STAR. Velg deretter **OK**.

**FORSIKTIG**

Ikke kast kvantifiseringsreagenser før dataene er generert. Du vil trenge reagensene hvis du må utføre en ny kvantifisering.

26. Etter inkubering fjerner du folieforseglingen og laster 384-brønnersplaten på mikroplateleseren. Sørg for å bruke den lilla adapterplaten (delenummer: 0310-4336) fra Molecular Devices eller tilsvarende hvis det er aktuelt for instrumentet som er i bruk.
  - Sørg for at A1 befinner seg øverst i venstre hjørne ved innlasting.
27. Dobbelklikk på VeriSeq NIPT-malen for å åpne den i SoftMax Pro.
28. Velg **New Experiment** (Nytt eksperiment) i fanen Home (Hjem).
29. Velg **Read** (Les).
30. Eksporter dataene som XML på følgende måte.
  - a. Høyreklikk på **Plate**, og velg deretter **Rename** (Gi nytt navn).
  - b. Skann strekkoden på kvantifiseringsplaten, og velg deretter **OK**.
  - c. Velg plateikonet øverst i venstre hjørne av skjermbildet, og velg deretter **Export** (Eksporter) i menyen.
  - d. Velg avmerkingsboksen **Expt name** (Eksp.navn), angi platedatoalternativet som rå, konfigurere utdataformatet som XML, og velg deretter **OK**.
  - e. Konfigurer utdatafilbanen og -navnet, og velg deretter **Save** (Lagre).  
Hamilton-datamaskinen må kunne få tilgang til filplasseringen. Ikke bruk mellomrom i filnavnet eller filbanen.

## Analyse

1. Angi fluorometer-ID-en i skjermbildet Scanner Information (Skannerinformasjon) på ML STAR.
2. Legg inn kommentarer om fluorometerkjøringen, og velg deretter **OK**.
3. Naviger til \*.xml-kvantifiseringsfilen som inneholder de fluorometriske dataene, og velg deretter **OK**.
4. Gjennomgå standardkurvens og prøvekonsentrasjonens analyseresultater, og velg deretter **OK**.
5. Hvis du må skanne platen på nytt, velger du **Rescan** (Skann på nytt).  
Prøver er tids- og lysfølsomme. Ved behov utføres ny skanning umiddelbart.
6. Legg inn kommentarer om berørte brønner, og velg deretter **OK**.
7. Vurder resultatene og fortsett som beskrevet nedenfor.
  - Hvis resultatene oppfyller spesifikasjonene, fortsetter du til [Slå sammen biblioteker på side 36](#). Du finner spesifikasjoner i tabellen Kvantifiseringskontrollmetrikk og -grenser i Programvareveiledning for VeriSeq NIPT Solution v2 (dokumentnr. 1000000067940).
  - Hvis resultatene ikke oppfyller spesifikasjonene, avbryter systemet metoden. Gjenta kvantifiseringsprosedyrene fra og med [Klargjøring på side 33](#).
8. Utfør ett av følgende trinn:
  - Hvis du vil fortsette til [Slå sammen biblioteker på side 36](#), velger du **Yes** (Ja).
  - Hvis du vil stoppe, velger du **Exit** (Avslutt).

### SIKKERT STOPPUNKT

Hvis du skal stoppe, forsegler du bibliotekplaten før oppbevaring. Bibliotekplaten er stabil i opptil 7 dager samlet oppbevaring ved  $-25\text{ °C}$  til  $-15\text{ °C}$ .

## Slå sammen biblioteker

### Klargjøring

1. Klargjør følgende reagenser:

Reagens	Oppbevaring	Instruksjoner
Hybridiseringsbuffer	$-25\text{ °C}$ til $-15\text{ °C}$	Tin ved romtemperatur. Roter for å blande. Sett tilbake til oppbevaring etter bruk.

2. Hvis bibliotekplaten ble oppbevart fryst, klargjøres den på følgende måte:
  - a. Bekreft at den ikke ble oppbevart i mer enn 7 dager, og deretter tiner du den ved romtemperatur.
  - b. Roter ved 1500 o/min i 1 minutt.
  - c. Sentrifuger på  $1000 \times g$  i 20 sekunder.
  - d. Bland ved å pipettere.
3. Merk et tomt sammenslåingsrør med «Blanding A». Ved 96 prøver merker du enda et tomt sammenslåingsrør med «Blanding B».

4. Lagre følgende denatureringsprogram på termosykleren med oppvarmet lokk.
  - a. Velg alternativet for oppvarmet lokk og still inn på 102 °C.
  - b. Still inn reaksjonsvolumet på 50 µl.
  - c. Still inn rampehastighet på maksimum ( $\geq 2$  °C per sekund).
  - d. Inkuber ved 96 °C i 10 minutter, og deretter ved 4 °C i 5 sekunder.
  - e. Holdes på 4 °C.

## Prosedyre

1. Plasser bibliotekplaten på den forhåndsprogrammerte termosykleren og kjør denatureringsprogrammet. Ikke denaturer bibliotekplaten før kvantifiseringen har bestått QC-metrikkene, ettersom det kan være at du må utføre en ny kvantifisering.
2. Sentrifuger bibliotekplaten på 1000 × g i 20 sekunder.
3. Start sammenslåingsbiblioteker ved å velge **OK**.
4. Hvis VeriSeq NIPT Method ikke er åpen:
  - a. Åpne AppLauncher og velg **VeriSeq NIPT Method**.
  - b. Angi parti-ID og brukernavn, og velg deretter **OK**.
5. Velg blandingskonsentrasjon, og velg deretter **OK**.  
Målklyngetettheten er 220–260 K/mm<sup>2</sup>.

**MERK** Sammenslåingskonsentrasjoner og/eller sammenslåingsvolumer må kanskje økes for 24 prøvepartier for å opprettholde lignende klyngetettheter som er oppnådd med 48/96 prøvepartier.

6. Utfør ett av følgende trinn hvis Workflow Manager ber om det:
  - Hvis du vil laste inn et prøveark velger du prøvearket assosiert med partiet, og velger deretter **Load** (Last).
  - Hvis du vil bruke systemets standardverdier for resterende prøvetyper, kjønnsrapportering eller screeningtype, velger du **Use Default** (Bruk standard) for hver innstilling.  
Du finner informasjon om hvordan du oppretter et prøveark, i *programvareveiledningen for VeriSeq NIPT Solution v2* (dokumentnr. 1000000067940).
7. Velg **Start** for å starte tidsuret for denatureringsplaten.
8. Last spisser på spissholderne som beskrevet nedenfor.

Størrelse på prøveparti	Holdertype	Spør	Artikkel	Posisjon
24, 48, 96	Spiss	7–12	50 µl filterspisser	1

9. Last den denaturerte bibliotekplaten (med strekkoden vendt mot høyre) på Multiflex-holderen som beskrevet nedenfor, og velg deretter **OK**.

Størrelse på prøveparti	Holdertype	Spor	Artikkel	Posisjon
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Denaturert bibliotekplate (med strekkode)	1

10. Last sammenslåingsrør på rørholderen som beskrevet nedenfor, og velg deretter **OK**.

Størrelse på prøveparti	Holdertype	Spor	Artikkel	Posisjon
24, 48	Rør	46	Nytt 2 ml rør, blanding A	1
96	Rør	46	Nytt 2 ml rør, blanding A	1
			Nytt 2 ml rør, blanding B	2

11. Last reagensbeholderne på reagensholderen som beskrevet nedenfor, og velg deretter **OK**.

Størrelse på prøveparti	Holdertype	Spor	Artikkel	Posisjon
24, 48, 96	Reagens	47	3 ml Hybridization Buffer	1

12. Last spisser på spissholderne som beskrevet nedenfor.

Størrelse på prøveparti	Holdertype	Spor	Artikkel	Posisjon
24, 48, 96	Spiss	49–54	1000 µl filterspisser	1
			300 µl filterspisser	2
			50 µl filterspisser	3

13. Angi posisjonen til den første og siste spissen for hvert spisstativ, og velg deretter **OK**.
14. Sørg for at holderne, laboratorieutstyret og reagensene lastes inn som angitt.
15. Velg **OK** i skjermbildet Pooling Deck Verification (Verifisering av plattform før sammenslåing).
16. Observer ML STAR under de automatiserte trinnene.
17. Legg inn kommentarer om de berørte brønnene, og velg deretter **OK**.
18. Når Workflow Manager ber om det, må du kontrollere at lasteplattformen på ML STAR er fri for hindringer, slik at ML STAR kan laste ut holderne.
19. Velg **Unload** (Last ut) for å laste av plattformen.
20. Tøm rørholderen.
21. Sett lokk på hvert sammenslåingsrør, roter og sentrifuger deretter et lite øyeblikk.
22. Velg **OK**.

23. Sekvenser biblioteker så snart som mulig etter sammenslåing. Forsegl bibliotekplaten, og oppbevar den ved  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  til  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  i opptil 7 dager for en eventuell ny sammenslåing.

#### SIKKERT STOPPUNKT

Hvis du skal stoppe, setter du hette på sammenslåingsrørene og oppbevarer dem ved  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  til  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  i opptil 7 dager.

## Klargjøre sammenslåtte biblioteker for sekvensering

### Klargjøring

1. Klargjør følgende reagenser:

Reagens	Oppbevaring	Instruksjoner
Sammenslåingsrør	$-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$	Tin ved romtemperatur hvis den har vært oppbevart. Roter et kort øyeblikk. Sentrifuger et kort øyeblikk.

2. Klargjør nestegenerasjons sekvenseringssystemet ved å fylle ut følgende felt i VeriSeq NIPT-modulen i Local Run Manager:
- Run Name (Kjøringsnavn)
  - [Valgfritt] Beskrivelse av kjøringen
  - Pool Barcode (Strekkode for sammenslåing)



#### FORSIKTIG

Strekkoden for sammenslåing som angis i LRM-modulen må være identisk med strekkoden for sammenslåing som er angitt i Workflow Manager. Feil kjøringsskonfigurasjoner vil bli avvist av analyseprogramvaren og kreve ny sekvensering.

Du finner mer informasjon om hvordan du bruker VeriSeq NIPT-modulen i Local Run Manager i programvareveiledningen for *VeriSeq NIPT Solution v2* (dokumentnr. 1000000067940).

## Prosedyre

1. Kombiner følgende volumer i reagenskassetene, og deretter blander du ved å pipettere.
  - Hybridization Buffer (900 µl)
  - 450 µl Pool A (450 µl)
2. Fortsett med sekvensering ved hjelp av et nestegenerasjons sekvenseringssystem ved å følge systemveiledningen.  
referanseveiledningen for nestegenerasjons sekvenseringsinstrumentet. For NextSeq 550Dx, se *referanseveiledningen for NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 100000009513)* eller pakningsvedlegget for *NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 1000000043133)*.
3. Bekreft riktig kjøringskonfigurasjon når du blir bedt om det.
4. Gjenta denne prosedyren for blanding B ved behov.
  - For å oppnå området for målklyngetetthet kan bibliotekplaten slås sammen på nytt med en annen blandingskonsentrasjon på Hamilton. En ny sammenslåing vil ugyldiggjøre den opprinnelige blandingen.
  - Alternativt kan blandingsforholdet til HT1 (450 µl + 900 µl) endres for å oppnå området for målklyngetetthet.

## Neste generasjons sekvensering (NGS)

VeriSeq NIPT Solution v2 kan brukes med en neste generasjons sekvenseringssystem med følgende spesifikasjoner:

- Mulighet for 2 x 36 paired-end-avlesinger.
- Kompatibel med indeksadaptere i VeriSeq NIPT Sample Prep.
- Tokanals kjemi.
- Automatisk produksjon av .BCL-filer (rådata fra sekvenseringsinstrument).
- 400 millioner paired-end-avlesinger per kjøring.
- Kompatibel med VeriSeq NIPT Assay Software v2.

NextSeq 550Dx er kompatibel med VeriSeq NIPT Solution v2.

## Sekvensdataanalyse

Etter at sekvenseringen er fullført, sendes sekvenseringsdata automatisk til VeriSeq NIPT Assay Software v2 for analyse og rapportgenerering. Rapporten inneholder klassifiseringer for hver prøve i partiet samt en vurdering av alle QC-metrikker for kjøringen. Analyseprosessen fra fullført sekvensering til endelige resultater tar ca. 4 timer for et parti med 48 prøver. Du finner detaljert informasjon om dataanalysen og utdatafilen i *programvareveiledningen for VeriSeq NIPT Solution v2 (dokumentnr. 1000000067940)*.



## Tolking av resultater

VeriSeq NIPT Solution v2-algoritmen bruker en avansert statistisk modell som kombinerer flere ulike typer informasjon fra innsamlingen av paired-end-sekvenserte bibliotekfragmenter. Denne modellen brukes til å detektere regioner i genomet som er under- eller overrepresentert i biblioteket for hver prøve. Ikke minst redegjør denne modellen for hvorvidt graden av under- eller overrepresentasjon er kvantitativt forenlig med en aneuploid hendelse i det føtale genomet ved det nivået for føtal fraksjon som er estimert for biblioteket.

For alle kromosomer blir paired-end-sekvenseringsdata innrettet med referansegenomet (HG19). Unike, ikke-dupliserte justerte avlesninger aggregeres i bin-filer på 100 kB. De tilsvarende bin-tallene justeres for GC-avvik og i henhold til tidligere etablert, regionsspesifikk genomisk dekning. Med slike normaliserte bin-tellinger oppnår man statistiske scorere for hvert autosom ved å sammenligne de dekningsregionene som kan være affisert av aneuploidi med resten av autosomene. Et sannsynlighetsforhold for logg (LLR) beregnet for hver prøve, der det tas hensyn til disse dekningsbaserte scorene og den anslåtte føtale fraksjonen. LLR er sannsynligheten for at en prøve påvirkes tatt i betraktning den observerte dekningen og føtale fraksjonen kontra sannsynligheten for at en prøve ikke påvirkes tatt i betraktning den samme observerte dekningen. Beregningen av dette forholdet tar også hensyn til den anslåtte usikkerheten i føtal fraksjon. Forholdets naturlige logaritme brukes til påfølgende beregninger. Assay Software vurderer LLR for hvert målkromosom og hver prøve for å gi en bestemmelse om aneuploidi.

Ved opprettelse av et parti må du definere prøvetypen (singleton eller tvilling), screeningtypen (basis eller helgenom) og hvorvidt rapportering av kjønnskromosomer (Ja, Nei og SCA) er ønskelig for hver prøve. Til sammen bestemmer disse alternativene hvilken informasjon som rapporteres for hver prøve.

For alle prøvetyper bestemmer screeningtypen hvilke autosomale anomalier som rapporteres. For basisscreeningen rapporteres kun trisomihendelser for hele kromosomet 13, 18 og 21. For helgenomscreeningen rapporteres hel eller partiell sletting eller duplikasjon for alle autosomale kromosomer. Lengden på den minste rapporterbare partielle slettingen eller duplikasjonen av et kromosom, er 7 Mb.

For singleton-prøver er det mulig å deaktivere rapportering av kjønnskromosomer. Du kan også konfigurere systemet slik at aneuploidier av kjønnskromosomer rapporteres enten med eller uten rapportering av kjønn for euploide prøver.

Hvis Yes (Ja) er valgt for rapportering av kjønnskromosomer for tvillingprøver, vil resultatet begrenses til å rapportere tilstedeværelse eller fravær av et Y-kromosom i biblioteket. Aneuploidi av kjønnskromosomer kan ikke rapporteres for tvillingprøver.

Resultatet ANOMALY DETECTED (ANOMALI DETEKTERT) innebærer at prøven har testet positivt for en eller flere anomalier i samsvar med den valgte screeningtypen og innstillingen av alternativet for rapportering av kjønnskromosomer. Når en anomali er detektert, gir rapporten en beskrivelse av anomalien i form av en cytogenetisk betegnelse.

VeriSeq NIPT Assay Software v2 bruker statistikk generert under sekvensering til å gi et estimat for føtal fraksjon (FFE) for hver prøve. FFE er den estimerte føtale cfDNA-komponenten som registreres av analysen og rapporteres som en avrundet prosentats for hver prøve. Gjennomsnittlig standardavvik for dette estimatet for alle prøver er 1,3 %. FFE skal ikke brukes alene for å utelukke prøver ved rapportering av resultater.

For å opprette betegnelser for kromosomal representasjon bruker VeriSeq NIPT Assay Software v2 den individualiserte konfidens testen for føtal aneuploidi (iFACT), en dynamisk terskelmetrikk som angir om systemet har generert tilstrekkelig sekvenseringsdekning gitt estimatet for føtal fraksjon for hver prøve. Negative betegnelser rapporteres kun hvis prøven når iFACT-terskelen. Hvis en prøve ikke når denne terskelen, viser QC-vurderingen meldingen FAILED iFACT (MISLYKKET iFACT), og systemet vil ikke generere et resultat.

I tillegg til iFACT vurderer VeriSeq NIPT Assay Software v2 flere andre QC-metrikker under analysen. Disse andre metrikkene omfatter vurderinger av dekningsens ensartethet på referansegenomregioner og fordelingen av cfDNA-fragmentlengder. QC-vurderingen viser enten et QC-flagg eller en QC-feil for metrikker utenfor det akseptable området. Ved en QC-feil vil ikke systemet generere et resultat for prøven. Hvis en prøve ikke består QC-kontrollen, kan prøven kjøres på nytt forutsatt at det er tilstrekkelig plasmavolum i blodprøverøret.

VeriSeq NIPT Solution v2 genererer data for bruk i en sluttrapport. Det genererer ikke en sluttrapport for pasienten. Kunder er ansvarlige for utformingen av og innholdet i sluttrapporten som leveres til pasientens lege. Illumina er ikke ansvarlig for at ordlyden i kunders sluttrapport er korrekt.



### FORSIKTIG

Kontroller estimer for føtal fraksjon for alle prøver. Hvis estimer for føtal fraksjon er tilsvarende for alle prøver i en kjøring, kan prøvene ha blitt slått sammen og påvirket resultater. Kontakt Illumina teknisk støtte for å få hjelp med feilsøking.

## Ytelseskarakteristikk

Følgende data, som er beskrevet i avsnittene Klinisk ytelse og Analytisk ytelse, ble generert ved hjelp av protokollene og materialet som er beskrevet i avsnittet Bruksanvisning og begynner med plasma. Alle sekvenseringsdata for dette avsnittet ble generert på et NextSeq 500/550-sekvenseringssystem eller et NextSeq 550Dx-sekvenseringssystem med følgende konfigurasjoner:

	NextSeq 500/550	NextSeq 550Dx
Programvare i instrument	NextSeq Control Software 4.0	NextSeq Operating Software 1.3
Reagenssettversjon	NextSeq 500/550 High Output v2.5 Reagent Kit (75 sykluser)	NextSeq 550Dx High Output v2.5 Reagent Kit (75 sykluser)
Sekvenseringsmetode	2 x 36 paired-end-sekvenseringskjøring i høyttelsesmodus	2 x 36 paired-end-sekvenseringskjøring i høyttelsesmodus

## Klinisk studie

Den kliniske nøyaktigheten til VeriSeq NIPT Solution v2 ble påvist ved å evaluere plasmaprøver fra kvinner med singleton- eller tvillinggraviditeter. Det ble innhentet prøver fra aidentifiserte plasmaprøver fra biobank som tidligere var blitt behandlet fra perifere fullblodsprøver. Over 45 000 prøver ble vurdert for inkludering i studien. Disse prøvene hadde tidligere gjennomgått prenatal screening for føtale kromosomale aneuploidier og partielle slettinger og duplikasjoner på 7 Mb eller mer. Alle prøver fra affiserte graviditeter og et delsett av etterfølgende prøver fra ikke-affiserte graviditeter var egnet for testing dersom kliniske resultater var tilgjengelige og prøvekriteriene ble oppfylt. Det var totalt 2335 prøver i testanalysesettet. Fra dette settet var 2328 prøver fra singleton-graviditeter og sju prøver fra tvillinggraviditeter.

Av disse prøvene var det 28 (1,2 %, 28/2335) prøver som ikke besto analysekvalitetskontrollen på første forsøk under analysen av de fullførte sekvenseringsdataene:

- 27 iFACT-feil (én XO, 26 ikke-affiserte)
- Én mislyktes på grunn av data utenfor forventet område

## Demografi og graviditetskarakteristikk

Mors alder, gestasjonsalder og svangerskapstrimester er oppsummert i [Tabell 7](#) for prøvene i helgenomscreeningen, inkludert kjente mosaikkprøver. Flesteparten (98 %) av testprøvene representerer graviditet i første trimester.

Demografien ble vurdert mellom basiskohorten og helgenomkohorten og viste ingen statistisk forskjell. Demografi og graviditetskarakteristikk var like uansett om kjente mosaikker ble inkludert eller ikke.

Tabell 7 Demografi og graviditetskarakteristikker

Sammenfattende statistikk	Helgenom (inkludert kjente mosaikker)
Antall prøver	2307*
<b>Mors alder – år</b>	
Middelverdi	35,08
Standardavvik	4,04
Median	34,95
25. prosentil, 75. prosentil	32,31, 37,79
Minimum, maksimum	20,22, 53,02
<b>Gestasjonsalder ved blodprøvetaking – uker</b>	
Middelverdi	10,93
Standardavvik	1,20
Median	10,57
25. prosentil, 75. prosentil	10,29, 11,14
Minimum, maksimum	10,00, 27,86
<b>Svangerskapstrimester – n (%)</b>	
< Første (<14 uker)	2252 (98 %)
Andre	54 (2 %)
Tredje (≥ 27 uker)	1 (0 %)

\* De endelige prøvene inneholdt 7 tvillinger.

## Klinisk ytelse

Resultater fra VeriSeq NIPT Solution v2 ble sammenlignet med resultatene fra en klinisk referansestandard. Alle studieprøver hadde kliniske referanserresultater (klinisk sannhet) knyttet til føtal kromosomal aneuploidistatus og partielle slettinger og duplikasjoner på 7 Mb eller mer. Det kliniske referanserresultatet for prøver inkludert i denne studien var avhengig av resultater av kromosomanalyse eller en fysisk nyfødtundersøkelse med en NGS-basert NIPT-negativ screening. Utdannet studiepersonell klassifiserte kliniske referansedata i samsvar med det medisinske kodingsdokumentet fra sponsoren.

Metodene for kromosomanalyse inkluderte karyotyping, fluorescerende in situ-hybridisering (FISH), komparativ genomisk hybridisering (CGH) og kromosomal mikroarray (CMA). Kromosomanalyse ble utført på perifert blod eller spytt fra nyfødte eller spedbarn, prøver av graviditetsvev, amniocytter, chorionvilli, placentavev eller postnatalt navlestrengsblod.

Mosaisisme defineres som tilstedeværelsen av to eller flere cellelinjer med ulik kromosomsammensetning hos et individ. Cellelinjene stammer fra den samme zygoten. Typen og nivået på mosaisisme varierer og er avhengig av tidspunktet for mosaikkhendelser under embryogenese og føtal utvikling. Ulike typer mosaisisme vises i prenatale diagnoser avhengig av fordelingen av unormale kontra normale cellelinjer over cytotrofoblast, mesenkym eller foster.<sup>10</sup> Selv om mosaisisme kan observeres med alle typer kromosomanomalier, er forekomsten av mosaisisme i sjeldne trisomier høyere enn i trisomiene i kromosom 21, 18, and 13 (T21, T18, og T13).<sup>11</sup> Ved ytelseevalueringen ble mosaikktilfeller inkludert i en helgenomanalyse, ettersom formålet med denne screeningtypen for denne analysen er å detektere sjeldne autosomale aneuploidier (RAA-er).

## Ytelse ved basisscreening

For basisscreeningen inkluderer anomaliene T21, T18 og T13. Totalt 2243 singleton- og tvillingprøver ble inkludert i analysen. Alle sju tvillinggraviditeter ble korrekt detektert som T21 og rapporteres ikke i følgende tabell.

Tabell 8 Sensitivitet og spesifisitet for VeriSeq NIPT Solution v2 ved deteksjon av trisomi 21, 18 og 13 i en basisscreening for singleton-graviditeter (eksklusive kjente mosaikker)

	T21	T18	T13
Sensitivitet	> 99,9 % (130/130)	> 99,9 % (41/41)	> 99,9 % (26/26)
Tosidig 95 % CI	97,1 %, 100 %	91,4 %, 100 %	87,1 %, 100 %
Spesifisitet	99,90 % (1982/1984)	99,90 % (1995/1997)	99,90 % (2000/2002)
Tosidig 95 % CI	99,63 %, 99,97 %	99,64 %, 99,97 %	99,64 %, 99,97 %

Analyseytelsen i basisscreeningen som vist i [Tabell 8](#) er beregnet uten et undersett av 64 prøver berørt av RAA-er, autosomale partielle slettinger eller duplikasjoner, eller kjent mosaisisme. Disse 64 prøvene inkluderte åtte T21-mosaisismer og tre T18-mosaisismer. Fem av disse 11 prøvene ble identifisert som berørt av anomalien detektert av VeriSeq NIPT Assay Software v2.

## Ytelse ved helgenomscreening

For helgenomscreeningen inkluderer anomaliene trisomier, monosomier og partielle slettinger eller duplikasjoner på 7 Mb eller mer. Prøvene for helgenomscreeningen inneholdt 36 prøver med kjent mosaikk. Totalt 2307 singleton- og tvillingprøver ble testet. Alle sju tvillinggraviditeter ble korrekt detektert som en kromosom 21-anomali, og rapporteres ikke i følgende tabeller.

## Ytelse ved helgenomscreening for anomalier

Tabell 9 Sensitivitet og spesifisitet for VeriSeq NIPT Solution v2 ved deteksjon av anomalier i helgenomscreeningen (inkludert kjente mosaikker)

	Sensitivitet	Spesifisitet
Estimat % (n/N)	95,5 % (318/333)	99,34 % (1954/1967)
Tosidig 95 % CI	92,7 %, 97,3 %	98,87 %, 99,61 %

## Ytelse ved helgenomscreening for sjelden autosomal aneuploidi

Tabell 10 Sensitivitet og spesifisitet for VeriSeq NIPT Solution v2 ved deteksjon av sjelden autosomal aneuploidi i helgenomscreeningen (inkludert kjente mosaikker)

	Sensitivitet	Spesifisitet
Estimat % (n/N)	96,4 % (27/28)	99,80 % (2001/2005)
Tosidig 95 % CI	82,3 %, 99,4 %	99,49 %, 99,92 %

## Ytelse ved helgenomscreening for partielle slettinger og duplikasjoner

Tabell 11 Sensitivitet og spesifisitet for VeriSeq NIPT Solution v2 ved partielle slettinger og duplikasjoner på 7 Mb eller mer i helgenomscreeningen (inkludert kjente mosaikker)

	Sensitivitet	Spesifisitet
Estimat % (n/N)	74,1 % (20/27)	99,80 % (2000/2004)
Tosidig 95 % CI	55,3 %, 86,8 %	99,49 %, 99,92 %

## Forskjeller i ytelse mellom basisscreening og helgenomscreening

Scoring-metoden for vanlige trisomier og kjønnskromosomaneuploidier er den samme for basisscreening og helgenomscreening. Basisscreeningen bruker algoritmen kun på T21, T18 og T13. Helgenomscreeningen bygger imidlertid videre på denne metoden for å vurdere alle trisomier og RAA-er samt partielle duplikasjoner og slettinger.

Det er to forskjeller i beskrevet ytelsesrapportering mellom basisscreening og helgenomscreening. Den første er at for helgenomscreeningen ble prøver med kjent mosaisme både for vanlige trisomier og for RAA-er samt partielle slettinger og duplikasjoner inkludert i ytelsesmåling. Den andre er at helgenomscreeningen vil kunne rapportere deteksjonen av en partiell duplikasjon eller sletting fremfor en full trisomi. Forekomst av full trisomi i tillegg til en partiell duplikasjon eller sletting kan observeres ved å sjekke LLR-score oppgitt i tilleggsrapporten.

## Inklusjon av mosaikker i helgenomscreening

Mosaisisme er oppført som en begrensning for denne analysen. Når det forekommer mosaisisme, er det føtale signalet på en anomali redusert og kan derfor være vanskeligere å detektere uten å redusere den totale spesifisiteten til analysen. Fordi mosaisisme er mer relevant for utvidet innhold, ble imidlertid prøver med mosaisisme inkludert i helgenomscreeningen.

Av de 64 prøvene inkludert i helgenomscreeningen, men ikke inkludert i basisscreeningen ble 36 prøver identifisert å ha mosaisisme iht. den kliniske referansestandard. Av disse 36 prøvene samsvarte 23 betegnelser med den kliniske referansestandard.

## Deteksjon av partiell sletting eller duplikasjon sammenlignet med aneuploidi av hele kromosomet

VeriSeq NIPT Solution v2 har menyalternativer for både basisscreening og helgenomscreening. I basisscreeningen rapporteres resultatet ANOMALY DETECTED (ANOMALI DETEKTERT) kun når en fullstendig aneuploidi detekteres på kromosom 21, 18 eller 13, og dersom alle kvalitetskontrollmetrikkene er oppfylt. I helgenomscreeningen detekterer systemet aneuploidi på alle autosomer samt partielle slettinger og duplikasjoner på minst 7 Mb.

Ved bruk av helgenomscreeningen i tilfeller der både en helkromosomhendelse og en CNV-hendelse i samme kromosom overskrider LLR-terskelen, rapporterer systemet i første rekke en partiell slettings- eller duplikasjonshendelse, og ikke hele kromosombetegnelsen, hvis størrelsen på den partielle slettingen eller duplikasjonen dekker ca. 75 % eller mindre av kromosomet som hendelsen ble detektert på. Hvis den partielle slettings- eller duplikasjonsregionen som er detektert, er større enn 75 % av størrelsen på kromosomet, rapporteres hendelsen som en fullstendig trisomi eller monosomi av hele kromosomet hvis LLR-terskelen for hele kromosomet overskrides samtidig. Som følge av dette kan betydelig store slettinger og duplikasjoner som er mindre enn eller lik 75 % størrelsen på kromosomet, tyde på aneuploidi av hele kromosomet.

For alle prøver er LLR-scoren for klassifisering av hele kromosomer tilgjengelig i tilleggsrapporten. LLR-scoren skal gjennomgås med hensyn til den spesifiserte cutoff-grensen som angis i [95 % sannsynlighet for deteksjon for gjennomsnittlige regioner etter størrelse for VeriSeq NIPT Solution v2 på side 58](#), før tolking av resultatet. For eksempel vil en CNV-betegnelse der LLR-scorer på kromosomnivå overskrider cutoff-grensen gi ytterligere støtte for en tolking som stemmer overens med aneuploidi av hele kromosomet. [Tabell 12](#) er et eksempel.

I den kliniske studien var det to singleton-graviditetsprøver med betydelig store duplikasjoner (én på kromosom 21 og én på kromosom 18) som var mindre enn 75 % av kromosomets relative størrelse (se [Tabell 12](#)). Begge hendelsene ble rapportert som en partiell duplikasjon i stedet for en fullstendig trisomi for dette kromosomet. LLR-scorene for disse hendelsene var over cutoff-grensen, noe som stemmer overens med resultatet fullstendig trisomi. Som oppfølging ved en positiv NIPT-betegnelse, enten en partiell duplikasjon eller en fullstendig trisomi, skal pasienten tilbys bekreftelsestest gjennom prenatal diagnose.

Tabell 12 Eksempler på store duplikasjonshendelser identifisert i helgenomscreeningen

	Klinisk sannhet	Systemresultat, helgenom	Størrelse på anomali (Mb)	% av kromosom	LLR-scorer
Prøve 1	Trisomi 21, singleton	Partiell duplikasjon på 21	22,50	48,9	19,43
Prøve 2	Trisomi 18, singleton	Partiell duplikasjon på 18	47,00	60,2	12,99

Se programvareveiledningen for VeriSeq NIPT Solution v2 (dokumentnr. 1000000067940) for mer informasjon om kvalitetskontrollmetriker som brukes til å rapportere aneuploidi-resultater.

## Kjønnskromosomer

Kjønnskromosomresultatene fra VeriSeq NIPT Solution v2 ble sammenlignet med det kliniske referanser resultatet og er oppsummert i følgende tabell. Konkordansen ble beregnet for hvert kjønnskromosom innenfor hvert klinisk referanser resultat. Konkordansen ble beregnet ved at antallet prøver der kjønnskromosombetegnelsen i VeriSeq NIPT Solution v2 matchet den kliniske referanseklassifiseringen, ble dividert med det totale antallet prøver med samme kliniske referanseklassifisering.

Tabell 13 Konkordans for føtal kjønnklassifisering\*

Føtal kjønnklassifisering		Fenotype fra fysisk nyfødttundersøkelse		Cytogenetiske resultater								
		Kvinnelig	Mannlig	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY	Annet**	Mangler	
Detektert	Karyotype											
Anomali ikke detektert	XX	997	0	21	0	2	0	0	0	0	0	0
Anomali ikke detektert	XY	0	966	0	15	0	0	0	0	0	0	1
Anomali detektert	XO	0	0	0	0	19	0	0	1	0	0	0
Anomali detektert	XXX	0	0	0	0	0	17	0	0	1	0	0
Anomali detektert	XXY	0	0	0	0	0	0	23	0	1	0	0



Føtal kjønnsklassifisering		Fenotype fra fysisk nyfødtundersøkelse		Cytogenetiske resultater							
Detektert	Karyotype	Kvinnelig	Mannlig	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY	Annet**	Mangler
Anomali detektert	XYY	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0
Totalt		997	966	21	15	21	17	23	12	2	1
Konkordans (%)		100	100	100	100	90,5	100	100	91,7	Ikke relevant	Ikke relevant

\* Fem tvillinggraviditeter ble korrekt klassifisert som tilstedeværelse av Y. To graviditeter ble korrekt klassifisert som ingen tilstedeværelse av Y.

\*\* Andre cytogenetiske resultater var XXXXX og XXYY.

## Positiv prediktiv verdi og negativ prediktiv verdi for VeriSeq NIPT Solution v2

Testens positive prediktive verdi (PPV) og negative prediktive verdi (NPV) indikerer om testen kan brukes til kliniske beslutninger om hvorvidt et foster er affisert av trisomi (prevalens) eller ikke, basert på testens sensitivitet, spesifisitet og pretest-sannsynlighet. Fordi PPV og NPV avhenger av prevalens og prevalensen for disse aneuploidiene kan variere mellom ulike populasjoner, ble PPV og NPV beregnet for en rekke plausible prevalensverdier basert på sensitivitets- og spesifisitetsverdiene observert i basisscreeningen (uten kjente mosaikker) i den kliniske nøyaktighetsstudien. [Tabell 17](#) er basert på helgenomscreeningen (med kjente mosaikker).

Tabell 14 Trisomi 21-prevalens, PPV og NPV i basisscreening (eksklusive kjente mosaikker)

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

Tabell 15 Trisomi 18-prevalens, PPV og NPV i basisscreening (eksklusive kjente mosaikker)

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

Tabell 16 Trisomi 13-prevalens, PPV og NPV i basisscreening (eksklusive kjente mosaikker)

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

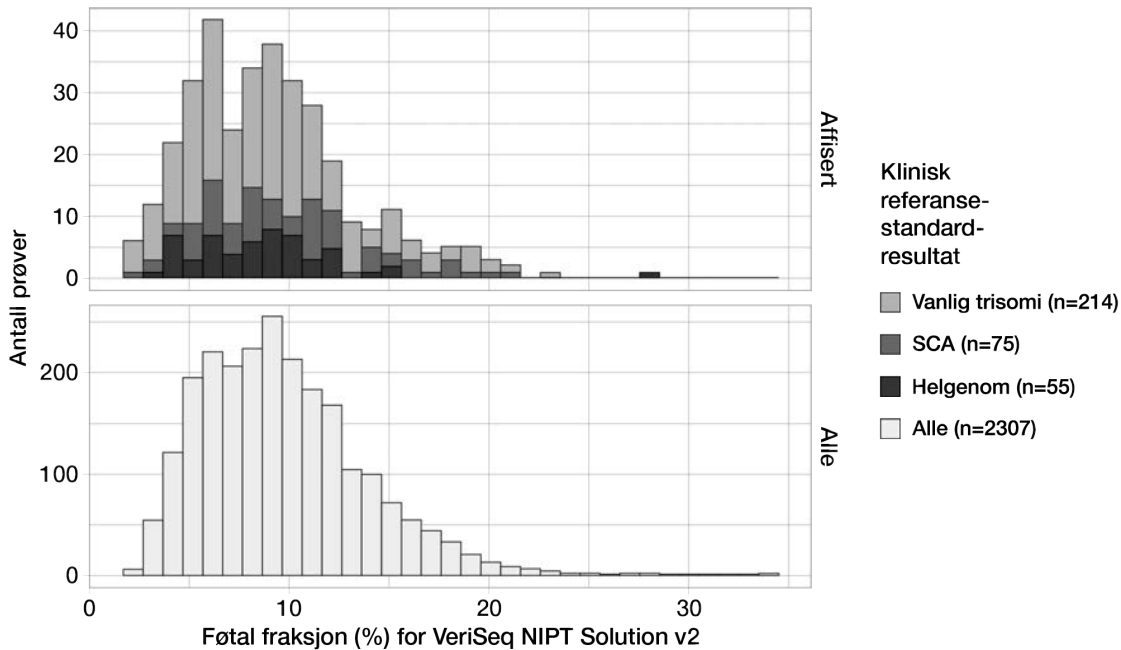
Tabell 17 Prevalens for alle anomalier, PPV og NPV i helgenomscreening (inklusive kjente mosaikker)

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

## Fordeling av føtal fraksjon

Fordelingen av estimater for føtal fraksjon (FF) for VeriSeq NIPT Solution v2 fra helgenomscreeningen med mosaikker vises per klinisk referanseresultat i [Figur 1](#).

Figur 1 Fordeling av føtal fraksjon



5 prøver hadde anomalier i flere kategorier.

Vanlig trisomi omfatter prøver med trisomi 21, 18 og/eller 13.

Helgenom omfatter prøver med RAA eller partielle slettinger og/eller duplikasjoner.

FF-estimatene varierte fra 2 % til 34 % totalt med en median på 9 % og et interkvartil (IQ) område på 6 % til 12 %. Det mediane FF-estimatet for vanlige trisomier og hendelser detektert av helgenomscreeningen er 8 %, og 9 % for SCA-er. Området for FF-estimer var konsistent for alle resultatene. Det er ingen synlig forskyvning i fordelingen av FF blant vanlige trisomier, SCA-er, hendelser detektert av helgenomscreeningen eller alle prøver i helgenomanalysen.

## Ytelse ved tvillinggraviditeter

### Estimering av ytelse for trisomi 13, 18 og 21 samt kromosom Y ved tvillinggraviditeter

På grunn av den lave prevalensen av trisomi 21, 18 og 13 ved tvillinggraviditeter, var bare et lite antall affiserte tvillingprøver tilgjengelige for den kliniske studien. For å estimere ytelsen til VeriSeq NIPT Solution v2 ved tvillinggraviditeter ble det brukt *in silico*-modeller basert på observasjoner fra kliniske prøver for å simulere populasjoner av tvillinggraviditeter. Denne simuleringen var i overensstemmelse med populasjonen for tiltenkt bruk. Fordelingen av føtal fraksjon ble bestemt fra ca. 4500 tvillingprøver og sammenlignet med fordelingen av ca. 120 000 singleton-prøver. Fordelingen av føtal fraksjon avhengig av aneuploidistatus ble bestemt fra putative singleton-betegnelser (1044 trisomi 21, 307 trisomi 18 og 192 trisomi 13). Kombinasjonen av de to fordelingene åpnet for interferenser knyttet til deteksjon av aneuploidi hos tvillinger. Sett med toeggede

(dizygote) og eneggede (monozygote) tvillinger ble simulert, og et vektet gjennomsnitt som representerte deres prevalens i populasjonen for tiltenkt bruk ble beregnet (2 toeggede: 1 enegget) for å estimere sensitiviteten. For å estimere spesifisiteten ble sett med ikke-affiserte tvillinger simulert.

Fraksjonen av hver simulert prøve affisert av trisomi (dvs. den affiserte fraksjonen) ble beregnet forskjellig for hver prøvekategori:

- For monozygote tvillinger ble den affiserte fraksjonen for hver prøve satt til 1,0, ettersom trisomi i dette tilfellet affiserer begge tvillingene.
- For dizygote tvillinger ble det antatt at bare én tvilling var affisert (det er ekstremt sjeldent at begge de dizygote tvillingene rammes). Verdiene for affisert fraksjon ble simulert ved hjelp av den kjente fordelingen av føtal fraksjon-ratioer som ble bestemt fra kliniske tvillingprøver med ulike kjønn. En konservativ tilnærming ble valgt, der det ble antatt at den affiserte tvillingen alltid hadde den laveste føtale fraksjonen av de to tvillingene. En korreksjonsfaktor ble brukt ettersom føtale fraksjoner i gjennomsnitt er lavere ved graviditeter med trisomi 13 og 18.
- For uaffiserte tvillinger ble den affiserte fraksjonen for hver prøve satt til null.

For tvillinger affisert av enten trisomi 18 eller 13 ble den føtale fraksjonen som svarte til den affiserte fraksjonen av prøven, redusert. Reduksjonen var proporsjonal med den gjennomsnittlige reduksjonen i føtal fraksjon observert i kliniske data for singleton-graviditeter med trisomi 18 eller 13 sammenlignet med euploide singleton-graviditeter.

Deretter ble både den totale føtale fraksjonen og den affiserte fraksjonen av hver simulert prøve brukt til å beregne en aneuploidiscore ved hjelp av standardalgoritmen i VeriSeq NIPT Solution v2. Sensiviteten ble beregnet ved å bestemme hvor ofte aneuploidiscorene for de simulerte affiserte tvillingene var over den tilsvarende cutoff-grensen for aneuploidi. På tilsvarende vis ble spesifisitet beregnet ved å bestemme hvor ofte aneuploidiscorene for de simulerte uberørte tvillingene lå under den tilsvarende aneuploidi-cuttoffen ([Tabell 18](#)). 95 % konfidensintervaller ble estimert basert på antall faktiske kliniske tvillingprøver i det opprinnelige datasettet, som ble klassifisert som enten berørt eller ikke-berørt av den relevante trisomien.

For å estimere sensitiviteten for kromosom Y i tvillingprøver ble sett med XY/XY- og XX/XY-tvillinger simulert. Et vektet gjennomsnitt som representerte deres prevalens i populasjonen for tiltenkt bruk, ble beregnet (1 XY/XY: 1 XX/XY). For å estimere spesifisiteten for kromosom Y hos tvillinger ble et sett med XX/XX-tvillinger simulert. De totale verdiene for føtal fraksjon ble simulert i samsvar med den kjente fordelingen av føtal fraksjon for kliniske tvillingprøver.

For XY/XY- og XX/XY-tvillinger ble tilsvarende kromosom Y-scorer estimert ved hjelp av det kjente forholdet mellom føtal fraksjon og kromosom Y-scorer hos kliniske singleton-prøver klassifisert som mannlige. For kun XX/XY-tvillinger ble verdier for affisert (dvs. mannlig) føtal fraksjon simulert ved hjelp av den kjente fordelingen av føtal fraksjon-ratioer observert mellom tvillinger fra samme graviditet, som bestemt fra kliniske tvillingprøver med ulike kjønn. En konservativ tilnærming ble valgt, der den affiserte fraksjonen ble valgt på en slik måte at den svarte til den minste av de to tvillingene. For hver simulert XX/XY-prøve ble kromosom Y-scoren multiplisert med den affiserte fraksjonen.

For XX/XX-tvillinger ble kromosom Y-scorer valgt ut fra de scorene som ble observert hos kliniske singleton-prøver klassifisert som kvinnelige. Deretter ble kromosom Y-scoren og den totale føtale fraksjonen brukt til å klassifisere hver simulert prøve som enten kromosom Y til stede eller kromosom Y ikke til stede ved hjelp av standardalgoritmen i VeriSeq NIPT Solution v2.

Sensitiviteten ble beregnet ved å bestemme hvor ofte de simulerte XY/XY- eller XX/XY-tvillingene ble riktig klassifisert som kromosom Y til stede. Spesifisitet ble beregnet ved å bestemme hvor ofte de simulerte XX/XX-tvillingene ble korrekt klassifisert med fraværende kromosom Y. 95 % konfidensintervaller ble estimert basert på antall faktiske kliniske tvillingprøver i det opprinnelige datasettet, som ble klassifisert som enten kromosom Y til stede eller kromosom Y ikke til stede.

Tabell 18 Estimerer for trisomi 21, 18 og 13 i simulert populasjon av tvillinggraviditeter

	Trisomi 21	Trisomi 18	Trisomi 13	Tilstedeværelse av Y
Sensitivitet	96,4 %	95,7 %	93,6 %	> 99,9 %
Tosidig 95 % CI	(86,4 %, 98,9 %)	(68,3 %, 99,4 %)	(64,1 %, 98,9 %)	(99,9 %, > 99,9 %)
Spesifisitet	99,9 %	> 99,9 %	> 99,9 %	> 99,9 %
Tosidig 95 % CI	(99,8 %, > 99,9 %)	(99,9 %, > 99,9 %)	(99,9 %, > 99,9 %)	(99,7 %, > 99,9 %)

Tabell 18 gir punkttestimater og estimerte 95 % konfidensintervaller for sensitiviteten og spesifisiteten hos VeriSeq NIPT Solution v2 til å detektere trisomi 21, 18, 13 og tilstedeværelsen av Y i en simulert populasjon av tvillinggraviditeter som er i overensstemmelse med populasjonen for tiltenkt bruk. Konfidensintervaller ble estimert basert på antallet QC-godkjente kliniske tvillingprøver klassifisert som enten affisert eller ikke-affisert av relevant trisomi. Sensitivitetsberegningen forutsetter at to tredjedeler av affiserte tvillinggraviditeter er dizygote med én affisert tvilling, mens en tredjedel av affiserte tvillinggraviditeter er monozygote med begge tvillingene affisert.

Estimatene oppført i Tabell 18 gjelder kun tvillinggraviditeter. På grunn av enda lavere prevalens var datagrunnlaget for graviditeter med flere fostre (trillinger eller flere) ikke tilstrekkelig til å etablere egnede statistiske modeller for å estimere nøyaktigheten av deteksjon av aneuploidi.

## Analytisk ytelse

### Presisjon

For å vurdere og kvantifisere analysepresisjon ble det utført en ny analyse av data ved hjelp av analyserør-programvaren VeriSeq NIPT Solution v2 fra to tidligere studier av VeriSeq NIPT Solution:

- Reproduserbarhetsstudie på flere laboratorier som omfattet tre kjøringar av tre operatører på tre ulike laboratorier, der samme reagenslot ble brukt til totalt ni kjøringar.
- Presisjonsstudie innenfor ett laboratorium som omfattet 12 kjøringar på ett og samme laboratorium ved hjelp av to ML STAR-enheter, to sekvenseringsinstrumentsystemer og tre sekvenseringsreagensloter.

Formålet med presisjonsstudien var å kvantifisere analysens presisjon med hensyn til trisomi 21 (T21) og kromosom Y, og å estimere variabiliteten mellom ulike instrumenter, bibliotekklargjøringssett og sekvenseringsreagensloter.

En T21-sammenslåing med 5 % føtal fraksjon ble opprettet ved å kombinere cfDNA ekstrahert fra maternelt plasma fra gravide kvinner (med ett T21-affisert foster) og cfDNA ekstrahert fra plasma fra ikke-gravide kvinner. Det ble også opprettet en cfDNA-sammenslåing fra kvinner med mannlig foster (XY) med 10 % føtal fraksjon. Prøvepanelet for hver kjøring i hver studie inkluderte 4 replikater av den T21-affiserte prøvesammenslåingen med 5 % føtal fraksjon og 20 replikater av cfDNA-sammenslåingen fra kvinner med mannlig foster med 10 % føtal fraksjon. Testen ble utført over 10 dager og omfattet totalt 21 kjøring for de to studiene til sammen.

T21 og tilstedeværelsen av kromosom Y ble valgt for evaluering basert på representativiteten av kliniske tilstander og kompleksiteten av anomalideteksjon. Som det minste autosomet hos mennesker har størrelsen på kromosom 21 en direkte innvirkning på T21-deteksjonens sensitivitet, særlig ved de lave verdiene for føtal fraksjon som ble brukt i denne studien. Kromosom Y, når det er til stede i maternelt plasma, er utelukkende av føtal opprinnelse og er derfor lettere for analysen å detektere.

Observerte middelerdi og standardavvik for LLR-scoren for kromosom 21 og normaliserte kromosomverdier (NCV) for kromosom Y viste at standardavvik (SD) for replikater var den største kilden til variabilitet. Variasjon mellom laboratorier, instrumenter og reagensloter tilførte ubetydelig variabilitet, noe som fremgår av forskjellen mellom totalt SD og replikat-SD i [Tabell 19](#) og [Tabell 20](#).

Tabell 19 Sammendrag av standardavvik (SD) for sekvenserings svar på flere laboratorier (reproduserbarhet)

Svar	N	Middelerdi	Replikat-SD	Totalt SD, reproduserbarhet*
LLR-score for kromosom 21	36	34,43	11,36	11,36
NCV for kromosom Y	180	190,56	7,96	10,20

\* Totalverdien inkluderer variabilitet på grunn av laboratorium, operatør, kjøring, dag og replikat.

Tabell 20 Sammendrag av svarpresisjon ved sekvensering innenfor ett laboratorium

Svar	N	Middelerdi	Replikat-SD	Totalt SD innenfor laboratorium*
LLR-score for kromosom 21	48	36,01	9,07	10,25
NCV for kromosom Y	240	198,68	7,63	7,82

\* Totalverdien inkluderer variabilitet på grunn av sekvenseringsinstrument, reagenslot, operatør, kjøring, dag og replikat.

En tilleggsstudie ble utført for å sammenligne VeriSeq NIPT Solution v2 sekvenseringspresisjon (totalt standardavvik) ved hjelp av versjon 2.0 av en strømningscelle sammenlignet med versjon 2.5 av en strømningscelle. Studien inkluderte to typer strømningsceller (v2.0 og v2.5), tre sekvenseringssettpartier, fire instrumentsystemer og to sekvenseringsanalyser per kombinasjon for totalt 48 kjøring på ett laboratorium. En sekvenserings sammenslåing ble klargjort fra cfDNA-plater som var klargjort manuelt. Prøvepanelet inkluderte 4 replikater av den T21-affiserte prøvesammenslåingen med 5 % føtal fraksjon og 20 replikater av cfDNA-

sammenslåingen fra kvinner med mannlig foster med 10 % føtal fraksjon. Resultatene fra studien presenteres i [Tabell 21](#) og viser at det ikke er noen forskjell i sekvenseringspresisjon ved bruk av strømningsselle v2.0 sammenlignet med strømningsselle v2.5.

Tabell 21 Sammendrag av svarpresisjon ved sekvensering med strømningsselle v2.0 sammenlignet med strømningsselle v2.5

Svar	Antall observasjoner per versjon	Totalt SD, v2.0*	Totalt SD, v2.5*	Statistisk resultat**
LLR-score for kromosom 21	96	9,56	8,44	Statistisk ekvivalent (p-verdi=0,25)
NCV for kromosom Y	480	7,74	7,38	Statistisk ekvivalent (p-verdi=0,38)

\* Totalverdien inkluderer variabilitet på grunn av sekvenseringsinstrument, reagenslot, kjøring, dag og replikat

\*\* Basert på F-test for varianslikhet (standardavvik i kvadrat)

## Krysskontaminasjon

Krysskontaminasjon ble vurdert for arbeidsflyten for prøveklargjøring i VeriSeq NIPT Solution. Plasmasammenslåinger fra ikke-gravide kvinner (XX) og voksne menn (XY) ble testet i et sjakkbrettmønster i 96-brønners formatet fordelt på fire plater. N = 48 hver for kvinnelige og mannlige prøver per plate, dvs. totalt 192 kvinnelige og 192 mannlige prøver. Ingen av de kvinnelige prøvene viste kromosom Y-dekning som var statistisk høyere enn den estimerte bakgrunnen, noe som indikerte at det var ingen krysskontaminasjon fra mannlige prøver innenfor samme plate. Ingen detekterbar krysskontaminasjon ble observert i VeriSeq NIPT Solution.

## Potensielt forstyrrende stoffer

Virkingen av potensielt forstyrrende stoffer ble vurdert i VeriSeq NIPT Solution ved å evaluere analysens ytelse ved tilstedeværelse av slike stoffer.

Albumin, bilirubin, hemoglobin og triglyserider (endogene) ble tilsatt i maternelle plasmasammenslåinger fra gravide kvinner med ikke-affisert kvinnelig foster (XX). De ble testet ved to konsentrasjoner for hvert teststoff (n=16 for hver). Ingen påvirkning av analysens ytelse ble observert.

Tabell 22 Potensielt forstyrrende stoffer (endogene)

Teststoff	Lav testkonsentrasjon (mg/mL)	Høy testkonsentrasjon (mg/mL)
Albumin	35	50
Bilirubin	0,01	0,15
Hemoglobin	100	200
Triglyserid	1,5	5

Også naturlig forekommende maternelt genomisk DNA (gDNA) i plasmaet kan potensielt påvirke analyseytelsen, ettersom det kan ekstraheres sammen med føtalt cfDNA. Genomiske DNA-nivåer på 1,6, 3,3 og 4,9 ng per prøve (som svarer til 1, 2 og 3 standardavvik over gjennomsnittlig forventet gDNA-konsentrasjon etter 7 dagers lagring av fullblod<sup>12</sup>) ble tilsatt i cfDNA ekstrahert fra maternelt plasma fra gravide kvinner med ikke-affisert kvinnelig foster (XX). Prøvene ble deretter testet i VeriSeq NIPT Solution (n=16 for hver konsentrasjon). Ingen påvirkning av analysens ytelse ble observert ved tilstedeværelse av forhøyede nivåer av gDNA.

Tjue legemiddelbaserte potensielt forstyrrende stoffer (eksogene) som vanligvis brukes eller foreskrives under graviditet, ble testet i henhold til EP7-A2 (Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline-Second Edition (Interferenstesting i klinisk kjemi, godkjent retningslinje – andre utgave)). De 20 potensielt forstyrrende stoffene ble kombinert i fire blandinger, tilsatt i maternelt plasma fra gravide kvinner med ikke-affisert kvinnelig foster (XX) og testet i VeriSeq NIPT Solution (N=16 for hver blanding). Ingen påvirkning av analysens ytelse ble observert ved tilstedeværelse av disse eksogene stoffene.

Tabell 23 Potensielt forstyrrende stoffer (eksogene)

Sammenslåing 1	Sammenslåing 2	Sammenslåing 3	Sammenslåing 4
Paracetamol	Difenhydramin	Salbutamol	Cetirizin
Acetylcystein	Erytromycin	Bupropion	Dekstrometorfan
Bisoprolol	Guaifenesin	Koffein	L-askorbinsyre
Citalopram	Heparin	Sertralin	Metoprolol
Desloratadin	Lidokain	Natriumfluorid	Nadolol

## Deteksjonsgrense

Deteksjonsgrensen (LOD) defineres som det nivået av føtal fraksjon som svarer til en sannsynlighet på 95 % for å detektere en tilstand av interesse, f.eks. T21. For å vurdere LOD for VeriSeq NIPT Solution v2 for en rekke vanlige tilstander, er det utført studier og statistiske analyser.

Sannsynligheten for deteksjon av en tilstand av interesse i en affisert prøve som behandles av VeriSeq NIPT Solution v2, avhenger primært av tre faktorer:

- føtal fraksjon
- sekvenseringsdybde
- størrelse og kompleksitet til den genomiske regionen av interesse

Under forutsetning av at sekvenseringsdybden er konstant, er det lettere å detektere en gitt aberrasjon i en prøve med høyere prosentandel av føtal fraksjon enn i en prøve med lavere prosentandel av føtal fraksjon. Omvendt er det, under forutsetning av at den føtale fraksjonen er konstant, lettere å detektere en gitt aberrasjon i en prøve med høyere sekvenseringsdybde enn i en prøve med lavere sekvenseringsdybde. Avslutningsvis er det vanskeligere å detektere aberrasjoner i mindre eller mer komplekse genomiske regioner enn aberrasjoner i større eller mindre komplekse genomiske regioner, under forutsetning av at den føtale fraksjonen og sekvenseringsdybden er konstant.



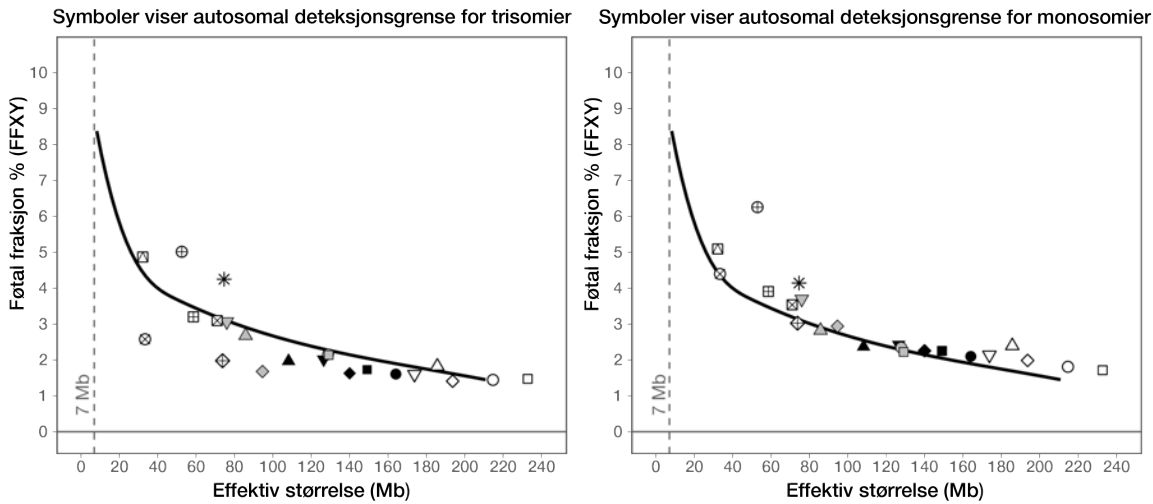
For å bestemme LOD for T21 ble det analysert prøver som inneholdt sammenslåinger av sammenslåtte T21-prøver og sammenslåtte ikke-affiserte prøver. De to analyttypene ble blandet i en titreringsserie for å opprette et sett med sju nivåer av føtal fraksjon (0, 2, 3, 4, 5, 6 og 10 %). Hvert nivå var representert med totalt 10 replikater.

For ytterligere å øke oppløsningen til rutenettet for føtal fraksjon for LOD-analysen, ble dataene fra denne studien utvidet med data innhentet fra en in silico-fortynning. Effektene av eksperimentell fortynning og titrering ble simulert ved hjelp av en kontrollert blanding av sekvenseringsdata. Dataene fra denne in silico-titreringen dekket et sett med 14 nivåer av føtal fraksjon (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 og 4,50 %), med 32 replikater for hvert nivå. En probit-analyse ble utført på de resulterende dataene for å bestemme LOD for T21.

Uavhengig av dette ble det utviklet en statistisk modell som bruker føtal fraksjon, sekvenseringsdybde og genomisk størrelse/kompleksitet for å predikere sannsynligheten for deteksjon av enhver aberrasjon i enhver prøve. Denne modellen ble etablert fra dataene som svarer til et sett med 1405 XY-prøver. LOD for T21, som predikert av denne modellen, ble bestemt til å være konkordant med det probit-baserte estimatet beskrevet ovenfor. Denne statistiske modellen ble brukt til å estimere LOD-verdier for aneuploidier på alle autosomer og for partielle slettinger og duplikasjoner.

[Figur 2](#) viser 95 % sannsynlighet for deteksjon for gjennomsnittlige regioner etter størrelse og autosomale deteksjonsgrenser for alle trisomier og alle monosomier.

Figur 2 95 % sannsynlighet for deteksjon for gjennomsnittlige regioner etter størrelse for VeriSeq NIPT Solution v2



Krom.	Symbol	Trisomi		Monosomi	
		Cutoff for LLR	LoD (%)	Cutoff for LLR	LoD (%)
1	○	7	1,44	13,2	1,80
2	□	9	1,47	13,6	1,71
3	◇	5	1,41	13,8	1,99
4	△	7	1,82	15,2	2,39
5	▽	7,6	1,60	17	2,14
6	●	7,3	1,60	15,4	2,09
7	■	6,6	1,73	14	2,25
8	◆	5,8	1,63	14,8	2,25
9	▲	8	1,97	13,6	2,37
10	▼	8,8	2,01	14,7	2,42
11	●	12,2	2,14	15,7	2,35

Krom.	Symbol	Trisomi		Monosomi	
		Cutoff for LLR	LoD (%)	Cutoff for LLR	LoD (%)
12	■	11,6	2,14	12,8	2,22
13	◇	3	1,68	16,5	2,94
14	△	12,7	2,68	14,7	2,82
15	▽	9,8	3,07	16,4	3,69
16	⊠	10,7	3,10	15,3	3,54
17	*	16,8	4,25	15,7	4,14
18	⊕	3	1,98	11,3	3,02
19	⊕	15,5	5,01	27,5	6,26
20	⊠	10,6	3,20	18,2	3,91
21	⊗	2,5	2,58	13,2	4,40
22	⊠	13,5	4,87	15,3	5,09

# Feilsøking

## Feilsøking av VeriSeq NIPT Solution v2

Feil	Mulig resultat	Tolking	Anbefalt handling	Kommentarer
Utilstrekkelig plasma	QC-feil for prøve	Plasmavolumet er for lite.	Ta en ny prøve.	Basert på visuell inspeksjon av volumet.
Feil ved blodprøverør	Blodet er ikke separert i lag	Prøven ble ikke sentrifugert.	Kontroller at sentrifugen startet og at røret ble sentrifugert med riktig kraft. Ta en ny prøve.	
		Feil oppbevaring eller transport av prøven (hemolyse av prøven).	Ta en ny prøve.	Frosne prøver separeres ikke. Feil transport- eller oppbevaringsforhold kan føre til hemolyse av prøver.

Feil	Mulig resultat	Tolking	Anbefalt handling	Kommentarer
Prøve koagulert eller langsom flyt	Kontaminert plasma	Individuelle prøver kan tette igjen bindingsplaten hvis plasmaprøven er svært kontaminert.	Inspiser prøven. Hvis plasmaet i røret er rødt eller melkeaktig, avbryt prøven og be om at det tas en ny blodprøve. Hvis prøven ser normal ut, test prøven på nytt.	
	Overflyt av prøve	Utilstrekkelig visuell inspeksjon av hvert rør for prøvens egnethet.	Ugyldiggjør eventuelle prøver i nærliggende brønner som er påvirket av overflyten.	Kan tyde på at prøver ble transportert eller oppbevart på feil måte før prosessering. Uegnede prøver skal utelukkes fra prosessering.
	Maskinvarefeil	Utilstrekkelig nedbrytning av materiale under ekstraksjon.	Test prøven på nytt. Hvis problemet vedvarer i brønnposisjonen med andre prøver, kontakt Illumina teknisk støtte.	

Feil	Mulig resultat	Tolking	Anbefalt handling	Kommentarer
QC-feil ved analyse av en enkelt prøve	QC-feil ved sekvensering	<p>Dette er mulige årsaker:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Utilstrekkelig genmateriale</li> <li>• Overføringsfeil under prøvebehandling</li> <li>• Feil på sekvenseringsreagens</li> </ul>	<p>Kontroller prøvekommentarene.</p> <p>Kontroller om det finnes lignende resultat for tidligere prøver i samme plateposisjon.</p> <p>Test prøven på nytt.</p>	<p>Antyder enten utilstrekkelig prøvemateriale eller en feiloverføring på ML STAR. Utilstrekkelig genmateriale kan skyldes utilstrekkelig cellefritt DNA i plasmaet eller cellebasert DNA som fører til overfortynning av prøven for sekvensering.</p>
	Lav FF eller antall ikke-utelatte steder (NES)	Utilstrekkelige data generert for nøyaktig rapport.	Test på nytt fra plasma.	

Feil	Mulig resultat	Tolking	Anbefalt handling	Kommentarer
QC-feil ved kvantifisering	Mislykket kvantifiseringskjøring. Middelerverdi for parti under minimum	Utilstrekkelig prosessproduksjon.	Gjenta kvantifiseringen. Hvis gjentakelsen mislykkes, kontakt Illumina teknisk støtte.	At standardkurvens mål ikke oppnås, antyder enten at det er problemer knyttet til bibliotekklargjøring (dvs. bruk av etanol som ikke er av biologisk kvalitet) eller problemer med kvantifiseringsprosessen.
	Mislykket kvantifiseringskjøring	Feil ved standardkurve.	Gjenta kvantifiseringen. Hvis gjentakelsen mislykkes, kontakt Illumina teknisk støtte.	
Feil ved sammenslåing	Kunne ikke fullføre prøvesammenslåing	Sammenslåingsanalysen er ikke i stand til å beregne riktige blandingsvolumer.	Evaluer målblandingskonsentrasjonen på nytt. Kjør sammenslåingsanalysen på nytt.	

## Feilsøking for VeriSeq NIPT Microlab STAR

Prosesstrinn	Feilkode	Feilmelding	Beskrivelse	Anbefalt løsning
Opprettelse av parti	EM0044	The Batch ID entered contains forbidden characters. (Angitt parti-ID inneholder forbudte tegn.)	VeriSeq NIPT Solution v2 aksepterer kun tall, bokstaver, understrek og bindestrek i alle datafelt.	Gi partiet et nytt navn som ikke inneholder spesialtegn.

Prosesstrinn	Feilkode	Feilmelding	Beskrivelse	Anbefalt løsning
Opprettelse av parti	EM0051	Parti-ID-en har mer enn 36 tegn.	VeriSeq NIPT Solution v2 begrenser lengden på partinavn til maks. 36 tegn.	Gi partiet et nytt navn som har maks. 36 tegn.
Opprettelse av parti	EM0076	Unable to connect to VeriSeq Onsite Server v2. (Kan ikke koble til VeriSeq Onsite Server v2.)	VeriSeq Onsite Server v2 svarer ikke på dataforespørsler fra Workflow Manager.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Sørg for at ML STAR er koblet til nettverket.</li> <li>2. Sørg for at VeriSeq Onsite Server v2 er på.</li> <li>3. Kontroller at ML STAR kan koble til VeriSeq Onsite Server v2 (via ping-forespørsel).</li> <li>4. Kontroller vakuumavfallsflasken. Tøm avfallsflasken hvis den er mer enn halvfull.</li> <li>5. Hvis de forrige trinnene ikke løser problemet, kontakt Illumina teknisk støtte.</li> </ol>
Opprettelse av parti	EM0118	This batch has been failed and cannot be further processed. (Dette partiet har mislykkes og kan ikke behandles videre.)	Det angitte partiet har allerede mislykkes og kan ikke behandles mer.	Partioppføringen på VeriSeq Onsite Server v2 angir at det valgte partiet har mislykkes. Ingen ytterligere behandling er tillatt. Opprett et nytt parti med de nødvendige prøvene.
Opprettelse av parti	Ikke relevant	This batch has already completed processing. (Dette partiet er allerede ferdigbehandlet.) Vil du slå sammen på nytt?	Det angitte partiet er behandlet gjennom sammenslåing. Det eneste tillatte behandlingsalternativet er ny sammenslåing.	Slå sammen på nytt på følgende måte: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Velg <b>Re-Pool</b> (Slå sammen på nytt).</li> <li>• Avbryt metoden, og kontroller at partinavnet er riktig før ny sammenslåing.</li> </ul>

Prosesstrinn	Feilkode	Feilmelding	Beskrivelse	Anbefalt løsning
Plasmaisolering	WP0087	Duplicate sample barcodes loaded. (Doble prøvestrekkoder lastet inn.)	Prøver med identiske strekkoder er lastet inn i systemet.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Følg anvisningene i Workflow Manager for å identifisere hvilke prøver som er dubletter.</li> <li>2. Fjern duplikatene, og merk dem på nytt eller erstatt dem.</li> <li>3. Last inn prøvene på nytt.</li> </ol>
Plasmaisolering	EP0102	Samples specified in the Sample Sheet were not loaded. (Prøver angitt i prøvearket ble ikke lastet inn.)	Prøver som var inkludert i prøvearket var ikke blant de innlastede strekkodene.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Følg anvisningene i Workflow Manager for å identifisere hvilke prøver som mangler.</li> <li>2. Utfør ett av følgende alternativer: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Legg til de manglende prøvene i partiet, og last inn prøvene på nytt.</li> <li>• Avbryt metoden, og endre prøvearket etter behov. Start metoden på nytt.</li> </ul> </li> </ol>
Plateinnlasting	Ikke relevant	Venus Barcode Mask Error (Feil med Venus-strekkodemasker.)	Workflow Manager håndhever korrekt plate-til-parti-tilordning ved hjelp av Venus-strekkodemasker.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Kontroller platens posisjon for å bekrefte at plateoppsettet er riktig.</li> <li>2. Kontroller at platen som er lastet inn er riktig plate for det angitte partiet.</li> </ol>



Prosesstrinn	Feilkode	Feilmelding	Beskrivelse	Anbefalt løsning
cfDNA-ekstraksjon	WE0150	Pressure in the vacuum chamber is too low. (Trykket i vakuumkanmeret er for lavt.)	Workflow Manager fortsetter ikke behandling hvis vakuumslangens hviletrykk er < 400 Torr.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Kontroller om vakuumslangen er bøyd eller om det finnes andre hindringer.</li> <li>2. Løsne klemmene på avfallsslangen for å frigjøre trykk, og lukk deretter klemmene igjen.</li> <li>3. Kontroller at vakuumkanmeret og -pumpen er slått på.</li> <li>4. Kontakt Illumina teknisk støtte hvis problemet vedvarer.</li> </ol>
cfDNA-ekstraksjon	WE0153	Pressure in the vacuum chamber is too high. (Trykket i vakuumkanmeret er for høyt.)	Hvis det målte vakuumkanmeret er for høyt før trykkkanmeret starter, kan det være en feil i systemet.	Kontroller at alle vakuumkanmerer og -slanger er ordentlig festet bak på kanmeret.

Prosesstrinn	Feilkode	Feilmelding	Beskrivelse	Anbefalt løsning
cfDNA-ekstraksjon	WE0996	Vacuum failed to seal. (Vakuum kunne ikke forsegle.)	Forseglingsproblemet må løses før det er mulig å fortsette.	<p>Verifiser at forseglingsproblemet er løst før <b>OK</b> velges.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Sørg for at bindingsplaten er i flukt med vakuummanifolden. Ta på en hanske og trykk bindingsplaten hardt ned.</li> <li>Lytt etter vakuumbrommingen, og observer vannstrømmen gjennom bindingsplaten.</li> <li>Åpne sporingsvisningen i Workflow Manager. Etter at den faktiske trykkavlesningen når minst 50 trykkenheter mindre enn omgivelsesavlesningen, velger du <b>OK</b> for å fortsette med cfDNA-ekstraksjon.</li> <li>Hvis den nødvendige trykkavlesningen ikke nås i løpet av den tildelte tiden, velg <b>OK</b> for å fortsette med den første lysatbelastningen.</li> <li>Sett metoden på pause etter at lysatet er dispensert på bindingsplaten. Sett på plass og trykk bindingsplaten hardt ned.</li> <li>Hvis lysatet ikke strømmer gjennom platen, kontakt Illumina teknisk støtte.</li> </ol>

Prosesstrinn	Feilkode	Feilmelding	Beskrivelse	Anbefalt løsning
cfDNA-ekstraksjon	WM0219	If Vacuum is on, manually rest the pump. (Hvis vakuu er på, må du restarte pumpen manuelt.)	Vakuu kan fortsatt være på når en metode avbrytes under ekstraksjon.	<ol style="list-style-type: none"> <li>Trykk på knappen <b>Power</b> (Av/på) på vakuukontrolleren for å slå av vakuuet.</li> <li>Vent i 10 sekunder, og trykk på knappen <b>Power</b> (Av/på) en gang til for å slå på vakuuet.</li> </ol>
cfDNA-ekstraksjon	EE0477	An error has occurred while moving a plate. (Det oppsto en feil under flytting av en plate.) (iSWAP-feil)	Hvis det oppstår en iSWAP-feil (mistet plate, kunne ikke løfte plate osv.), ber systemet deg om å fullføre platebevegelsen manuelt.	<p>Kontroller at platen fortsatt kan brukes (at det ikke er sølt materiale).</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Avbryt kjøringen hvis platen ikke kan brukes.</li> <li>Hvis platen kan brukes, følger du anvisningene på skjermen for å fullføre plateoverføringen manuelt.</li> </ul>
cfDNA-ekstraksjon	EE0519	Scanned barcode does not match binding plate barcode on record. (Skannet strekkode matcher ikke bindingsplatens registrerte strekkode.)	Den innlastede bindingsplaten matcher ikke strekkoden til platen som ble fjernet.	Kontroller at platen som lastes inn, matcher den registrerte strekkoden (se sporingsloggen for riktig strekkode).

Prosesstrinn	Feilkode	Feilmelding	Beskrivelse	Anbefalt løsning
API	EA0372	Unable to connect to the data server. (Kan ikke koble til dataserveren.)	VeriSeq Onsite Server v2 svarer ikke på dataforespørsler fra Workflow Manager.	1. Sørg for at ML STAR er koblet til nettverket. 2. Sørg for at VeriSeq Onsite Server v2 er på. 3. Kontroller at ML STAR kan koble til VeriSeq Onsite Server v2 (via ping-forespørsel).
	EA0774	Connection Error (Tilkoblingsfeil). Tilkobling til API-serveren kunne ikke valideres.	VeriSeq Onsite Server v2 har sluttet å svare på dataforespørsler fra Workflow Manager.	Kontroller at: 1. Sørg for at ML STAR er koblet til nettverket. 2. Kontroller at ML STAR kan koble til VeriSeq Onsite Server v2 (via ping-forespørsel). 3. Sørg for at VeriSeq Onsite Server v2 er på.
	EA0780	403: Invalid Request (Ugyldig forespørsel) Den aktuelle transaksjonen er ikke gyldig.	Dataene som ble sendt, bryter med systemets arbeidsflytlogikk.	Se feildetaljene for mer informasjon. Vanlige årsaker er at inndata overskrider tillatt lengde eller inneholder ikke-godkjente tegn.

# Referanser

1. Nagaoka S, Hassold T, Hunt P. Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nat Rev Genet*. 2012;13(7):493-504. doi:10.1038/nrg3245.
2. Garnder RJ, Sutherland GR, Schaffer LG. *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling*. 4th edition, New York (NY): Oxford University Press; 2012.
3. Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, Ogilvie C, D'Antonio F. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015 Jan;45(1):16-26. doi: 10.1002/uog.14636.
4. American College of Obstetricians and Gynecologists. Screening for fetal aneuploidy. *Practice Bulletin No. 163*. *Obstet Gynecol*. 2016; 127(5):e123-137.
5. Gil MM, Accurti V, Santacruz B, Plana MN, Nicolaides KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2017 Apr 11. doi: 10.1002/uog.17484.
6. Bianchi D, Parker R, Wentworth J et al. DNA Sequencing versus Standard Prenatal Aneuploidy Screening. *N Engl J Med*. 2014;370(9):799-808. doi:10.1056/nejmoa1311037.
7. Benn P, Borrell A, Chiu RW, et al. «Position statement from the Chromosome Abnormality Screening Committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis.» *Prenat Diagn* 35 (2015): 725-34.
8. Gregg AR, Skotko BG, Benkendorf JL, et al. Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med*. 2016: doi:10.1038/gim.2016.97.
9. Dondorp W, de Wert G, Bombard Y, et al. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy and beyond: challenges of responsible innovation in prenatal screening. *Eur J Hum Genet*. 2015 Nov;23(11): 1438-50.
10. Grati, et al. «Fetoplacental mosaicism: potential implications for false-positive and false-negative noninvasive prenatal screening results.» *Genetics in Medicine* 16 (2014): 620-624.
11. Wellesley, et al. «Rare chromosome abnormalities, prevalence and prenatal diagnosis rates from population-based congenital anomaly registers in Europe.» *European Journal of Human Genetics* 20 (2012): 521-526.
12. Norton S, Lechner J, Williams T, Fernando M et al. A Stabilizing Reagent Prevents Cell-free DNA Contamination by Cellular DNA in Plasma During Blood Sample Storage and Shipping as Determined by Digital PCR. *Clin. I Biochem*. 2013;46: 1561-1565. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2013.06.002.
13. Bianchi D W, et al. «Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing.» *Obstet Gynecol* 119 (2012): 890-901.
14. Ehrich M, et al. «Genome-wide cfDNA screening: clinical laboratory experience with the first 10,000 cases.» *Genet Med* 19 (2017): 1332-1337.

15. Fiorentino F, et al. «The clinical utility of genome-wide cfDNA screening.» *Prenat Diagn* 37 (2017): 593-601.
16. Pertile, MD, et al. «Rare autosomal trisomies, revealed by maternal plasma DNA sequencing, suggest increased risk of feto-placental disease.» *Sci Transl Med* 9 (2017): eaan1240.

## Revisjonshistorikk

Dokument	Dato	Beskrivelse av endring
Dokumentnr. 1000000078751 v08	August 2022	Oppdater delenummeret for arbeidsprosessen Fjernet instruksjon om å pipettere for å blande hvis bibliotekplate var fryst.
Dokumentnr. 1000000078751 v07	Mai 2022	<p>Del opp Prosedyremessige begrensninger i VeriSeq NIPT Solution v2-rapportering, og ta med første to punkter. Resterende tekst i en ny overskrift Analysens begrensninger. Fjernet</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• VeriSeq fra alle reagensetiketter.</li> <li>• Påfør en platestrekkekode på VeriSeq NIPT Adapter Plate i klargjøringen Klargjøre biblioteker.</li> </ul> <p>Lagt til</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ordet sertifisert til DNase/RNase-fritt vann.</li> <li>• Én av følgende mikroplatelesere eller tilsvarende, og SpectraMax M2, M3, M4, M5 og merknad.</li> <li>• I delen VeriSeq NIPT Microlab STAR for å forklare hva som skal gjøres under en hendelse med feilhåndtering.</li> <li>• En merknad om å inspisere brønner visuelt.</li> <li>• Instruksjoner for partier med 24 og 48 prøver i alle protokolldelene.</li> <li>• Trinn for når den lilla adapterplaten eller tilsvarende skal brukes.</li> <li>• Mer tekst i delen Demografi og graviditetskarakteristikker for å ta med resultater for graviditet i første trimester.</li> <li>• Et punkt under spesifikasjonene for dypbrønnsplater for å omfatte momentresistent.</li> </ul> <p>Oppdatert</p>

Dokument	Dato	Beskrivelse av endring
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mer tekst for unike partinavn for klarhet og for å ta med et eksempel.</li> <li>• Symboler og formatering for merknader, forsiktighetsregler og advarsler.</li> <li>• Resultater for testunderpunktene.</li> <li>• Guanidintiocyanat til guanidinhydroklorid.</li> <li>• CVS til BVS (Basic Vacuum System – grunnleggende vakuumsystem.)</li> <li>• Mer tekst for bruk av helgenomscreeing og LLR-score.</li> <li>• reagensrørsesifikasjoner, dypbrønnsplater, 384-brønnsplater, 96-brønnsplater.</li> </ul>
Dokumentnr. 1000000078751 v06	August 2021	Oppdatert adresse for EU-autorisert representant.
Dokumentnr. 1000000078751 v05	Desember 2020	<p>Oppdatert avsnittene Prosedyreprinsipper, Advarsler og forholdsregler og Produktmerking med ytterligere presiseringer for å oppfylle regulatoriske krav.</p> <p>Mindre oppdateringer av innhold i protokoll for å samsvare med Illuminas stil og organisering.</p> <p>Korrigert beskrivelse av kromosom 21 som «det nest minste autosomet hos mennesker» til «det minste autosomet hos mennesker» i avsnittet Presisjon under Analytisk ytelse.</p> <p>La til forsiktighetsmerknader om feil bruk av beholdere og fare for at prøver blir slått sammen, i avsnittene Klargjøring av isolatplasma og Tolkning av resultater.</p> <p>La til nye delenumre for server og programvare til oppdateringen av ny servermodell og oppdateringer av delenumre for programvare.</p> <p>La til forsiktighetsmerknader med protokoll- og feilsøkinginformasjon om hvordan man håndterer og forhindrer overflyt av prøve.</p> <p>Oppdaterte virkestoffer i reagenset DNA Quantification Standard i Accessory Box slik at det stemmer overens med sikkerhetsdatabladet.</p> <p>Oppdaterte navngivingskonvensjoner for VeriSeq NIPT-modulen i Local Run Manager for å samsvare med annen dokumentasjon.</p> <p>La til revisjonslogg.</p>



Dokument	Dato	Beskrivelse av endring
Dokumentnr. 1000000078751 v04	Oktober 2020	Mindre rettelser.
Dokumentnr. 1000000078751 v03	September 2020	Oppdaterte materialliste for å oppgi spesifikasjoner for laboratorieutstyr sammen med kjente kompatible alternativer.
Dokumentnr. 1000000078751 v02	Februar 2020	Oppdaterte presentasjonen av informasjon om klinisk ytelse slik at den bedre formidler forskjellene mellom screeningtypene basis og helgenom. La til nytt avsnitt Forskjeller i ytelse mellom basisscreening og helgenomscreening. Fjernet motstridene informasjon om tilleggsrapporten er valgfri eller ikke, fra avsnittet Prosedyreprinsipper. Oppdaterte navngivingskonvensjon for VeriSeq NIPT Workflow Manager v2-programvaren gjennom hele dokumentet for å bruke samme format. Oppdatere merkingen av adresser for Australia og Illumina Netherlands for å gjenspeile nylige endringer.
Dokumentnr. 1000000078751 v01	August 2019	Fjernet dobbelt trinn i Extract cfDNA (Ekstraher cfDNA) forårsaket av en programvarefeil.
Dokumentnr. 1000000078751 v00	Mai 2019	Første versjon.

## Patenter og varemerker

Dette dokumentet og dets innhold er opphavsrettslig beskyttet for Illumina, Inc. og dets tilknyttede selskaper («Illumina»), og er ment utelukkende for kontraktbruk av kunden i forbindelse med bruk av produktet (produktene) beskrevet her, og for intet annet formål. Dette dokumentet og dets innhold skal ikke brukes eller distribueres til andre formål og/eller på annen måte kommuniseres, fremlegges eller reproduseres på noen måte uten forutgående, skriftlig samtykke fra Illumina. Illumina overfører ikke noen lisens under sitt patent, varemerke, opphavsrett eller sedvanerett eller lignende rettigheter til tredjeparter gjennom dette dokumentet.

Instruksjonene i dette dokumentet skal følges nøyaktig og kun av kvalifisert og tilfredsstillende utdannet personell for å sikre riktig og sikker bruk av produktet (produktene) som er beskrevet i dette dokumentet. Alt innhold i dette dokumentet skal leses fullt ut og være forstått før produktet (produktene) brukes.

HVIS DET UNNLATES Å LESE FULLSTENDIG OG UTTRYKKELEG FØLGE ALLE INSTRUKSJONENE I DETTE DOKUMENTET, KAN DET FØRE TIL SKADE PÅ PRODUKTET (PRODUKTENE), SKADE PÅ PERSONER, INKLUDERT BRUKERE ELLER ANDRE, OG SKADE PÅ ANNEN EIENDOM, OG DETTE VIL UGYLDIGGJØRE EVENTUELL GARANTI SOM GJELDER FOR PRODUKTET (PRODUKTENE).

ILLUMINA PÅTAR SEG IKKE ANSVAR SOM FØLGE AV FEIL BRUK AV PRODUKTET (PRODUKTENE) SOM ER BESKREVET I DETTE DOKUMENTET (INKLUDERT DELER AV DETTE ELLER PROGRAMVARE).

© 2022 Illumina, Inc. Med enerett.

Alle varemerker tilhører Illumina, Inc. eller deres respektive eiere. Ytterligere informasjon om varemerker finner du på [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Kontaktinformasjon



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, California, 92122 USA

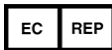
+1 800 809 ILMN (4566)

+1 858 202 4566 (utenfor Nord-Amerika)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com

CE  
2797



Illumina Netherlands B.V.

Steenoven 19

5626 DK Eindhoven

Nederland

### Australsk sponsor

Illumina Australia Pty Ltd

Nursing Association Building

Level 3, 535 Elizabeth Street

Melbourne, VIC 3000

Australia

## Produktmerking

Ønsker du en fullstendig oversikt over symboler som finnes på produktemballasjen og -merkingen, kan du gå til [support.illumina.com](http://support.illumina.com) og lese under fanen *Documentation* (Dokumentasjon) for settet.

Du finner et sammendrag over sikkerhet og ytelse (SSP) på <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>, etter oppstart av Eudamed (Europeisk database over medisinsk utstyr). Det er knyttet til enkel UDI-DI (0081627002NIPTRP).