

Bipacksedel

FÖR IN VITRO-DIAGNOSTISKT BRUK

Avsedd användning

VeriSeq™ NIPT Solution v2 är ett *in vitro*-diagnostiskt test som är avsett för att användas som ett screeningtest för detektion av genetiska fosteravvikelser i hela genom från maternella, perifera helblodsprover från kvinnor i minst tionde graviditetsveckan. VeriSeq NIPT Solution v2 sekvenserar hela genomet för detektion av partiella duplikationer och deletioner för alla autosomer och aneuploidistatus för alla kromosomer. Det är möjligt att begära rapportering av aneuploidi av könskromosom (SCA). Den här produktens resultat får inte utgöra den enda grunden för diagnos eller andra beslut vid en graviditet.

VeriSeq NIPT Solution v2 inkluderar: VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 för VeriSeq NIPT Microlab STAR, VeriSeq NIPT Sample Prep och VeriSeq Onsite Server v2 med VeriSeq NIPT Assay Software v2. VeriSeq NIPT Solution v2 är avsett för användning med NGS-sekvenseringsinstrument.

Sammanfattning och förklaring av analysen

Fetala kromosomavvikelser, specifikt aneuploidi, som innebär en avvikelse av antalet kromosomer, är en vanlig orsak till reproduktiva problem, medfödda missbildningar, utvecklingsförseningar och utvecklingsstörningar. Aneuploidi påverkar omkring 1 av 300 levande födda barn och siffrorna är mycket högre i samband med missfall och fosterdöd.^{1,2} Fram tills nyligen har det funnits två former av fosterdiagnostik för dessa sjukdomar: diagnostiska test eller screening. Diagnostiska test innebär invasiva procedurer som fostervattenprover eller moderkaksprover. Dessa testmetoder anses vara guldstandarden för identifiering av fosteraneuploidi. De är däremot förknippade med en risk för missfall på mellan 0,11 % och 0,22 %.³ Konventionell blodprovsscreening medför ingen risk för missfall eftersom metoden är icke-invasiv, men den är mindre exakt än diagnostiska test. Detekteringsgraden för trisomi 21 varierar mellan 69–96 % beroende på den specifika screeningen, moderns ålder och graviditetslängden vid testtillfället.⁴ Det är viktigt att notera att metoden har falskt positiva värden på cirka 5 %, som kan leda till invasiva diagnostiska test för att bekräfta resultatet, vilket för med sig risken för missfall relaterad till ingreppet.⁴ Ultraljudundersökningar kan också detektera kromosomabnormiteter, men med mindre säkerhet än de andra metoderna.

Fosteraneuploidi för kromosomerna 21, 18, 13, X och Y kan detekteras med en hög grad av noggrannhet genom icke-invasiv fosterdiagnostik (non-invasive prenatal testing, NIPT) som använder sekvensering av hela genom av cellfri DNA (cfDNA) från maternell plasma från kvinnor som har varit gravida i minst 10 veckor. En nyligen genomförd metaanalys av flera kliniska studier visade att den viktade uppsättningsdektektionsfrekvensen och specificiteten för trisomi 21 och trisomi 18 för graviditeter med ett embryo var följande: 99,7 % och 99,96 % för trisomi 21 respektive 97,9 % och 99,96 % för trisomi 18.⁵ En studie visar att användningen av NIPT som primär screening vid alla graviditeter skulle kunna leda till en minskning på 89 % av antalet bekräftande invasiva procedurer.⁶

Med hänsyn till den betydande minskningen av falskt positiva värden med NIPT jämfört med konventionella blodprovsscreeningar har många professionella medicinska organisationer utfärdat uttalanden som visar stöd för användning av NIPT.

Mer specifikt anser 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) och European Society of Human Genetics/American Society of Human Genetics att NIPT ska vara tillgängligt för alla gravida kvinnor.^{7,8,9} Rådgivning före testtillfället, informerat samtycke och diagnostisk testning för att bekräfta ett positivt cfDNA-screeningresultat rekommenderas.⁴

VeriSeq NIPT Solution v2 är ett icke-invasivt diagnostiskt in-vitro-test (IVD) som använder sekvensering av hela genom av cfDNA-fragment från maternella, perifera helblodsprover från kvinnor som har varit gravida i minst 10 veckor. Testet har två olika screeningtyper: basic (grundläggande) och genomwide (hela genom). Den grundläggande screeningen ger endast information om aneuploidistatus för kromosom 21, 18, 13, X och Y. Screening av hela genom ger partiella duplikationer och deletioner för alla autosomer och aneuploidistatus för alla kromosomer. Båda screeningtyperna erbjuder ett alternativ för rapportering av aneuploidi av könskromosom (SCA) med eller utan rapportering av fostrets kön. Rapporteringsalternativet för aneuploidi av könskromosom kan stängas av. Om rapporteringsalternativet för aneuploidi av könskromosom är avstängt rapporteras inte heller fostrets kön. Mer information om alternativ för könsrapportering finns i programhandboken för *VeriSeq NIPT Solution v2* (dokumentnummer 1000000067940).

Grundläggande principer

VeriSeq NIPT Solution v2 är en automatiserad lösning för NIPT-tester i laboratoriemiljö, vilka innefattar automatisk provberedning och sekvenseringsdataanalys. VeriSeq NIPT Sample Prep är specialiserade reagens som används tillsammans med VeriSeq NIPT Microlab STAR för att förbereda batcher om 24, 48 eller 96 prover för NGS. Paired-end-sekvenseringsdata med hela genom analyseras av ett specialiserat program, VeriSeq NIPT Assay Software v2, och en rapport med kvalitativa resultat genereras.

Arbetsflödet består av följande förfaranden: provinsamling, isolering av plasma, cfDNA-extraktion, biblioteksberedning, bibliotekskvantifiering, biblioteksuppsättningsprocess, sekvensering och analys som beskrivs i närmare detalj nedan:

- **Sample Collection** (Provinsamling) – 7–10 ml maternellt, perifert helblod samlas i ett Streck cellfritt DNA-blodprovsrör (BCT) som förhindrar lysning av celler, genomisk kontaminering och stabiliserar helblod.
- **Plasma Isolation** (Isolering av plasma) – Inom 5 dagar efter provtagningen isoleras plasma från maternellt, perifert helblod med hjälp av standardcentrifugeringsteknik. VeriSeq NIPT Microlab STAR aspirerar och dispenserar plasman i en deepwell-platta med 96 brunnar för efterföljande bearbetning. I händelse av att omtestning krävs kan prover förses med nya lock efter körningen och förvaras i 4 °C i ytterligare fem dagar (upp till totalt tio dagar efter blodprovstagning).



FÖRSIKTIGHET!

Om de ovannämnda förvaringstiderna överskrids kan provernas individuella felfrekvenser påverkas negativt.

- **cfDNA Extraction** (cfDNA-extraktion) – Reningen av cfDNA från plasma uppnås genom adsorption till en bindningsplatta, att bindningsplattan tvättas för att avlägsna kontamineringar och eluering.
- **Library Preparation** (Biblioteksberedning) – De renade cfDNA-fragmenten genomgår en reparationsprocess för att omvandla 5'- och 3'-överhäng till trubbiga ändar. Sedan tillsätts nukleotiden deoxiadenosin till 3'-ändarna för att skapa ett enda överhäng. Indexerade adaptrar med ett 3'-deoxitymidin-överhäng ligeras sedan på de bearbetade cfDNA-fragmenten. Det ligerade DNA:t renas med magnetkuler för omvänd immobilisering i fast fas. Varje prov i en uppsättning om 24, 48 eller 96 för en unik indexerad adapter. Adaptrarna har två syften:

**FÖRSIKTIGHET!**

Var ytterst försiktig för att undvika korskontaminering av indexen vilket kan leda till felaktiga resultat.

- Index tillåter providentifiering vid efterföljande sekvensering.
- Indexerade adaptrar innehåller sekvenser som möjliggör att bibliotek fångas in på en sekvensflödescells fasta yta för klustergenerering och efterföljande sekvensering.
- **Quantification** (Kvantifiering) – Biblioteksprodukten kvantifieras med ett fluorescerande färgämne med en koncentration som bestäms genom jämförelse med en DNA-standardkurva.
- **Library Pooling and Sequencing** (Biblioteksuppsättning och sekvensering) – Provbiblioteken kombineras till uppsättningar med 24 eller 48 prover i justerade mängder för att minimera variation i täckning. Varje uppsättning sekvenseras sedan med ett NGS-system.
- VeriSeq NIPT Solution v2 omfattar inte sekvenseringsutrustning och förbrukningsmaterial.
- **Analysis** (Analys) – För varje prov innefattar analysen av följande:
 - Identifiering av biblioteksfragment per indexsekvens och avstämning av paired-end-avläsningarna med ett genom med human referens.
 - Uppskattning av fosterfraktion av biblioteket genom att information från fördelningen av såväl längder som genomiska koordinater för biblioteksfragmenten kombineras.
 - Efter hänsyn till kända bias detekterar en statistisk modell regioner av genomet som är under- eller överrepresenterade i biblioteket i enlighet med en avvikelse för den uppskattade nivån av fosterfraktion.
 - NIPT-rapporten ger sammanfattande resultat för den valda testmenyn där ANOMALY DETECTED (AVVIKELSE DETEKTERAD) eller NO ANOMALY DETECTED (INGEN AVVIKELSE DETEKTERAD) anges tillsammans med den uppskattade fosterfraktionen för prover som passerar QC.
 - Den kompletterande rapporten ger kvantitativa värden som karakteriserar varje identifierad avvikelse.

Begränsningar

Analysens begränsningar

- Evidens för sensitivitet och specificitet för testet täcker graviditeter med ett och två embryon. Dessa anvisningar tillhandahåller inte sensitivitets- eller specificitetsdata för graviditeter med tre eller fler embryon.
- VeriSeq NIPT Solution v2 är inte avsedd att detektera polyploidi, som till exempel triploidi.
- VeriSeq NIPT Solution v2 är inte avsedd att detektera omstruktureringar av balanserade kromosomer.
- Analysen kräver maternella, perifera helblodsprover från kvinnor som har varit gravida i minst 10 veckor.
- Vid grundläggande screening söker testet VeriSeq NIPT Solution v2 efter specifika kromosomavvikelser. Resultat som rapporteras som NO ANOMALY DETECTED (INGEN AVVIKELSE DETEKTERAD) eliminerar inte risken för kromosomrubbingar i de testade kromosomerna. Ett negativt resultat eliminerar inte risken att graviditeten har andra kromosomrubbingar, genetiska sjukdomar eller fosterskador (t.ex. neuralrörsdefekt).
- Vid screening av hela genom kan stora deletioner och duplikationer som är mindre än 75 % av kromosomens storlek tyda på aneuploidi av hela kromosomen.
- Vissa regioner exkluderas från analysen vid screening av hela genom. En lista över sådana svartlistade regioner finns på Illuminas supportwebbplats. Detektering av genomiska avvikelser utförs endast på icke-exkluderade regioner.
- Rapportering av fostrets kön är inte tillgängligt i alla regioner med anledning av lokal lagstiftning som begränsar rapportering av kön.
- Baserat på källor kan cellfria DNA-baserade screeningsresultat påverkas av vissa maternella och fetala faktorer. Vissa av dessa listas nedan, men är inte begränsade till följande:
 - Ny maternell blodtransfusion
 - Tidigare maternell organtransplantation/stamcellstransplantation
 - Maternell autoimmun sjukdom
 - Maternella tumörer (benigna och maligna)
 - Maternell mosaicism
 - Maternella kopienummervariationer
 - Fetoplacental mosaicism/mosaicism begränsad till placentan
 - Fosterdöd/fosterresorption

Rapportering med VeriSeq NIPT Solution v2

- VeriSeq NIPT Solution v2 är ett screeningtest och bör inte betraktas isolerat från andra kliniska fynd och testresultat. Slutsatser om fostrets tillstånd och andra beslut rörande graviditeten bör inte endast baseras på resultaten av NIPT-screeningen.⁷
- VeriSeq NIPT Solution v2 rapporterar följande:
 - Den grundläggande screeningen testar överrepresentation av kromosomerna 13, 18 och 21.
 - Screeningar av hela genom, under- och överrepresentation av alla autosomer, inklusive partiella deletioner och duplikationer på minst 7 Mb.
 - För graviditeter med ett embryo där Yes (Ja) eller aneuploidi av könskromosom väljs som könsrapporteringsalternativ, följande könskromosomavvikelser: XO, XXX, XXY och XYY.
 - För graviditeter med ett embryo där Yes (Ja) väljs som könsrapporteringsalternativ rapporteras fostrets kön.
 - Förekomst av en Y-kromosom vid tvillinggraviditeter.

Produktkomponenter

VeriSeq NIPT Solution v2 (artikelnr 20030577) består av följande provberedningssatser:

- VeriSeq NIPT Sample Prep (24 samples) (artikelnr 20025895)
- VeriSeq NIPT Sample Prep (48 samples) (artikelnr 15066801)
- VeriSeq NIPT Sample Prep (96 samples) (artikelnr 15066802)

VeriSeq NIPT Solution v2 (artikelnr 20030577) består av följande programvarukomponenter:

- VeriSeq NIPT Assay Software v2 (artikelnr 20047024), förinstallerat på VeriSeq Onsite Server v2.
 - VeriSeq Onsite Server v2 (artikelnr 20028403 eller 20047000) eller befintlig VeriSeq Onsite Server (artikelnr 15076164 eller 20016240) som har uppgraderats till v2.
- VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 (artikelnr 20044988), förinstallerat på VeriSeq NIPT Microlab STAR.
 - VeriSeq NIPT Microlab STAR (artikelnr Hamilton Company Reno: 95475-01 (115 V) och 95475-02 (230 V), Hamilton Company Bonaduz: 806288).
- Local Run Manager VeriSeq NIPT Module (artikelnr 20044989).

Reagens

Reagens som tillhandahålls

Illumina tillhandahåller följande reagens: VeriSeq NIPT Sample Prep (24 prover) (artikelnr 20025895), VeriSeq NIPT Sample Prep (48 prover) (artikelnr 15066801) och VeriSeq NIPT Sample Prep (96 prover) (artikelnr 15066802). VeriSeq NIPT Sample Prep är konfigurerat för användning med VeriSeq NIPT Microlab STAR

(ML STAR) (artikelnr 95475-01, 95475-02 eller 806288), som tillhandahålls av Hamilton Company.

VeriSeq NIPT Sample Prep – extraktionsatts

Tabell 1 VeriSeq NIPT Extraction Box (24) och (48), artikelnr 20025869 och 15066803

Reagensnamn på etiketten	Antal behållare i satsen	Aktiva ingredienser	Förvaring
Lysis Buffer (Lysisbuffert)	1	Guanidinhydroklorid i buffrad vattenbaserad lösning	15 °C till 30 °C
Wash Buffer I (Tvättbuffert I)	1	Guanidinhydroklorid och isopropanol i buffrad vattenbaserad lösning	15 °C till 30 °C
Wash Buffer II (Tvättbuffert II)	1	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter	15 °C till 30 °C
Elution Buffer (Elueringsbuffert)	1	Buffrad vattenbaserad lösning	15 °C till 30 °C
Proteinase Buffer (Proteinasebuffert)	1	Glycerol i buffrad vattenbaserad lösning	15 °C till 30 °C
Proteinase K	3	Frystorkat proteinase K	15 °C till 30 °C

Tabell 2 VeriSeq NIPT Extraction Box (96), artikelnr 15066807

Reagensnamn på etiketten	Antal behållare i satsen	Aktiva ingredienser	Förvaring
Lysis Buffer (Lysisbuffert)	1	Guanidinhydroklorid i buffrad vattenbaserad lösning	15 °C till 30 °C
Wash Buffer I (Tvättbuffert I)	1	Guanidinhydroklorid och isopropanol i buffrad vattenbaserad lösning	15 °C till 30 °C
Wash Buffer II (Tvättbuffert II)	2	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter	15 °C till 30 °C
Elution Buffer (Elueringsbuffert)	1	Buffrad vattenbaserad lösning	15 °C till 30 °C
Proteinase Buffer (Proteinasebuffert)	1	Glycerol i buffrad vattenbaserad lösning	15 °C till 30 °C
Proteinase K	4	Frystorkat proteinase K	15 °C till 30 °C

VeriSeq NIPT Sample Prep – biblioteksberedningsatts

Tabell 3 VeriSeq NIPT Library Prep Box (24) och (48), artikelnr 20026030 och 15066809

Reagensnamn på etiketten	Antal behållare i satsen	Aktiva ingredienser	Förvaring
End Repair Mix (End Repair-blandning)	1	DNA-polymeras och dNTP:er i buffrad vattenbaserad lösning	-25 °C till -15 °C
A-Tailing Mix (A-Tailing-blandning)	1	DNA-polymeras och dATP i buffrad vattenbaserad lösning	-25 °C till -15 °C
Ligation Mix (Ligationsblandning)	1	DNA-ligas i buffrad vattenbaserad lösning	-25 °C till -15 °C
Hybridization Buffer (Hybridiseringsbuffert)	1	Buffrad vattenbaserad lösning	-25 °C till -15 °C
NIPT DNA Adapter Plate (NIPT-DNA-adapterplatta)	1	Oligonukleotider i buffrad vattenbaserad lösning	-25 °C till -15 °C

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

Reagensnamn på etiketten	Antal behållare i satsen	Aktiva ingredienser	Förvaring
End Repair Mix (End Repair-blandning)	1	DNA-polymeras och dNTP:er i buffrad vattenbaserad lösning	-25 °C till -15 °C
A-Tailing Mix (A-Tailing-blandning)	2	DNA-polymeras och dATP i buffrad vattenbaserad lösning	-25 °C till -15 °C
Ligation Mix (Ligationsblandning)	2	DNA-ligas i buffrad vattenbaserad lösning	-25 °C till -15 °C
Hybridization Buffer (Hybridiseringsbuffert)	1	Buffrad vattenbaserad lösning	-25 °C till -15 °C
NIPT DNA Adapter Plate (NIPT-DNA-adapterplatta)	1	Oligonukleotider i buffrad vattenbaserad lösning	-25 °C till -15 °C

VeriSeq NIPT Sample Prep – tillbehörssats

Tabell 5 VeriSeq NIPT Accessory Box, artikelnr 15066811

Reagensnamn på etiketten	Antal behållare i satsen	Aktiva ingredienser	Förvaring
DNA Binding Plate (DNA-bindningsplatta)	1	Mikroplatta i propylen med modifierat silikonmembran	2 °C till 8 °C
Resuspension Buffer (Resuspensionsbuffert)	1	Buffrad vattenbaserad lösning	2 °C till 8 °C
Sample Purification Beads (Reningsmagnetkolor för prover)	1	Paramagnetiska kulor, i fast fas, i buffrad vattenbaserad lösning	2 °C till 8 °C
DNA Quantification Reagent (Reagens för DNA-kvantifiering)	1	DNA-interkalerande färg i DMSO	2 °C till 8 °C
DNA Quantification Standard (Standard DNA-kvantifiering)	1	Standard dsDNA, icke-specifikt DNA och natriumazid i buffrad vattenbaserad lösning	2 °C till 8 °C

VeriSeq NIPT Sample Prep – rör och etiketter

Tabell 6 Workflow Tubes and Labels, artikelnr 15071543

Artikelnamn på etiketten	Antal artiklar i satsen	Förvaring
Etikett (LBL) – plattstreckkod	9	15 °C till 30 °C
Etikett (LBL) – streckkod för deepwell-platta	12	15 °C till 30 °C
Rör (TB) – tomt uppsättningsrör	5	15 °C till 30 °C

Reagens som inte tillhandahålls**Nödvändiga reagens som inte tillhandahålls**

- Reagens för sekvensering och förbrukningsmaterial för NGS-system
- Certifierat DNase-/RNase-fritt vatten
- Etanol, 100-procentig för molekylärbiologisk användning

OBS! Etanol av icke molekylärbiologisk kvalitet kan potentiellt ha en negativ effekt på analysens prestanda.

Reagens (tillval) – tillhandahålls inte

- Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) för NTC

Förvaring och hantering

1. Rumstemperatur definieras som 15 °C till 30 °C.
2. Alla reagens är avsedda för engångsbruk. När reagensen har preparerats för användning ska de användas omgående.
3. Kontakta Illuminas kundtjänst om förpackningarna till eller innehållet i komponenterna i VeriSeq NIPT Solution är skadade eller öppnade.
4. Reagensen är stabila när de förvaras enligt anvisningarna och fram till det angivna utgångsdatumet på satsens etiketter. Mer information om förvaringsförhållanden finns i kolumnen Förvaring i tabellerna i avsnittet [Reagens på sidan 5](#). Använd inte reagens med utgången bäst före-datum.
5. Förändringar av reagensens utseende kan indikera en försämring av materialens kvalitet. Använd inte reagensen om förändringar av deras utseende observeras (t.ex. tydliga förändringar av reagensets färg eller grumlighet med uppenbar mikrobiell kontaminering).
6. Följ följande bästa praxis vid hantering av reningsmagnetkuler för prover:
 - Frys aldrig magnetkulorna.
 - Låt magnetkulorna uppnå rumstemperatur före användning.
 - Omedelbart före användning ska magnetkulorna vortexblandas tills de är väl suspenderade och färgen är homogen.
7. Lysisbuffert, tvättbuffert I, tvättbuffert II, elueringsbuffert och proteinasebuffert kan bilda synliga utfällningar eller kristaller. Vortexblanda grundligt före användning och kontrollera sedan visuellt att det inte förekommer några utfällningar.
8. Frys aldrig helblod efter insamling.
9. Sekvensera biblioteken så snart som möjligt efter uppsättningsprocessen. Uppsättningsbibliotek är stabila i upp till sju dagar vid -25 °C till -15 °C. Ingen ytterligare denaturering krävs om lagring sker under den givna tidsperioden och enligt givna förhållanden.

Utrustning och material

Nödvändig utrustning och material – tillhandahålls inte

Nödvändig utrustning – tillhandahålls inte

Utrustning	Tillverkare
NGS-system med följande egenskaper: <ul style="list-style-type: none"> • 2 × 36 baspar, paired-end-sekvensering • Kompatibel med dubbla indexadapter från VeriSeq NIPT Sample Prep • Skapar BCL-filer automatiskt • Tvåkanalskemi • 400 miljoner paired-end-avläsningar per körning • Kompatibelt med VeriSeq NIPT Assay Software v2 eller NextSeq 550Dx Sequencing System. 	Instrumentets tillverkare eller Illumina, artikelnr 20005715
Frys, -25 °C till -15 °C	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Mikrocentrifug	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Pipetthållare	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Kylskåp, 2 °C till 8 °C	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Enkanalspipetter, 20 µl	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Enkanalspipetter, 200 µl	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Enkanalspipetter, 1 000 µl	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Provrörsskak	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Centrifug och rotor för blodprovsrör	

Utrustning	Tillverkare
<p>Motsvarande:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Kylcentrifug, 1 600 x g utan broms • Utsvängande rotor med bågare • Insatser för bågare, kapacitet för 24, 48, eller 96 rör, minsta djup 76 mm • Insatser för blodprovsvör, 16 x 100 mm <p>Rekommenderas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Centrifug i Allegra X12R-serien, 1 600 g • Centrifug Allegra GH-3.8 Rotor med bågare • Allegra Centrifuge Bucket Covers, två per förpackning • Allegra Centrifuge Adapter Assembly, 16 mm, fyra per förpackning 	<p>Valfri leverantör av laboratorieutrustning</p> <p>Beckman Coulter, artikelnr 392304 (120 V eller 230 V)</p> <p>Beckman Coulter, artikelnr 369704</p> <p>Beckman Coulter, artikelnr 392805</p> <p>Beckman Coulter, artikelnr 359150</p>
<hr/>	
Centrifug och rotor för mikroplattor	
<p>Motsvarande:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Centrifug, 5 600 x g • Utsvängande rotor med hållare för plattor med 96 brunnar, minsta djup 76,5 mm • Multifuge X4 Pro-MD 120V TX-1000BT • Sorvall Legend XTR Centrifuge • HIGHPlate 6000 Microplate Rotor • Rotor high plate 6000 <p>Ställ för mikroplattor</p> <ul style="list-style-type: none"> • Rekommenderas: <ul style="list-style-type: none"> • MicroAmp 96-Well Support Base • 96-Well PCR Plate Carrier 	<p>Valfri leverantör av laboratorieutrustning</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>
<hr/>	
<p>En av följande mikroplattläsare (fluorescensläsare), eller motsvarande med SoftMax Pro v6.2.2 eller senare:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gemini XPS • SpectraMax M2, M3, M4 och M5 <ul style="list-style-type: none"> • En lila insats medföljer mikroplattläsaren för användning i arbetsflödet 	<p>Molecular Devices, artikelnr XPS</p> <p>Molecular Devices, artikelnr M2, M3, M4 och M5</p>
<hr/>	
SpectraMax High-Speed USB, Serial Adapter	Molecular Devices, artikelnr 9000-0938

Utrustning	Tillverkare
Termocykler med följande specifikationer: <ul style="list-style-type: none"> • Uppvärt lock • Temperaturområde 4 °C till 98 °C • Temperaturnoggrannhet ±2 °C • Minsta ramphastighet 2 °C/s • Kompatibel med Twin.tec PCR Plate 96-well, full skirt 	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
VeriSeq NIPT Microlab STAR	Hamilton, artikelnr 95475-01 (115 V), artikelnr 95475-02 (230 V) eller artikelnr 806288 (för Hamilton Company Bonaduz)
VeriSeq Onsite Server v2 eller en uppgraderad VeriSeq Onsite Server	Illumina, artikelnr 20028403 eller 20047000 (v2) eller artikelnr 15076164 eller artikelnr 20016240 (uppgraderad)
Vid användning av ett NextSeq 550Dx Sequencing System: <ul style="list-style-type: none"> • NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 cycles) 	Illumina, artikelnr 20028870

Utrustning (tillval) – tillhandahålls inte

Utrustning	Tillverkare
Pluggo Decapper System	LGP Consulting, artikelnr 4600 4450
SpectraMax SpectraTest FL1 fluorescence validation plate	Molecular Devices, artikelnr 0200-5060
Tube Revolver/Rotator, 15 ml tubes, 40 rpm, 100–240 V	Thermo Scientific, katalognr 88881001 (US) eller katalognr 88881002 (EU)

Nödvärdigt material – tillhandahålls inte

Förbrukningsmaterial	Tillverkare
1000 µl Conductive Non-Sterile Filter Tips	Hamilton, artikelnr 235905
300 µl Conductive Non-Sterile Filter Tips	Hamilton, artikelnr 235903
50 µl Conductive Non-Sterile Filter Tips	Hamilton, artikelnr 235948

Förbrukningsmaterial	Tillverkare
<p>En deepwell-behållare med följande specifikationer:</p> <ul style="list-style-type: none"> • En SLAS 1–2004-mikroplatta med 96 pyramidformade eller koniska brunnar och en minsta kapacitet på 240 ml. • Alla ytor som kommer i kontakt med prover ska vara av polypropylen med låg DNA-bindning. • De inre måtten (vätskenivån) ska vara kompatibla med den automatiska aspiration och dispensering som VeriSeq NIPT Microlab STAR utför. • Höjdmåtten ska vara kompatibla med de automatiska rörelser som VeriSeq NIPT Microlab STAR utför. 	<p>Valfri leverantör av laboratorieutrustning</p> <p>Kompatibla behållare:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Corning Axygen, artikelnr RES-SW96-HP-SI • Agilent, artikelnr 201246-100
<p>Reagensbehållare med följande specifikationer:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Behållare med spetsig botten och en minsta kapacitet på 20 ml som passar i hållaren på VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Polypropylen som är fritt från RNase/DNase. • Behållarens inre mått (vätskenivån) genererar vätskenivåer med hjälp av analysreagensvolymmer som är kompatibla med den automatiska aspiration och dispensering som VeriSeq NIPT Microlab STAR utför. • Höjdmåtten ska vara kompatibla med de automatiska rörelser som VeriSeq NIPT Microlab STAR utför. 	<p>Valfri leverantör av laboratorieutrustning</p> <p>Kompatibla behållare:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Roche, artikelnr 03004058001
<p>Deepwell-plattor med följande specifikationer:</p> <ul style="list-style-type: none"> • En SLAS 1–2004-, 3–2004- eller 4–2004-mikroplatta med 96 pyramidformade eller koniska brunnar och en minsta brunnkapacitet på 2 ml. • Alla ytor som kommer i kontakt med prover ska vara av genomskinlig polypropylen med låg DNA-bindning. • Brunnarnas mått genererar vätskenivåer som är kompatibla med den automatiska aspiration och dispensering som VeriSeq NIPT Microlab STAR utför. • Det ska vara möjligt att fästa streckkoder på en plan yta med god vidhäftning på plattans krage. • En stabil ram som är kompatibel med minst 5 600 x g. • Plattans höjdmått ska vara kompatibla med de automatiska rörelser som VeriSeq NIPT Microlab STAR utför. 	<p>Valfri leverantör av laboratorieutrustning</p> <p>Kompatibla plattor:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, artikelnr 0030505301 • Eppendorf, artikelnr 30502302 • USA Scientific, artikelnr 1896-2000

Förbrukningsmaterial	Tillverkare
<p>Plattor med 384 brunnar med följande specifikationer:</p> <ul style="list-style-type: none"> • En mikroplatta med 384 brunnar, optimerad för små volymer, med en minsta brunnskapacitet på 50 µl. • Alla ytor som kommer i kontakt med prover ska vara av svart, ogenomskinlig polystyren som är ljusblockerande och har låg DNA-bindning. • Brunnarnas mått genererar vätskenivåer som är kompatibla med den automatiska aspiration och dispensering som VeriSeq NIPT Microlab STAR utför. • Plattans höjdmått ska vara kompatibla med de automatiska rörelser som VeriSeq NIPT Microlab STAR utför. • Det ska var möjligt att fästa streckkoder på en plan yta med god vidhäftning på plattans krage. 	<p>Valfri leverantör av laboratorieutrustning</p> <p>Kompatibla plattor:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Corning, artikelnr 3820
<p>Plattor med 96 brunnar med följande specifikationer:</p> <ul style="list-style-type: none"> • En mikroplatta med en stabil ram som är kompatibel med minst 5 600 x g och har 96 genomskinliga spetsiga brunnar, upphöjda kanter samt en minsta brunnskapacitet på 150 µl. • Alla ytor som kommer i kontakt med prover ska vara av polypropylen med låg DNA-bindning som är fritt från RNase/DNase. • Brunnarnas mått genererar vätskenivåer som är kompatibla med den automatiska aspiration och dispensering som VeriSeq NIPT Microlab STAR utför. • Plattans höjdmått ska vara kompatibla med de automatiska rörelser som VeriSeq NIPT Microlab STAR utför. • Det ska var möjligt att fästa streckkoder på en plan yta med god vidhäftning på plattans krage. • Kompatibel med termocykler för denaturering. 	<p>Valfri leverantör av laboratorieutrustning</p> <p>Kompatibla plattor:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, artikelnr 0030129512 • Eppendorf, artikelnr 30129580 • Eppendorf, artikelnr 30129598 • Eppendorf, artikelnr 30129660 • Eppendorf, artikelnr 30129679 • Bio-Rad, artikelnr HSP9601
<p>En av följande förseglingar:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Microseal 'F' Foil • Folieförseglingar 	<p>Bio-Rad, katalognr MSF1001 Beckman Coulter, artikelnr 538619</p>
<p>Cell-Free DNA BCT CE</p>	<p>Streck, katalognr 218997</p>
<p>Push Caps</p>	<p>Sarstedt, artikelnr 65.802</p>
<p>Rör med skruvkork, 2 ml</p>	<p>Valfri leverantör av laboratorieutrustning</p>

Förbrukningsmaterial	Tillverkare
20 µl filterspetsar för 20 µl pipett	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
200 µl filterspetsar för 200 µl pipett	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
1 000 µl filterspetsar för 1 000 µl pipett	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Motsvarande: <ul style="list-style-type: none"> • en alkoholbaserad snabbtorkande spraydesinfektion • en lösning av desinficerande rengöringsmedel 	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Rekommenderas: <ul style="list-style-type: none"> • avjoniserat vatten och 70 % etanol 	

Material (tillval) – tillhandahålls inte

Förbrukningsmaterial	Tillverkare
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) för NTC	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Rör, skruvkork, 10 ml (endast för kontrollprov)	Sarstedt, artikelnr 60.551
Rör, skruvkork, 50 ml	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Serologiska pipetter, 25 ml	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Serologiska pipetter, 10 ml	Valfri leverantör av laboratorieutrustning

Insamling, transport och förvaring av prover



FÖRSIKTIGHET!

Hantera alla prover som potentiellt smittsamma ämnen.

- Helblodprover på 7–10 ml ska tas i Streck cellfritt DNA-blodprovsvör.
- Transport av helblod måste följa alla gällande styrande bestämmelser för transport av etiologiska medel. Snabba frakt-/transportmetoder rekommenderas.
- Under transport ska proverna förvaras i en temperatur mellan 4 °C och 30 °C. När proverna tas emot ska de förvaras i 2 °C till 8 °C fram tills att arbetet kan fortsätta. Tiden mellan blodprovstagning och initial isolering av plasma bör inte överskrida fem dagar.
- I händelse av att omtestning krävs kan prover förses med nya lock efter körningen och förvaras i 4 °C i ytterligare fem dagar (upp till totalt tio dagar efter blodprovstagning).



FÖRSIKTIGHET!

Om de ovannämnda förvaringstiderna överskrids kan provernas individuella felfrekvenser påverkas negativt.

Varningar och försiktighetsåtgärder

- Den här analysen innehåller proteinase K. Personskador kan uppstå vid inandning, intagande, hudkontakt och ögonkontakt. Använd på en väl ventilerad plats och använd skyddskläder. Undvik att andas in damm och släng tomma förpackningar och oanvänt innehåll i enlighet med lokala bestämmelser.
- Den här analysen innehåller guanidiniumklorid. Personskador kan uppstå vid inandning, intagande, hudkontakt och ögonkontakt. Använd på en väl ventilerad plats och använd skyddskläder. Släng tomma förpackningar och oanvänt innehåll i enlighet med lokala bestämmelser.
- Den här analysen innehåller isopropanol, som är en lättantändlig kemikalie. Förvara åtskilt från värme och öppna lågor. Personskador kan uppstå vid inandning, intagande, hudkontakt och ögonkontakt. Använd på en väl ventilerad plats och använd skyddskläder. Släng tomma förpackningar och oanvänt innehåll i enlighet med lokala bestämmelser.
- Den här analysen innehåller dimetylsulfoxid, en frätande och brännbar vätska. Personskador kan uppstå vid inandning, intagande, hudkontakt och ögonkontakt. Använd på en väl ventilerad plats och använd skyddskläder. Släng tomma förpackningar och oanvänt innehåll i enlighet med lokala bestämmelser.
- Förhindra att farliga gaser bildas genom att inte kassera avfall från cfDNA-extraktion (som innehåller guanidinhydroklorid) med avfall som innehåller blekmedel (natriumhypoklorit).
- Hantera alla prover som potentiellt smittsamma ämnen.
- Arbeta enligt vedertagna laborierutiner. Använd inte pipetten med munnen. Ät inte, drick inte och rök inte på angivna arbetsområden. Använd engångshandskar och laborierock vid hantering av prover och analysreagens. Tvätta händer nogga efter att du hanterat prover och analysreagens.
- Använd inte några analyskomponenter utanför det angivna utgångsdatumet på analyssets etikett. Byt inte ut analyskomponenter från olika analysseter. Analysseter kan identifieras på etiketten som sitter på förpackningen. Förvara analyskomponenterna vid angiven temperatur.
- Förhindra att prover eller reagens bryts ned genom att säkerställa att ångor från den natriumhypoklorit som används vid städning skingras fullständigt innan protokollet påbörjas.
- Underlåtenhet att följa de förfaranden som beskrivs kan resultera i felaktiga resultat eller signifikant försämra provkvaliteten.
- Rapportera omedelbart allvarliga händelser relaterade till den här produkten till Illumina och behöriga myndigheter i det land där användaren och patienten befinner sig.
- Information om miljö, hälsa och säkerhet finns i säkerhetsdatabladet på support.illumina.com/sds.html.

Metodanmärkningar

Undvika kontaminering

- Använd nya spetsar och ny förbrukningsbar laborieutrustning.
- Använd aerosolresistenta spetsar för att minska risken för överförings- och korskontaminering mellan prover.
- På grund av risken för kontaminering bör du vara extremt noga med att kontrollera att brunnarnas innehåll inte lämnar brunnen. Var noga med att innehållet inte skvätter. Centrifugera efter varje vortex-steg.
- Följ tillämpliga bestämmelser för korrekta laborierutiner och hygien vid hantering av blod och blodderivat.
- Använd inte blekmedel i form av aerosolsprej när du utför beredning av bibliotek. Kontaminering med rester av blekmedel kan leda till analysfel.
- Placera plattan på en stadig, plan yta och greppa plattan ordentligt när du ska bryta förseglingen. Avlägsna förseglingen långsamt och säkerställ att förseglingen inte kommer i kontakt med exponerade brunnar. Var noga med att inte röra vid exponerade brunnar eller rubba innehållet. Korskontaminering mellan brunnar kan ge felaktiga resultat.

Rengöra plattformen på VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Kontrollera att plattformen är ren innan den används. Rutinen för veckovist underhåll bör utföras minst en gång i veckan. Följ dessa rengöringsanvisningar.
- Ta bort alla hållare som inte kan lastas och rengör dem med en alkoholbaserad snabbtorkande spraydesinfektion med avjoniserat vatten och 70 % etanol, och låt dem torka. Om de är mycket smutsiga kan du sänka ned dem i en lösning av desinficerande rengöringsmedel, skölja med det alkoholbaserade desinficeringsmedlet och låta dem torka.
- Öppna den främre luckan och torka plattformen med en trasa indränkt i avjoniserat vatten och 70 % etanol. Det är viktigt att kontrollera om glidklossarna är rena.
- Ta bort BVS-grenröret och rengör det, packningen och de invändiga utrymmena i vakuumsystemet med en trasa. Undvik att rengöra packningen med etanol eftersom det kan göra materialet skört.
- Töm spetsavfallet för CORE 96-huvudet och den fristående kanalen.
- Ta bort den fristående kanalens utmatningsplatta för spetsar på avfallsstationen för spetsar och rengör den: spreja avjoniserat vatten och 70 % etanol direkt på ytan och torka av. Dra över en ny plastpåse över ramen och fäst den igen. Sätt tillbaka utmatningsplattan för spetsar på sin plats.
- Spreja avjoniserat vatten och 70 % etanol direkt på ytan till CORE 96-huvudets spillåda och ränna, och torka dem rena.

- Om det är svårt att ta bort avlagringar från spetsavfallet kan du torka med en duk fuktad med DNase-/RNase-fritt vatten tills avlagringarna har tagits bort. Kassera duken på lämpligt sätt. Sterilisera sedan med det alkoholbaserade desinfektionsmedlet.
- Blöt en luddfri trasa eller bomullstuss med 70 % etanol. Svabba laserns skannerfönster på streckkodsläsaren. Använd samma trasa eller bomullstuss för att rengöra varje brunn på CPAC-platthållaren. Om du använder en trasa ska du trycka ner trasan i varje brunn på hållaren med den trubbiga änden av en penna för att säkerställa att brunnens insida rengörs ordentligt.
- Rengör de fristående kanalerna:
 - På de fristående kanalerna ska du rengöra spetsutmatningshylsan (pipetteringskanalernas yttre del) med en luddfri trasa indränkt i avjoniserat vatten och 70 % etanol. (Mer information finns i *Hamilton Microlab STAR Reference Guide #15070074 (Referenshandbok för Hamilton Microlab STAR nr 15070074)*.)
 - Rengör pipetteringshuvudets stoppskiva och O-ringar (pipetteringskanalernas yttre del) med en luddfri trasa indränkt i avjoniserat vatten och 70 % etanol.
- Rengör CORE 96-huvudet:
 - Använd samma luddfria trasa indränkt i avjoniserat vatten och 70 % etanol för att rengöra höljet till 96-huvudet och den nedre delen av stoppskivorna.
 - Använd samma trasa, eller en remsa tyg indränkt i avjoniserat vatten och 70 % etanol, och dra den runt sidorna på pipettkanalerna på 96-huvudet för att göra rent O-ringarna. Upprepa det här förfarandet för varje pipettkanal på 96-huvudet.
- Spreja fram- och sidoskyddet med avjoniserat vatten och 70 % etanol och torka torrt.
- Rengör Autoload-skyddsbandet med en trasa indränkt i avjoniserat vatten och 70 % etanol och torka utan att utöva tryck.
- Byt ut hållarna när plattformen och komponenterna är helt torra.

OBS! Om rengöring och underhåll av ML STAR inte utförs korrekt kan det resultera i korskontaminering och försämrade analysprestanda.

Kvalitetskontroll

Kontrollmaterial med kända prestandaegenskaper kan utvärderas för att detektera skillnader i bearbetning och tekniska förfaranden i laboratoriet.

Om ett kontrollprov eller en negativ kontroll (NTC) körs minskar det totala antalet okända maternella prover som kan bearbetas med varje provberedningssats.

Överskrid inte två NTC-prover per batch med 24 eller 48 prover eller fyra NTC-prover per batch med 96 prover.

Bruksanvisning

Tips och tekniker

Om en säker stoppunkt inte har specificerats i protokollet fortsätter du direkt till nästa steg.

Strekkoder för plattor

- Strekkoder för plattor med hög kant börjar med PL.
- Strekkoder för deepwell-plattor börjar med DW.
- Fäst strekkoderna på plattorna med hög kant och deepwell-plattorna på sidan, intill kolumn 12.
- Ladda plattor med strekkoden vänd mot höger för att den automatiska skanningen ska fungera.

Försegling av plattan

- Var ytterst försiktig för att undvika korskontaminering – det ska inte finnas någon synlig vätska på förseglingens undersidan.
 - Säkerställ att förseglingens exponerade undersida inte kommer i kontakt med exponerade brunnar.
 - Var noga med att inte röra vid exponerade brunnar.
- Försegla alltid plattan med 96 brunnar innan följande steg i protokollet:
 - Vid centrifugering.
 - Vid termisk cykling.
- Försegla plattan genom att applicera det självhäftande omslaget och sedan förseglingen. Säkerställ att tryck appliceras över hela plattan och att förseglingen är tät över varje brunn.
- Utför följande innan plattans försegling bryts:
 - Centrifugera plattan med 96 brunnar vid 1 000 × g i 20 sekunder.
 - Placera plattan på en plan yta innan du långsamt tar bort förseglingen.

VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Innan användning ska du utföra och dokumentera obligatoriskt underhåll enligt tillverkarens instruktioner.
- Observera ML STAR under de automatiserade stegen. Kontrollera om det finns meddelanden och anvisningar i gränssnittet för VeriSeq NIPT Workflow Manager v2.
- Ha den främre luckan på plats vid bearbetning.
- Håll plattformen fri från objekt vid bearbetning.
- Om alternativknappen **Exclude** (Uteslut) visas under en felhanteringshändelse ska du inte välja det alternativet under några omständigheter. Avbryt körningen om metoden inte kan fortsätta efter felhanteringshändelsen eller om du har begränsade felhanteringsalternativ.
- När du får en uppmaning av VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 under plattvakuumstegen ska du manuellt skapa en tätning mellan plattan och vakuumgrenröret.

- Låt systemet kassera spetsarna från adaptorn automatiskt. Ta inte bort tips manuellt om du inte får en sådan uppmaning från programmet.
- Ta bort reagens och förbrukningsmaterial när du får en uppmaning av Workflow Manager.
- Töm vakuumavfallet varje dag. Den första avfallskorgen får aldrig vara mer än halvfull. Ett överskott av vakuumavfall kan skada vakuumpumpen och minska vakuumeffekten i systemet.
- Ladda ett helt ställ med de individuellt räknade åttakanalsspetsarna innan du startar metoden för batcher med 24, 48 och 96 prover.

Bearbeta prover

Förfarande

1. Genomför följande steg för varje alikvot:
 - a. Centrifugera prover med streckkoder vid $1\ 600 \times g$ i 10 minuter vid $4\ ^\circ\text{C}$ utan broms.
 - b. Ta bort provrören när centrifugen har stannat helt.Påbörja isolering av plasma inom 15 minuter efter centrifugeringen. Upprepa centrifugeringen om mer än 15 minuter går.
2. Inspektera varje rör för att bedöma provens lämplighet genom att verifiera följande krav:
 - Att provvolymen är den förväntade.
 - Tydlig synlig separation mellan de röda blodkropparna och plasmaskikten i proverna efter centrifugering.
 - Att plasmanivån är minst 1,5 ml över buffy-coat.
 - Att provet inte är starkt hemolyserat (dvs. att plasman inte är djupt röd).
 - Att provet inte är lipemiskt (t.ex. att plasman inte är grumligt vit eller mjölkaktigt ogenomskinlig).
 - Att provet inte har koagulerat.



FÖRSIKTIGHET!

Prover som har förvarats eller hanterats felaktigt kan bli olämpliga. Om olämpliga prover bearbetas i arbetsflödet kan de täppa till bindningsplattan under extraktion, vilket leder till att prover flödar över till närliggande brunnar.

3. Ta bort locken på rören och ladda dem i rörhållarna. Ladda alla prover och plasmakontroller i batchen om sådana finns.



FÖRSIKTIGHET!

Välj inte alternativet Exclude (Uteslut) om det visas under en felhanteringshändelse. Avbryt körningen om metoden inte kan fortsätta efter felhanteringshändelsen och du har begränsade felhanteringsalternativ.

Isolera plasma

Beredning

1. Märk en deepwell-platta med "Intermediär plasma" och fäst en streckkod på den.
2. Märk en deepwell-platta med "Slutgiltig plasma" och fäst en streckkod på den.
3. Ladda ett helt ställ med de individuellt räknade åttakanalsspetsar innan du startar metoden för batcher med 24, 48 och 96 prover.



FÖRSIKTIGHET!

Kontrollera att rätt plattor används för intermediär plasma och slutgiltig plasma. Om en deepwell-behållare används istället för en deepwell-platta kommer proverna att blandas, vilket kan ge inkorrekta resultat.

Förfarande

1. Öppna AppLauncher och välj sedan **VeriSeq NIPT Method**.
2. Ange ett unikt batch-ID och användarnamn och välj sedan **OK**.
Ett batch-ID kan innehålla ≤ 26 tecken. Du kan använda siffror, bokstäver, understreck (_) och bindestreck (-). Till exempel: 2025-10-16_Batch3.
Batch-ID:t är inte skiftlägeskänsligt. Skiftlägeskänsliga batch-ID:n anses inte vara unika.
Batchnamn måste vara unika och får inte endast skilja sig åt genom användningen av versaler. Till exempel är batchnamnen Batch01 och batch01 inte unika. Samma regel gäller för namngivning av prov-ID:n.
3. Välj **New Batch** (Ny batch).
4. Välj **OK** efter initieringen för att påbörja isoleringen av plasma.
5. Utför ett av följande steg:
 - För att läsa in ett befintligt provark väljer du provarket som associeras med batchen och sedan **OK**.
 - För att gå vidare utan att välja ett provark väljer du **No Sample Sheet** (Inget provark).

Information om att skapa provark finns i *Programhandbok för VeriSeq NIPT Solution v2 (dokumentnr 1000000067940)*.

OBS! Provtyp, enkelembryo eller tvillingar måste registreras korrekt för varje prov för att säkerställa korrekt dataanalys. Om du väljer **No Sample Sheet** (Inget provark) måste standardvärden för proverna vara inställda bland serviceverktygen i Workflow Manager. Mer information finns i *Programhandbok för VeriSeq NIPT Solution v2 (dokumentnummer 1000000067940)*.

6. Välj batchstorlek och välj sedan **OK**.
7. Välj antal NTC:er och välj sedan **OK**.
NTC-positionerna är alltid de sista positionerna som valts. Med exempelvis två NTC-positioner i en körning med 24 prover är det position 23 och 24 som är NTC:er.

8. Kontrollera att alla streckkoder sitter fast och ställ sedan proven, spetsarna och plattorna (med streckkoden vänd åt höger) på hållaren.
9. Välj **OK** efter varje uppmaning.

Batchstorlek	Typ av hållare	Rad	Artikel	Position
24, 48, 96	Spets	7–12	Spets, 1 000 µl	5
			Spets, 1 000 µl (endast batcher med 96 prover)	4, 5
	Rör	15	Preparerade bloduppsamlingsrör 1–24 (för alla batchstorlekar)	1–24
	Rör	16	Preparerade bloduppsamlingsrör 25–48 (endast för batchstorlek 48 och 96)	25–48
	Rör	17	Preparerade bloduppsamlingsrör 49–72 (endast för batchstorlek 96)	49–72
	Rör	18	Preparerade bloduppsamlingsrör 73–96 (endast för batchstorlek 96)	73–96
	Multiflex	19–24	Tom deepwell-platta, slutgiltig plasma – med streckkod	4
	Multiflex	19–24	Tom deepwell-platta, intermediär plasma – med streckkod	5
	Reagens	47	[Tillval] Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) – används för negativ kontroll (NTC)	5

10. Kontrollera att hållare, laboratorieutrustning och reagens är korrekt laddade.
11. Välj **OK** på skärmen Pre-Spin Deck Verification (Verifiering av plattform före åtgärd).
12. Håll uppsikt över ML STAR när den utför de automatiserade stegen.
13. När du uppmanas av Workflow Manager ska du kontrollera att plattformen på ML STAR är fri från hinder, så att ML STAR kan lasta av hållarna.
14. Välj **Unload** (Lasta av) för att lasta av plattformen.
15. Ta bort deepwell-plattan med intermediär plasma enligt följande.
 - a. Kontrollera plattan visuellt för att säkerställa att volymen är konsekvent i alla brunnar (inga pipettfel). Förväntad volym är 1 000 µl.
 - b. Registrera eventuella inkonsekvenser när isoleringen av plasma har slutförts.
 - c. Försegla plattan, ladda den försiktigt och centrifugera vid 5 600 × g i 10 minuter utan broms eller på den lägsta inställningen.
16. Välj **Yes** (Ja) för att fortsätta till beredning av slutgiltig plasma.

17. Ta bort plattans försegling och ställ tillbaka den på hållaren.

Batchstorlek	Typ av hållare	Rad	Artikel	Position
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Deepwell-platta för intermediär plasma	5

18. Markera kryssrutan **Intermediate Plasma plate has been spun** (Platta med intermediär plasma har centrifugerats) och välj sedan **OK**.

19. Håll uppsikt över ML STAR när den utför de automatiserade stegen.

20. När du uppmanas av Workflow Manager ska du kontrollera att plattformen på ML STAR är fri från hinder så att ML STAR kan lasta av hållarna.

21. Välj **Unload** (Lasta av) för att lasta av plattformen.

22. Töm hållarna och plattformen när du uppmanas att göra det av Workflow Manager.

23. Ta bort deepwell-plattan med slutgiltig plasma.

24. Kontrollera plattan med avseende på följande fel:

- Inkonsekvent volym i alla brunnar. Förväntad volym är 900 µl.
- Synliga cellpellets.
- Mycket uttalad hemolys.

Om du ser onormala cellpellets eller mycket uttalad hemolys ska du ogiltigförklara det påverkade provet när isoleringen av plasma har slutförts eller använda Batch Manager. Mer information om Batch Manager finns i *Programhandbok för VeriSeq NIPT Solution v2 (dokumentnr 1000000067940)*.

25. Välj **OK** när du uppmanas av Workflow Manager.

26. Fyll i kommentarer om påverkade brunnar och välj sedan **OK**.

27. Utför ett av följande steg:

- Välj **Yes** (Ja) för att fortsätta till cfDNA-extraktionen.
- Välj **Exit** (Avsluta) för att avsluta.

SÄKER STOPPUNKT

Om du avbryter ska du försegla plattan med den slutgiltiga plasman och förvara den vid 2 °C till 8 °C i upp till sju dagar.

Extrahera cfDNA

Beredning

1. Kontrollera extraktions- och tillbehörshållarna visuellt för att bekräfta att satsen inte har gått ut.

2. Bered följande reagens. Märk behållarna och deepwell-behållarna med reagensnamnen.

Reagens	Förvaring	Anvisningar
Deepwell-platta för slutgiltig plasma	2 °C till 8 °C	Om plattan har förvarats ska du låta den stå i 30 minuter för att uppnå rumstemperatur. Centrifugera vid 1 000 × g i 20 sekunder. Bryt förseglingen på deepwell-plattan för slutgiltig plasma innan den används.

3. Tillsätt försiktigt 3,75 ml proteinasebuffert till varje reagensflaska med proteinase K.

- Förbered tre flaskor för 24 och 48 prov.
- Förbered fyra flaskor för 96 prov.

4. Sätt ett lock på flaskorna med proteinase K och votexblanda för att resuspendera.



FÖRSIKTIGHET!

Kontaminera inte gummiproppen. Om gummiproppen kommer i kontakt med andra ämnen kan den kontaminera framtida prover.

5. Överför innehållet i alla flaskor med proteinase K till en reagensbehållare och märk den med "Proteinase K".

6. Tillsätt 100 ml 100-procentig etanol till varje reagensflaska med tvättbuffert II.

- Förbered 1 flaska för 24 och 48 prov.
- Förbered två flaskor för 96 prov.

7. Blanda flaskorna med tvättbuffert II genom att vända på dem.

8. Markera kryssrutorna på flaskorna med tvättbuffet II.

9. Märk en ny platta med hög kant med "Intermediär" och fäst en plattstreckkod.

10. Märk en ny platta med hög kant med "cfDNA-eluering" och fäst en plattstreckkod.

11. Märk en ny deepwell-platta med "Intermediär för extraktion" och fäst en streckkod för en deepwell-platta.

12. Fäst en plattstreckkod på DNA-bindningsplattan.

13. Applicera en folieförsegling på oanvända brunnar för batcher med 24 och 48 prover.

14. Förbered en rengöringslösning med 70 % etanol (70 % etanol och 30 % DNase-/RNase-fritt vatten) för rengöring av vakuumsystemet.

15. Förbered vakuumsystemet enligt följande.

- Ta bort vakuimgrenröret och rengör med 70 % etanol.
Undvik att rengöra packningen med etanol eftersom det kan göra materialet skört.
- Töm vakuumavfallet.
- Kontrollera att ML STAR-vakuumsystemet är påslaget.

Förfarande

1. Välj **OK** för att starta cfDNA-extraktionen.
2. Om **VeriSeq NIPT Method** inte är öppet:
 - a. Öppna AppLauncher och välj sedan **VeriSeq NIPT Method**.
 - b. Ange batch-ID och användarnamn och välj sedan **OK**.
3. Ladda spetsarna i spetshållarna enligt följande och välj sedan **OK**.



FÖRSIKTIGHET!

Lägg till ett helt ställ med åttakanalsspetsar innan du påbörjar metoden för batcher med 24, 48 och 96 prover.

Batchstorlek	Typ av hållare	Rad	Artikel	Position
24	Spets	1–6	Spets, 1 000 µl	1
		7–12	Spets, 300 µl	1
48	Spets	1–6	Spets, 1 000 µl	1, 2
		7–12	Spets, 300 µl	1
96	Spets	1–6	Spets, 1 000 µl	1, 2, 3, 4
		7–12	Spets, 300 µl	1

4. Ladda de räknade spetsarna på spetshållarna enligt följande.

Batchstorlek	Typ av hållare	Rad	Artikel	Position
24, 48, 96	Spets	49–54	Spets, 1 000 µl	1
			Spets, 300 µl	2
			Spets, 50 µl	3

5. Ange positionen för den första och sista spetsen för varje spetshållare och välj sedan **OK**.
6. Skanna streckkoderna på extraktionssatsen.
7. Ange användarnamnet eller initialerna för personen som förberedde reagenset och välj sedan **OK**.
8. Skanna streckkoderna på tillbehörssatsen.
9. Ange användarnamnet eller initialerna för personen som förberedde reagenset och välj sedan **OK**.
10. Kontrollera att streckkoderna sitter fast.
11. Bryt förseglingen på deepwell-plattan för slutgiltig plasma vid behov.

12. Ställ plattorna (med streckkoden vänd åt höger) på platthållaren enligt följande och välj sedan **OK**.

Batchstorlek	Typ av hållare	Rad	Artikel	Position
24, 48, 96	Multiflex	19– 24	Ny platta med hög kant, intermediär, med streckkod	1
			Ny platta med hög kant, cfDNA-eluering, med streckkod	2
			Ny deepwell-platta, intermediär för extraktion, med streckkod	4
			Deepwell-platta för slutgiltig plasma, med streckkod	5

13. Kontrollera att DNA-bindningsplattan har en streckkod och välj sedan **OK**.
14. För batcher med ofullständiga plattor ska du försegla de oanvända brunnarna med en tillskuren försegling (kolumn 4–12 för batcher med 24 prover och kolumn 7–12 för batcher med 48 prover).
15. Ställ DNA-bindningsplattan på vakuimgrenröret med streckkoden åt höger.
16. Innan du placerar bindningsplattan på BVS-grenröret ska du visuellt inspektera brunnarna för eventuella igensättningar.
Igensättningar kan hindra flödet av reagens när vakuum används.
17. Om du använder batcher med 24 eller 48 prover ska du täcka oanvända brunnar och försegla dem med en folieförsegling. Markera kryssrutan **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (Är DNA-bindningsplattans kolumner förseglade?) och välj sedan **OK**.
18. Ställ reagensbehållarna i reagenshållaren enligt följande och välj sedan **OK**.

Batchstorlek	Typ av hållare	Rad	Artikel	Position
24, 48	Reagens	47	16 ml elueringsbuffert	1
			11 ml Proteinase K	2
96	Reagens	47	16 ml elueringsbuffert	1
			15 ml Proteinase K	2

19. För över de angivna reagensen till deepwell-behållarna och ställ sedan behållarna i deepwell-hållarna enligt följande.
20. Välj **OK**.

Batchstorlek	Typ av hållare	Rad	Artikel	Position
24, 48	Deepwell	39–44	125 ml tvättbuffert II	1
			125 ml tvättbuffert I	2
			60 ml 100-procentig etanol	3
			100 ml lysisbuffert	4
			60 ml DNase-/RNase-fritt vatten	5
96	Deepwell	39–44	200 ml tvättbuffert II	1
			125 ml tvättbuffert I	2
			100 ml 100-procentig etanol	3
			100 ml lysisbuffert	4
			100 ml DNase-/RNase-fritt vatten	5

21. Vänta tills den automatiska reagensvolymkontrollen har slutförts.
22. Kontrollera att vakuumavfallet är tomt (halvfullt rekommenderas) och välj sedan **OK**.
23. Kontrollera placeringen av alla hållare och reagens samt all utrustning och välj sedan **OK** på skärmen Extraction Deck Verification (Verifiering av extraktionsplattformen).
24. Observera ML STAR under de automatiserade stegen.



Du måste manuellt ogiltigförklara prover som flödar över och inte detekteras av systemet innan de kontaminerar närliggande brunnar.

25. Efter det sista vakuumsteget ska DNA-bindningsplattan tas bort och botten rengöras med 70 % etanol.
26. Försegla brunnar som inte redan är täckta på DNA-bindningsplattan och ställ sedan DNA-bindningsplattan på den tomma deepwell-plattan för slutgiltig plasma.
27. Centrifugera DNA-bindningsplattan/deepwell-plattan för slutgiltig plasma vid 5 600 × g i 10 minuter med bromsen aktiverad.
28. Välj **OK**.
29. Slutför rengöringen av vakuumsystemet under tiden som DNA-bindningsplattan centrifugeras:
- Ta bort vakuumgrenröret och välj sedan **OK**.
 - Vänta tills den automatiska avfallshantering slutförts.
 - Rengör vakuumgrenröret och insidan av vakuumsystemet med 70-procentig etanol och byt sedan vakuumgrenröret.
 - Markera kryssrutan **Manifold is on Vacuum** (Grenrör är på vakuum) för att påbörja överföringen av elueringsplattan till vakuumgrenröret och välj sedan **OK**.

30. Efter centrifugeringen ska du bryta förseglingen på brunnarna som innehåller prover på DNA-bindningsplattan.
31. Placera DNA-bindningsplattan på cfDNA-elueringsplattan som står på vakuumbrennröret.
32. Ladda DNA-bindningsplattan med streckkoden till höger och välj sedan **OK**.
33. Observera ML STAR under de automatiserade stegen.
34. Markera kryssrutan **Plates are assembled as indicated** (Plattor är monterade enligt anvisningarna) efter inkubationen. Bekräfta att DNA-bindningsplattan/cfDNA-elueringsplattan står på ett ställ (om det krävs för centrifugering).
35. Försegla de brunnar som inte redan är täckta på DNA-bindningsplattan.
36. Centrifugera vid $5\ 600 \times g$ i 2 minuter med bromsen aktiverad och välj sedan **OK**.
37. Kontrollera cfDNA-elueringsplattan visuellt för att säkerställa att volymen är konsekvent i alla brunnar. Förväntad volym är cirka 55 μ l.
38. Försegla och behåll cfDNA-elueringsplattan för biblioteksberedningen.
39. När du uppmanas av Workflow Manager ska du kontrollera att plattformen på ML STAR är fri från hinder så att ML STAR kan lasta av hållarna.
40. Välj **Unload** (Lasta av) för att lasta av plattformen.
41. Lasta av alla hållarna och rengör plattformen på ML STAR. Välj sedan **OK**.
42. Fyll i kommentarer om påverkade brunnar och välj sedan **OK**.
43. Utför ett av följande steg:
 - Välj **Yes** (Ja) för att fortsätta till biblioteksberedningen.
 - Välj **Exit** (Avsluta) för att avsluta.

SÄKER STOPPUNKT

Om du avbryter ska du försegla elueringsplattan med cfDNA och förvara den vid $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ till $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ i upp till sju dagar.

Förbered bibliotek

Beredning

1. Kontrollera biblioteksberednings- och tillbehörssatserna visuellt för att bekräfta att satserna inte har gått ut.
2. Bered följande reagens. Märk behållarna och deepwell-behållarna med reagensnamnen.

Reagens	Förvaring	Anvisningar
A-Tailing-blandning	-25 °C till -15 °C	Tina i rumstemperatur. Vortexblanda och centrifugera sedan kort.
cfDNA-elueringsplatta	-25 °C till -15 °C	Om plattan har förvarats ska du kontrollera att den inte har förvarats längre än sju dagar och låta den tina i rumstemperatur. Vortexblanda vid 1 500 rpm i en minut. Centrifugera vid 1 000 × g i 20 sekunder.
End Repair-blandning	-25 °C till -15 °C	Tina i rumstemperatur. Vortexblanda.
Hybridiseringsbuffert	-25 °C till -15 °C	Tina i rumstemperatur. Vortexblanda. Förvara igen efter användning.
Ligationsblandning	-25 °C till -15 °C	Tina i rumstemperatur. Vortexblanda och centrifugera sedan kort.
NIPT DNA Adapter Plate (NIPT-DNA-adapterplatta)	-25 °C till -15 °C	Tina i rumstemperatur. Vortexblanda. Centrifugera vid 1 000 × g i 20 sekunder.
Resuspensionsbuffert	2 °C till 8 °C	Vortexblanda. Förvara igen efter användning.
Sample Purification Beads (Reningsmagnetkolor för prover)	2 °C till 8 °C	Låt stå i 30 minuter för att uppnå rumstemperatur. Vortexblanda grundligt före varje användning. Vortexblanda eller blanda genom att vända på flaskan tills alla magnetkolor är i suspension och blandningen är homogen.



FÖRSIKTIGHET!

Var ytterst försiktig när du bryter förseglingen av NIPT-DNA-adapterplattan för att undvika aerosolkorskontaminering mellan brunnar som kan ge felaktiga resultat.

3. Om cfDNA-elueringsplattan förvarades fryst ska den beredas enligt följande.
 - a. Tina i rumstemperatur.
 - b. Vortexblanda vid 1 500 rpm i en minut.
 - c. Centrifugera vid 1 000 × g i 20 sekunder.

4. Märk en ny platta med hög kant med "Bibliotek" och fäst en plattstreckkod.
5. Bered 80-procentig etanol från absolut etanol. Kombinera 40 ml 100-procentig etanol med 10 ml DNase-/RNase-fritt vatten. Blanda genom att vända på flaskan.
6. Kontrollera att ML STAR:s termiska styrning är påslagen.

Späda ut enzymer

1. Kombinera A-Tailing-blandning och resuspensionsbuffert i ett rör med skruvkork. Vortexblanda och centrifugera sedan kort.

Batchstorlek	A-Tailing-blandning (µl)	Resuspensionsbuffert (µl)
24, 48	900	1 200
96	1 800	2 400

2. Kombinera ligationsblandning och resuspensionsbuffert i ett rör med skruvkork. Vortexblanda och centrifugera sedan kort.

Batchstorlek	Ligationsblandning (µl)	Resuspensionsbuffert (µl)
24, 48	230	1 713
96	440	3 278

Förfarande

1. Välj **OK** för att aktivera biblioteksberedning. Om **VeriSeq NIPT Method** inte redan är öppet:
 - a. Öppna AppLauncher och välj **VeriSeq NIPT Method**.
 - b. Ange batch-ID och användarnamn och välj sedan **OK**.
2. Kontrollera att följande förbrukningsmaterial är förberett enligt anvisningarna på skärmen Reagent Preparation (Förbered reagens):
 - A-Tailing-blandning, ligationsblandning och 80-procentig etanol.
 - Reningsmagnetkolor för prover, End Repair-blandning och NIPT-DNA-adapterplatta.
3. Markera kryssrutorna och välj sedan **OK**.
4. Läs av streckkoderna på biblioteksberedningssatsen.
5. Ange användarnamnet eller initialerna för personen som förberedde reagenset och välj sedan **OK**.
6. Skanna streckkoderna på tillbehörssatsen.
7. Ange användarnamnet eller initialerna för personen som förberedde reagenset och välj sedan **OK**.

8. Ladda spetsarna i spetshållarna enligt följande och välj sedan **OK** för varje hållare.

Batchstorlek	Typ av hållare	Rad	Artikel	Position
24	Spets	1–6	Spets, 50 µl	1
		7–12	Spets, 300 µl	1, 2
48	Spets	1–6	Spets, 50 µl	1, 2
		7–12	Spets, 300 µl	1, 2, 3, 4
96	Spets	1–6	Spets, 50 µl	1, 2, 3, 4
		7–12	Spets, 300 µl	1, 2, 3, 4, 5

9. Om du avbröt protokollet efter cfDNA-extraktionsförfarandet ska du ladda de räknade spetsarna på spetshållarna enligt följande.

Batchstorlek	Typ av hållare	Rad	Artikel	Position
24, 48, 96	Spets	49–54	Spets, 1 000 µl	1
			Spets, 300 µl	2
			Spets, 50 µl	3

10. Ange positionen för den första spetsen för varje spetshållare och välj sedan **OK**.

11. Kontrollera att alla streckkoder sitter fast och ställ plattorna (med streckkoden vänd mot höger) på plathållaren enligt följande och välj sedan **OK**.

Batchstorlek	Typ av hållare	Rad	Artikel	Position
24, 48, 96	Multiflex	19–24	cfDNA-elueringsplatta, med streckkod	1
			DNA-adapterplatta, med streckkod	2
			Ny platta med hög kant och 96 brunnar, bibliotek, med streckkod	3
			Nya plattor med hög kant och 96 brunnar	4, 5

12. Ladda deepwell-hållarna enligt följande och välj sedan **OK**.

Batchstorlek	Typ av hållare	Rad	Artikel	Position
24, 48, 96	Deepwell	39–44	50 ml 80-procentig etanol i en deepwell-behållare	1
			Nya plattor med hög kant och 96 brunnar	2, 3, 4, 5

13. Ställ reagensbehållarna i reagenshållaren enligt följande och välj sedan **OK**.

Batchstorlek	Typ av hållare	Rad	Artikel	Position
24, 48, 96	Reagens	47	2,5 ml End Repair-blandning	1
			Förberedd A-Tailing-blandning (total volym)	2
			Förberedd ligationsblandning (total volym)	3
			10 ml reningsmagnetkolor för prover	4
			12 ml hybridiseringsbuffert	5

14. Spara resten av 12 ml hybridiseringsbuffert (HT1) i behållaren för uppsättningssteget.
15. Kontrollera att hållarna, laborieutrustningen och reagensen är laddade enligt anvisningarna och välj sedan **OK** på skärmen Library Deck Verification (Verifiering av biblioteksplattform).
16. Vänta tills den automatiska reagensvolymkontrollen har slutförts.
17. Observera ML STAR under de automatiserade stegen.
18. När du uppmanas av Workflow Manager ska du kontrollera att plattformen på ML STAR är fri från hinder så att ML STAR kan lasta av hållarna.
19. Välj **Unload** (Lasta av) för att lasta av plattformen.
20. Kontrollera biblioteksplattan för att säkerställa att volymen är konsekvent i alla brunnar.



FÖRSIKTIGHET!

Proverna kan ge felaktiga resultat om brunnsvolymerna inte är enhetliga.

21. Förslut och behåll biblioteksplattan om den ska lagras.
22. Lasta av hållarna, rengör plattformen och välj sedan **OK**.
23. Fyll i kommentarer om påverkade brunnar och välj sedan **OK**.
24. Utför ett av följande steg:
 - Välj **Yes** (Ja) för att fortsätta till bibliotekskvantifiering.
 - Välj **Exit** (Avsluta) för att avsluta.

SÄKER STOPPUNKT

Om du avbryter ska du försegla biblioteksplattan innan den förvaras. Biblioteksplattan är stabil i upp till sju dagar från beredningsdagen om den förvaras vid -25 °C till -15°C.

Kvantifiera bibliotek

Beredning

1. Bered följande reagens:

Reagens	Förvaring	Anvisningar
Reagens för DNA-kvantifiering	2 °C till 8 °C	Ska skyddas från ljus. Låt tina i rumstemperatur i 30–150 minuter. (Det rekommenderas att reagenset tas bort i början av proceduren Prepare Libraries [Förbered bibliotek].) Vortexblanda och centrifugera sedan kort.
DNA Quantification Standard (Standard DNA-kvantifiering)	2 °C till 8 °C	Vortexblanda och centrifugera sedan kort.
Resuspensionsbuffert	2 °C till 8 °C	Vortexblanda.

2. Om biblioteksplattan förvarades fryst ska den beredas enligt följande.
 - a. Kontrollera att den inte har förvarats längre än sju dagar och låt den tina i rumstemperatur.
 - b. Vortexblanda.
 - c. Centrifugera vid 1 000 × g i en minut.
3. Slå på fluorimetern 10 minuter före användning.
4. Fäst en plattstreckkod på en ny platta med 384 brunnar.
5. Fäst en plattstreckkod på en ny platta med hög kant.

Förfarande

1. Välj **OK** för att starta kvantifiering.
2. Om VeriSeq NIPT Method inte redan är öppet:
 - a. Öppna AppLauncher och välj **VeriSeq NIPT Method**.
 - b. Ange batch-ID och användarnamn och välj sedan **OK**.
3. Skanna streckkoderna på tillbehörssatsen.
4. Ange användarnamnet eller initialerna för personen som förberedde reagenset och välj sedan **OK**.
5. Ladda spetsarna i spetshållaren enligt följande och välj sedan **OK**.

Batchstorlek	Typ av hållare	Rad	Artikel	Position
24, 48	Spets	1–6	Ställ med spetsar, 300 µl	1
			Ställ med spetsar, 50 µl	2
96	Spets	1–6	Ställ med spetsar, 300 µl	1
			Ställ med spetsar, 50 µl	2, 3

6. Kontrollera att streckkoderna sitter fast.
7. Bryt biblioteksplattans försegling vid behov.
8. Ställ plattorna (med streckkoden vänd åt höger) på Multiflex-hållaren enligt följande och välj sedan **OK**.

Batchstorlek	Typ av hållare	Rad	Artikel	Position
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Nya plattor med hög kant, med streckkod	1
			Ny platta med 384 brunnar, med streckkod	2
			Biblioteksplatta, med streckkod	3
			Nya plattor med hög kant och 96 brunnar	4, 5

9. Ställ uppsättningsrören utan lock i rörhållarna enligt följande och välj sedan **OK**.

Batchstorlek	Typ av hållare	Rad	Artikel	Position
24, 48, 96	Rör	46	DNA Quantification Standard (Standard DNA-kvantifiering)	1
			Reagens för DNA-kvantifiering	2

10. Ställ reagensbehållarna i reagenshållaren enligt följande och välj sedan **OK**.

Batchstorlek	Typ av hållare	Rad	Artikel	Position
24, 48, 96	Reagens	47	Nytt reagensrör (tomt)	1
			16 ml resuspensionsbuffert	2

11. Om du avbröt protokollet efter biblioteksberedningsförfarandet ska du ladda de räknade spetsarna på spetshållarna enligt följande.

Batchstorlek	Typ av hållare	Rad	Artikel	Position
24, 48, 96	Spets	49–54	Spets, 1 000 µl	1
			Spets, 300 µl	2
			Spets, 50 µl	3

12. Ange positionen för den första och sista spetsen för varje spetshållare och välj sedan **OK**.
13. Kontrollera att hållarna, laborieutrustningen och reagensen är laddade enligt anvisningarna och välj sedan **OK** på skärmen Quant Deck Verification (Verifiering av kvantifieringsplattform).
14. Vänta tills den automatiska reagensvolymkontrollen har slutförts.
15. Observera ML STAR under de automatiserade stegen.
16. När du uppmanas av Workflow Manager ska du kontrollera att plattformen på ML STAR är fri från hinder så att ML STAR kan lasta av hållarna.

17. Välj **Unload** (Lasta av) för att lasta av plattformen.
18. Lasta av biblioteksplattan.
 - a. Kontrollera plattan för att säkerställa att volymen är konsekvent i alla brunnar.
 - b. Försegla biblioteksplattan och förvara i rumstemperatur tills den fluorometriska dataanalysen har slutförts.
19. Lasta av de kvarvarande plattorna med 96 brunnar och kontrollera dem för att säkerställa att volymen är korrekt i alla brunnar.

Stora volymskillnader kan tyda på problem med pipetteringsstegen.
20. Lasta av plattan med 384 brunnar och kontrollera att det finns vätska i rätt brunnar.
21. Försegla plattan med en folieförsegling.
22. Centrifugera vid $1\ 000 \times g$ i 20 sekunder.
23. Inkubera vid rumstemperatur i 10 minuter och skydda från ljus.
24. Lasta av alla hållare.
25. Rengör plattformen på ML STAR och välj sedan **OK**.

**FÖRSIKTIGHET!**

Kassera inte kvantifieringsreagens förrän data har erhållits. Du behöver reagensen om du måste utföra en omkvantifiering.

26. Efter inkubationen tar du bort folieförseglingen och ställer plattan med 384 brunnar på mikroplattans läsare. Se till att använda den lila adapterplattan (artikelnummer: 0310-4336) som tillhandahålls av Molecular Devices eller en motsvarande platta om den är kompatibel med instrumentet som används.
 - Kontrollera att A1 är i det övre vänstra hörnet under laddning.
27. Dubbelklicka på VeriSeq NIPT-mallen för att öppna den i SoftMax Pro.
28. Välj **New Experiment** (Nytt experiment) på fliken Home (Start).
29. Välj **Read** (Läs).
30. Exportera data som XML enligt följande.
 - a. Högerklicka på **Plate** (Platta) och välj sedan **Rename** (Ändra namn).
 - b. Läs av streckkoden på kvantifieringsplattan och välj sedan **OK**.
 - c. Välj ikonen för plattor i det övre vänstra hörnet på skärmen och välj sedan **Export** (Exportera) i menyn.
 - d. Markera kryssrutan **Expt name** (Exportnamn), välj alternativet raw (råformat) för plattdatum, välj XML som utdataformat och välj sedan **OK**.
 - e. Ange utdatafilens sökväg och namn. Välj sedan **Save** (Spara).

Hamilton-datorn måste ha åtkomst till filens plats. Använd inte mellanslag i filnamnet eller filens sökväg.

Analys

1. Ange fluorimeter-ID på skärmen Scanner Information (Skannerinformation) på ML STAR.
2. Fyll i kommentarer om fluorescensläsarkörningen och välj sedan **OK**.
3. Gå till *.xml-kvantifieringsfilen som innehåller de fluorometriska uppgifterna och välj sedan **OK**.
4. Granska analysresultaten för standardkurvan och provkoncentrationen och välj sedan **OK**.
5. Välj **Rescan** (Skanna om) om du måste skanna om plattan.
Prover är tids- och ljuskänsliga. Om det behövs bör plattan skannas om direkt.
6. Fyll i kommentarer om påverkade brunnar och välj sedan **OK**.
7. Utvärdera resultaten och fortsätt på följande sätt.
 - Gå vidare till [Uppsättningsbibliotek på sidan 36](#) (Uppsättningsbibliotek) om resultaten möter specifikationerna. Specifikationer finns i kvantifieringstabellen för QC-värden och -gränser i *Programhandbok för VeriSeq NIPT Solution v2 (dokumentnummer 1000000067940)*.
 - Systemet avbryter förfarandet om resultaten inte möter specifikationerna. Upprepa kvantifieringsförfarandena som börjar med [Beredning på sidan 33](#).
8. Utför ett av följande steg:
 - Välj **Yes** (Ja) för att fortsätta till [Uppsättningsbibliotek på sidan 36](#) (Uppsättningsbibliotek).
 - Välj **Exit** (Avsluta) för att avsluta.

SÄKER STOPPUNKT

Om du avbryter ska du försegla biblioteksplattan innan den förvaras. Biblioteksplattan är stabil i upp till sju dagar i följd om den förvaras i $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ till $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Uppsättningsbibliotek

Beredning

1. Bered följande reagens:

Reagens	Förvaring	Anvisningar
Hybridiseringsbuffert	$-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ till $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$	Tina i rumstemperatur. Vortexblanda. Förvara igen efter användning.

2. Om biblioteksplattan förvarades fryst ska den beredas enligt följande.
 - a. Kontrollera att den inte har förvarats längre än sju dagar och låta den tina i rumstemperatur.
 - b. Vortexblanda vid 1 500 rpm i en minut.
 - c. Centrifugera vid $1\ 000 \times g$ i 20 sekunder.
 - d. Blanda genom att pipettera.
3. Märk ett tomt uppsättningsrör med Uppsättning A. Om uppsättningen har 96 prover märker du ytterligare ett tomt uppsättningsrör med Uppsättning B.

4. Spara följande denatureringsprogram på termocyklern med ett uppvärmt lock.
 - a. Välj alternativet med förvärt lock och ställ in till 102 °C.
 - b. Ställ in reaktionsvolymen till 50 µl.
 - c. Ställ in ramphastigheten på max (≥ 2 °C per sekund).
 - d. Inkubera vid 96 °C i 10 minuter och sedan vid 4 °C i 5 sekunder.
 - e. Håll temperaturen vid 4 °C.

Förfarande

1. Ställ biblioteksplattan på den förprogrammerade termocyklern och kör denatureringsprogrammet. Denaturera inte biblioteksplattan innan kvantifieringen har passerat QC-värdena, i den händelse du vill utföra en omkvantifiering.
2. Centrifugera biblioteksplattan vid 1 000 x g i 20 sekunder.
3. Välj **OK** för att aktivera uppsättningsbiblioteken.
4. Om VeriSeq NIPT Method inte redan är öppet:
 - a. Öppna AppLauncher och välj **VeriSeq NIPT Method**.
 - b. Ange batch-ID och användarnamn och välj sedan **OK**.
5. Välj uppsättningskoncentrationen och välj sedan **OK**.
Målklustertätheten är 220–260 K/mm².

OBS! Uppsättningskoncentrationer och/eller uppsättningsvolymerna kan behöva ökas för batcher med 24 prover för att bibehålla liknande klusterdensiteter som erhållits med batcher med 48/96 prover.

6. Utför något av följande steg om du får en uppmaning av Workflow Manager:
 - För att läsa in ett provark väljer du provarket som associeras med batchen och välj sedan **Load** (Läs in).
 - Välj **Use Default** (Använd standard) för varje inställning för att använda systemets standardvärden för de kvarvarande proven, könsrapportering eller skärmtyp.
Information om att skapa ett provark finns i *Programhandbok för VeriSeq NIPT Solution v2 (dokumentnr 1000000067940)*.
7. Välj **Start** för att starta denatureringsplattans timer.
8. Ladda spetsarna på spetshållarna enligt följande.

Batchstorlek	Typ av hållare	Rad	Artikel	Position
24, 48, 96	Spets	7–12	Filterspets, 50 µl	1

9. Ställ den denaturerade biblioteksplattan (med streckkoden vänd mot höger) på Multiflex-hållaren enligt följande och välj sedan **OK**.

Batchstorlek	Typ av hållare	Rad	Artikel	Position
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Denaturerad biblioteksplatta (med streckkod)	1

10. Ställ uppsättningsrören i rörhållarna enligt följande och välj sedan **OK**.

Batchstorlek	Typ av hållare	Rad	Artikel	Position
24, 48	Rör	46	Nytt 2 ml-rör, uppsättning A	1
96	Rör	46	Nytt 2 ml-rör, uppsättning A	1
			Nytt 2 ml-rör, uppsättning B	2

11. Ställ reagensbehållarna i reagenshållaren enligt följande och välj sedan **OK**.

Batchstorlek	Typ av hållare	Rad	Artikel	Position
24, 48, 96	Reagens	47	3 ml hybridiseringsbuffert	1

12. Ladda spetsarna på spetshållarna enligt följande.

Batchstorlek	Typ av hållare	Rad	Artikel	Position
24, 48, 96	Spets	49–54	Filterspets, 1 000 µl	1
			Filterspets, 300 µl	2
			Filterspets, 50 µl	3

13. Ange positionen för den första och sista spetsen för varje spetshållare och välj sedan **OK**.
14. Kontrollera att hållare, laborieutrustning och reagens är laddade enligt anvisningarna.
15. Välj **OK** på skärmen Pooling Deck Verification (Verifiering av uppsättningsplattform).
16. Observera ML STAR under de automatiserade stegen.
17. Fyll i kommentarer om påverkade brunnar och välj sedan **OK**.
18. När du uppmanas av Workflow Manager ska du kontrollera att plattformen på ML STAR är fri från hinder så att ML STAR kan lasta av hållarna.
19. Välj **Unload** (Lasta av) för att lasta av plattformen.
20. Lasta av rörhållaren.
21. Sätt lock på alla uppsättningsrör, vortexblanda dem och centrifugera dem sedan kort.
22. Välj **OK**.
23. Sekvensera biblioteken så snart som möjligt efter uppsättningsprocessen. Försegla biblioteksplattan och förvara den i –25 °C till –15 °C i upp till sju dagar för att tillåta omkörning av uppsättningen.

SÄKER STOPPUNKT

Om du avbryter ska du fästa lock på uppsättningsrören och förvara dem vid –25 °C till –15 °C i upp till sju dagar.

Förbereda uppsättningsbibliotek för sekvensering

Beredning

1. Bered följande reagens:

Reagens	Förvaring	Anvisningar
Uppsättningsrör	-25 °C till -15 °C	Tina i rumstemperatur om den har förvarats. Vortexblanda kort. Centrifugera kort.

2. Förbered NGS-systemet genom att fylla i följande fält i Local Run Manager VeriSeq NIPT Module:
 - a. Run Name (Körningsnamn)
 - b. [Valfritt] Run Description (Körningsbeskrivning)
 - c. Pool Barcode (Uppsättningsstreckkod)



FÖRSIKTIGHET!

Uppsättningsstreckkoden som anges i LRM-modulen måste matcha uppsättningsstreckkoden som anges i Workflow Manager. Felaktiga körningskonfigurationer förkastas av analysprogrammet och kräver omsekvensering.

Mer information om hur du använder Local Run Manager VeriSeq NIPT Module finns i *Programhandbok för VeriSeq NIPT Solution v2 (dokumentnr 1000000067940)*.

Förfarande

1. Kombinera följande volymer i reagenskassetten och pipettera sedan för att blanda.
 - Hybridiseringsbuffert (900 µl)
 - 450 µl uppsättning A (450 µl)
2. Fortsätt med sekvenseringen i ett NGS-system genom att följa anvisningarna i systemhandboken/referenshandboken för ditt NGS-instrumentet. Läs *Referenshandbok för NextSeq 550Dx-instrument (dokumentnr 1000000009513)* eller *NextSeq 550Dx Instrument Package Insert (Bipacksedel för NextSeq 550Dx Instrument) (dokumentnr 1000000043133)* för NextSeq 550Dx.
3. Bekräfta korrekt körningskonfiguration när du uppmanas att göra det.
4. Upprepa vid behov den här proceduren för uppsättning B.
 - För att erhålla densitetsområdet för målanhopningen kan biblioteksplattan köras igen med en annan uppsättningskoncentration på Hamilton. En omkörning av uppsättningen ogiltigförklarar den ursprungliga uppsättningen.
 - Alternativt kan kvoten för uppsättning till HT1 (450 µl + 900 µl) modifieras för att erhålla målintervallet för klustertäthet.

Next Generation Sequencing

VeriSeq NIPT Solution v2 kan användas med ett NGS-system med följande specifikationer:

- Kapacitet för 2 x 36 paired-end-avläsningar.
- Kompatibel med indexadaptrarna i VeriSeq NIPT Sample Prep.
- Tvåkanalskemi.
- Automatisk produktion av .BCL-filer (rådata från sekvenseringsinstrument).
- 400 miljoner paired-end-avläsningar per körning.
- Kompatibel med VeriSeq NIPT Assay Software v2.

NextSeq 550Dx är kompatibel med VeriSeq NIPT Solution v2.

Sekvenseringsdataanalys

Efter att sekvenseringen har slutförts skickas sekvenseringsdata automatiskt till VeriSeq NIPT Assay Software v2 för analys och rapportgenerering. Rapporten innehåller klassificeringar för varje prov i batchen samt en utvärdering av alla körda QC-mått. Analysförfarandet från slutförd sekvensering till slutgiltiga resultat tar omkring fyra timmar för en batch med 48 prov. Mer information om dataanalysen och utdatafilen finns i *Programhandbok för VeriSeq NIPT Solution v2 (dokumentnr 1000000067940)*.

Tolkning av resultat

VeriSeq NIPT Solution v2-algoritmen använder en avancerad statistisk modell som kombinerar flera olika typer av information från insamlingen av paired-end-sekvenserade biblioteksfragment. Modellen används för att detektera regioner i genomet som är under- eller överrepresenterade i biblioteket för varje prov. I synnerhet redogör den här modellen för huruvida graden av under- eller överrepresentation är kvantitativt förenlig med aneuploidi i fostrets genom vid den nivå av fosterfraktion som uppskattas för biblioteket.

För alla kromosomer matchas paired-end-sekvenseringsdata med referensgenomet (HG19). Unika, ej duplicerade och matchade avläsningar samlas i diskreta värden om 100 kb. Motsvarande diskreta värden justeras för GC-metodfel och enligt tidigare fastställd områdesspecifik genomtäckning. Med sådana normaliserade diskreta värden erhålls statistiska mått för varje autosom genom att jämföra de täckningsområden som kan påverkas av aneuploidi med resten av autosomerna. Ett sannolikhetsförhållande (LLR, likelihood ratio) beräknas för varje prov genom att ta hänsyn till de täckningsbaserade måtten och den uppskattade fosterfraktionen. LLR-värdet är sannolikheten för att ett prov påverkas med hänsyn till den iakttagna täckningen och fosterfraktionen, kontra sannolikheten för att ett prov förblir opåverkat med hänsyn till samma iakttagna täckning. Beräkningen av förhållandet tar också hänsyn till den uppskattade osäkerheten i fosterfraktion. För efterföljande beräkningar används den naturliga logaritmen för förhållandet. Assay Software bedömer LLR-värdet för varje målkromosom och varje prov för att ge ett fastställande om aneuploidi.

När varje batch skapas måste du ange provtyp (enkelembryo eller tvilling), screeningtyp (grundläggande eller hela genomet) och huruvida rapportering av könskromosomer (Ja, Nej och SCA) önskas för varje prov. Tillsammans fastställer dessa alternativ vilken information som rapporteras för varje prov.

För alla provtyper avgör screeningtypen vilka autosomala avvikelser som rapporteras. För den grundläggande screeningtypen rapporteras endast trisomi för hela kromosom 13, 18 och 21. För screening av hela genomet rapporteras fullständig eller partiell deletion eller duplikation för alla autosomer. Längden på den minsta rapporterbara partiella deletionen eller duplikationen av en kromosom är 7 Mb.

Det går att avaktivera rapportering av könskromosomer för prover från enkelembryon. Du kan även konfigurera systemet så att aneuploidier av könskromosomer rapporteras antingen med eller utan rapportering av kön för euploida prover.

Om Yes (Ja) har valts för rapportering av könskromosomer för tvillingprover, så rapporteras endast förekomst eller frånvaro av en Y-kromosom i biblioteket. Aneuploidi av könskromosom kan inte rapporteras för tvillingprover.

Resultatet ANOMALY DETECTED (AVVIKELSE DETEKTERAD) innebär att provet testats positivt för en eller flera avvikelser med avseende på vald screeningtyp och inställt alternativ för rapportering av könskromosomer. När en avvikelse detekterats innehåller rapporten en beskrivning av avvikelsen med allmänt vedertagna cytogenetiska beteckningar.

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

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

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

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

**FÖRSIKTIGHET!**

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

Prestandaegenskaper

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

	NextSeq 500/550	NextSeq 550Dx
Programvara i instrumentet	NextSeq control software 4.0	NextSeq Operating Software 1.3
Reagenssatsversion	NextSeq 500/550 High Output v2.5 (75 cycle) Reagent Kit	NextSeq 550Dx High Output v2.5 (75 cycle) Reagent Kit
Sekvenseringsmetod	2 x 36 paired-end-sekvenseringskörningar i högeffektsläge	2 x 36 paired-end-sekvenseringskörningar i högeffektsläge

Klinisk studie

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

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

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

Befolkningsstatistik och graviditetsegenskaper

Moderns ålder, fosterålder och graviditetstrimester summeras i [Tabell 7](#) för proverna i screeningen av hela genom, inklusive kända mosaicismprover. Majoriteten (98 %) av testproverna representerar graviditet i första trimestern.

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

Tabell 7 Befolkningsstatistik och graviditetsegenskaper

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

* De slutliga proverna som presenterades innehöll sju tvillingpar.

Kliniska prestanda

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

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

Mosaicism definieras som förekomsten av två eller flera cellinjer med olika kromosomsammansättning hos en individ. Cellinjerna kommer från samma zygot. Typ och nivå på mosaicism varierar och beror på tidpunkten för mosaicismrelaterade händelser under embryogenes och fosterutveckling. Olika typer av mosaicism förekommer i prenatala diagnoser beroende på fördelningen av onormala kontra normala cellinjer över cytotrofoblast, mesenkym eller foster.¹⁰ Även om mosaicism kan observeras med alla kromosomavvikelser, är förekomsten av mosaicism i sällsynta trisomier högre än i trisomierna för kromosom 21, 18 och 13 (T21, T18 och T13).¹¹ I prestandautvärderingen inkluderades fall av mosaicism i analys av hela genom, eftersom syftet med denna screeningtyp för den här analysen är att detektera sällsynta autosomala aneuploidier (RAA).

Prestanda för grundläggande screening

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

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

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

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

Prestanda för screening av hela genom

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

Prestanda för screening av hela genom för eventuella avvikelser

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

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

Prestanda för screening av hela genom för sällsynt autosomal aneuploidi

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

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

Prestanda för screening av hela genom för partiella deletioner och duplikationer

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

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

Skillnader i resultat mellan grundläggande screening och screening av hela genom

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

Det finns två skillnader mellan resultatrapporteringen för grundläggande screening och screening av hela genom. För det första inkluderas prover med känd mosaicism både för vanliga trisomier, RAA och partiella deletioner och duplikationer i resultatvärden vid screening av hela genom. För det andra går det att välja att

rapportera detektionen av en partiell deletion eller duplikation framför en fullständig trisomi vid screening av hela genom. Förekomsten av en fullständig trisomi utöver en partiell deletion eller duplikation kan visas genom att hänvisa till LLR-värdet i den kompletterande rapporten.

Inkludering av mosaicism vid screening av hela genom

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

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

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

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

När screening av hela genom används, i fall där både en hel kromosomhändelse samt en CNV-händelse inom samma kromosom överskrider LLR-tröskeln, rapporterar systemet i första hand partiella deletioner eller duplikationer, och inte hela kromosombestämningen, om storleken på den partiella deletionen eller duplikationen täcker cirka 75 % eller mindre av den kromosom där den detekterade avvikelserna finns. Om regionen för den partiella deletionen eller duplikationen är större än 75 % av kromosomens storlek rapporteras händelsen som fullständig trisomi eller monosomi av hela kromosomen om även LLR-tröskelvärdet för hela kromosomen överskrider. Därför kan ansenligt stora deletioner och duplikationer som är mindre än eller lika med 75 % av kromosomens storlek tyda på aneuploidi av hela kromosomen.

För alla prover finns LLR-värdet för klassificering av hela kromosomer i den kompletterande rapporten. LLR-värdet bör granskas med hänsyn till den cutoff som anges i [95 % sannolikhet för detektion för genomsnittliga regioner efter storlek för VeriSeq NIPT Solution v2 på sidan 56](#) innan resultatet tolkas. Till exempel, en CNV-bestämning där LLR-värdena på kromosomnivå överskrider cutoff ger ytterligare stöd för en tolkning som överensstämmer med aneuploidi av hela kromosomen. Se [Tabell 12](#).

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

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

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

Se programhandboken för VeriSeq NIPT Solution v2 (dokumentnr 1000000067940) för mer information om de kriterier för kvalitetskontroll som används för att rapportera aneuploidiresultat.

Könskromosomer

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

Tabell 13 Konkordans för könsklassificering av foster*

Detekterad	Karyotyp	Fenotyp enligt fysisk undersökning av nyfödd		Cytogenetiska resultat							
		Kvinnlig	Manlig	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY	Annat**	Saknas
Avvikelse ej detekterad	XX	997	0	21	0	2	0	0	0	0	0
Avvikelse ej detekterad	XY	0	966	0	15	0	0	0	0	0	1
Avvikelse detekterad	XO	0	0	0	0	19	0	0	1	0	0
Avvikelse detekterad	XXX	0	0	0	0	0	17	0	0	1	0
Avvikelse detekterad	XXY	0	0	0	0	0	0	23	0	1	0
Avvikelse detekterad	XYY	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0

Könsklassificering av foster		Fenotyp enligt fysisk undersökning av nyfödd		Cytogenetiska resultat							
Detekterad	Karyo- typ	Kvinnlig	Manlig	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY	Annat**	Saknas
Totalt		997	966	21	15	21	17	23	12	2	1
Konkordans (%)		100	100	100	100	90,5	100	100	91,7	Ej tillämpligt	Ej tillämpligt

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

** Andra cytogenetiska resultat var XXXXX och XYY.

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

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

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

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

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

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

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

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

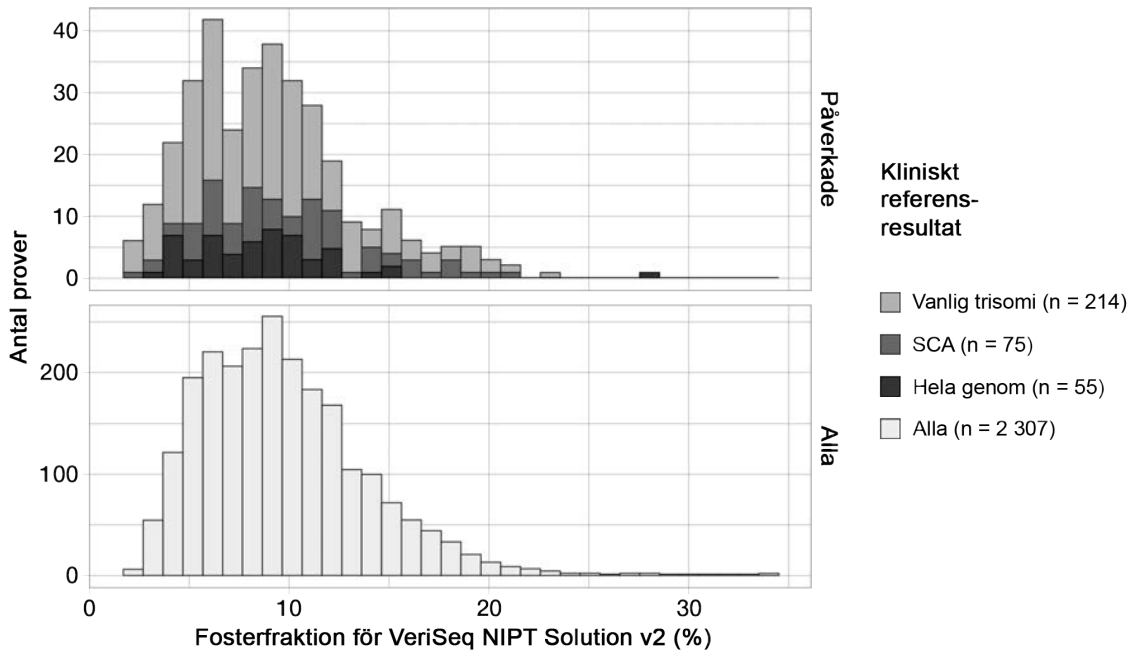
Tabell 17 Prevalens för alla avvikelser, PPV och NPV i screening av hela genom (inklusive kända fall av mosaicism)

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

Fördelning av fosterfraktion

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

Bild 1 Fördelning av fosterfraktion



Fem prover hade avvikelser i flera kategorier.

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

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

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

Prestanda vid tvillinggraviditeter

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

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

viktat genomsnitt som representerade deras prevalens i den avsedda användningspopulationen togs (två par tvåäggstvillingar, ett par enäggstvillingar) för att uppskatta sensitiviteten. För specificitet simulerades uppsättningar med opåverkade tvillingar.

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

- För enäggstvillingar angavs den påverkade fraktionen för varje prov till 1,0 eftersom trisomi i det här fallet påverkar båda tvillingarna.
- För tvåäggstvillingar antogs det att endast en tvilling var påverkad (att båda tvåäggstvillingarna skulle påverkas är extremt sällsynt). De påverkade fraktionsvärdena simulerades med hjälp av den kända spridningen av fosterfraktionskvoten med utgångspunkt i kliniska tvillingprover av olika kön. En konservativ infallsvinkel antogs där man förutsatte att den drabbade tvillingen alltid hade den lägsta fosterfraktionen av de två tvillingarna. En korrektionsfaktor tillämpades för att fosterfraktioner i genomsnitt är lägre vid graviditeter med trisomi 13 och 18.
- För opåverkade tvillingar angavs den påverkade fraktionen för varje prov till noll.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Analysprestanda

Precision

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tabell 20 Sammanfattning av svarsprecision vid sekvensering på samma laboratorium

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

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

Ytterligare en studie utfördes för att jämföra sekvenseringsprecisionen (total standardavvikelse) för VeriSeq NIPT Solution v2 med hjälp av version 2.0 av en flödescell, jämfört med version 2.5. Studien omfattade två typer av flödesceller (v2.0 och v2.5), tre partier av sekvenseringsatts, fyra instrumentsystem och två sekvenseringskörningar per kombination i totalt 48 körningar på ett och samma laboratorium. En sekvenseringsuppsättning beredd från cfDNA-plattor som hade förberetts manuellt. Provpanelen inkluderade fyra replikat av uppsättningen med 5 % fosterfraktion T21-påverkade prover och 20 replikat av

uppsättningen med 10 % fosterfraktion maternellt/manligt (XY-foster) cfDNA. Resultaten från studien presenteras i [Tabell 21](#) och visar att det inte finns någon skillnad i sekvenseringsprecision vid användning av flödescell v2.0 jämfört med flödescell v2.5.

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

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

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

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

Korskontaminering

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

Potentiellt störande ämnen

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

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

Tabell 22 Potentiellt störande ämnen (endogena)

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

Även naturligt förekommande maternellt genomiskt DNA (gDNA) i plasman kan potentiellt störa analysens resultat, då det kan extraheras tillsammans med fetalt cfDNA. Genomiska DNA-nivåer på 1,6, 3,3 och 4,9 ng per prov (motsvarar 1, 2 och 3 standardavvikelser över genomsnittlig förväntad gDNA-koncentration efter sju

dagars lagring av helblod¹²⁾ tillsattes till cfDNA som extraherats från maternell plasma från opåverkade graviditeter med kvinnligt foster (XX). Proven testades sedan i VeriSeq NIPT Solution (n = 16 för varje koncentration). Ingen påverkan av analysens resultat iaktogs i samband med förhöjda nivåer av gDNA.

Tjugo läkemedelsbaserade potentiellt störande ämnen (exogena) som vanligen används eller ordineras under graviditet testades enligt EP7-A2 (Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline-Second Edition (Interferenstest i klinisk kemi, godkänd riktlinje – Andra utgåvan)). De 20 potentiellt störande ämnena kombinerades i fyra uppsättningar, tillsattes till maternell plasma från opåverkade graviditeter med kvinnligt foster (XX) och testades i VeriSeq NIPT Solution (N = 16 för varje uppsättning). Ingen påverkan av analysens resultat iaktogs i samband med dessa exogena ämnen.

Tabell 23 Potentiellt störande ämnen (exogena)

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

Detekteringsgräns

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

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

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

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

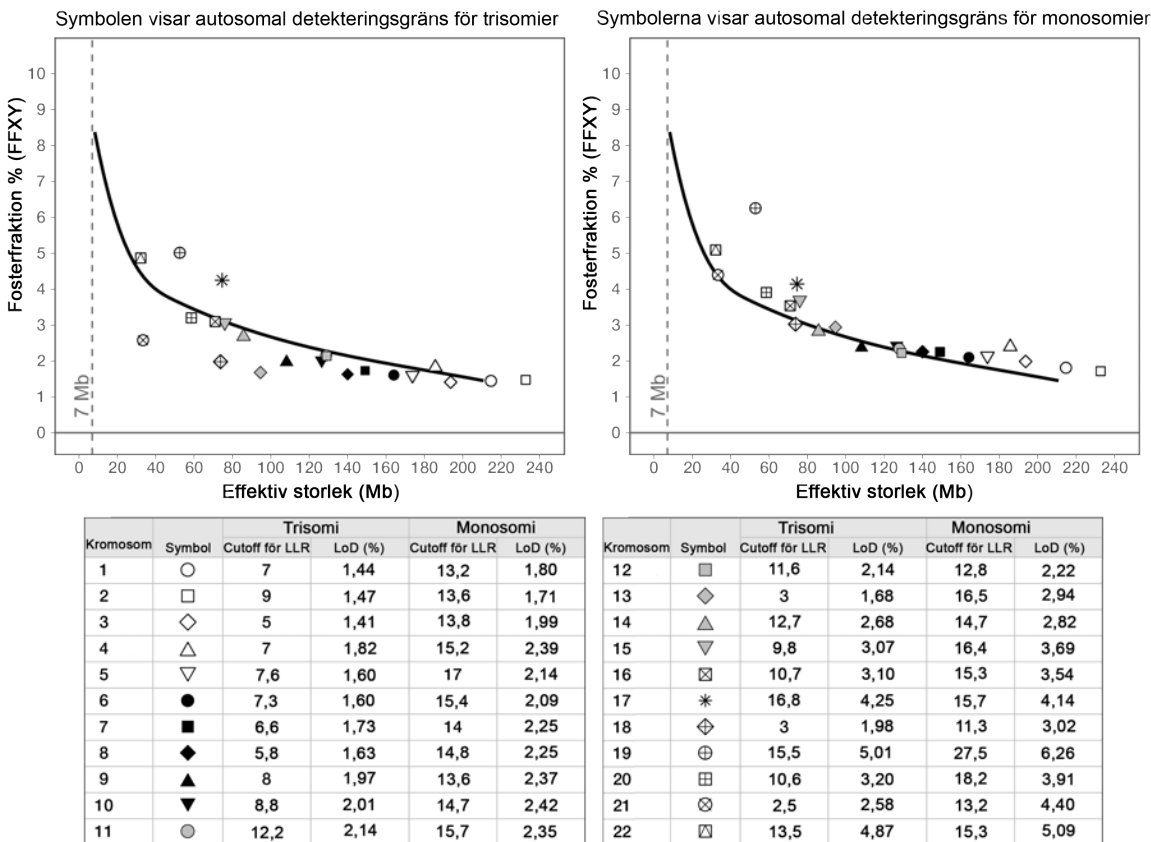
För att fastställa LoD för T21 analyserades prover som innehöll blandningar av T21-provuppsättningar och uppsättningar med opåverkade prover. De två analyttyperna blandades i en titreringsserie för att skapa en uppsättning med sju nivåer av fosterfraktion (0, 2, 3, 4, 5, 6 och 10 %). Varje nivå representerades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

För att ytterligare öka upplösningen på fosterfraktionsrutnätet för LoD-analysen har data från denna studie förstärkts med data som erhållits från en in silico-spädning. Effekterna av experimentell spädning och titrering simulerades genom kontrollerad blandning av sekvenseringsdata. Data från denna in silico-titrering omfattade en uppsättning med 14 nivåer av fosterfraktion (1,25; 1,50; 1,75; 2,00; 2,25; 2,50; 2,75; 3,00; 3,25; 3,50; 3,75; 4,00; 4,25 och 4,50 %) med 32 replikat för varje nivå. En probitanalys utfördes på resulterande data för att fastställa LoD för T21.

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

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

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



Felsökning

Felsökning för VeriSeq NIPT Solution v2

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

Fel	Möjligt resultat	Tolkning	Rekommenderad åtgärd	Kommentarer
Igensatt prov eller trögt flöde	Kontaminerad plasma	Enskilda prover kan sätta igen bindningsplattan om plasmaprovet är starkt kontaminerat.	Inspektera provet. Om plasman i röret är röd eller mjölkfärgad ska provet avbrytas och omtagning begäras. Om provet ser normalt ut ska det oanalyseras.	
	Överflödning	Den visuella inspektionen av varje rör som ska fastställa provets lämplighet var otillräcklig.	Ogiltigförklara eventuella prover i närliggande brunnar som påverkas av överflödet.	Kan tyda på att prover transporterades eller förvarades felaktigt före bearbetning. Uteslut olämpliga prover från bearbetningen.
	Maskinvarufel	Otillräcklig spjälkning av material under extraktion.	Oanalysera provet. Om problemet kvarstår för en plattbrunn med andra prover ska du kontakta Illuminas tekniska support.	

Fel	Möjligt resultat	Tolkning	Rekommenderad åtgärd	Kommentarer
QC-fel vid analys av ett enskilt prov	QC-fel vid sekvensering	Möjliga orsaker är följande: <ul style="list-style-type: none"> Otillräcklig mängd genetiskt material Överföringsfel vid hantering av prov Fel på sekvenseringsreagens 	Kontrollera provets kommentarer. Kontrollera om det har förekommit liknande resultat för tidigare prover med liknande plattposition. Oanalysera provet.	Resultatet indikerar antingen att provets mängd är otillräcklig eller att det förekommer överföringsfel på ML STAR. Otillräckligt mängd genetiskt material kan bero på otillräckligt cfDNA i plasman eller på att cfDNA orsakar att provet för sekvensering blir för utspätt.
	Lågt FF eller antal icke-exkluderade positioner (NES)	Otillräckliga data har genererats för korrekt rapportering.	Oanalys av plasma.	

Fel	Möjligt resultat	Tolkning	Rekommenderad åtgärd	Kommentarer
QC-fel vid kvantifiering	Underkänd kvantifiering. Batchens medelvärde är under minimivärdet	Otillräckligt utbyte vid bearbetning.	Upprepa kvantifieringen. Om det andra försöket underkänns ska du kontakta Illuminas tekniska support.	Att standardkurvans mått inte uppnås är ett tecken på problem med biblioteksberedningen (dvs. användning av etanol av icke biologisk kvalitet) eller problem med kvantifieringsprocessen.
	Underkänd kvantifiering	Överensstämmer inte med standardkurvan.	Upprepa kvantifieringen. Om det andra försöket underkänns ska du kontakta Illuminas tekniska support.	
Uppsättningsfel	Uppsättningsprocessen slutförs inte	Uppsättningsanalysen kan inte beräkna korrekta uppsättningsvolymmer.	Omvärdera måluppsättningens koncentration. Upprepa uppsättningsanalysen.	

Felsökning av VeriSeq NIPT Microlab STAR

Processteg	Felkod	Felmeddelande	Beskrivning	Användaråtgärd
Batch skapas	EM0044	Angivet batch-ID innehåller förbjudna tecken.	VeriSeq NIPT Solution v2 accepterar endast siffror, bokstäver, understreck och bindestreck i alla datafält.	Döp om batchen med ett namn som inte innehåller specialtecken.
Batch skapas	EM0051	Angivet batch-ID har fler än 36 tecken.	VeriSeq NIPT Solution v2 begränsar batchnamnens längd till högst 36 tecken.	Döp om batchen med ett namn som har färre än 36 tecken.
Batch skapas	EM0076	Det går inte att ansluta till VeriSeq Onsite Server v2.	VeriSeq Onsite Server v2 svarar inte på dataförfrågningar från Workflow Manager.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Kontrollera att ML STAR är ansluten till nätverket. 2. Kontrollera att VeriSeq Onsite Server v2 är på. 3. Kontrollera att ML STAR kan ansluta till VeriSeq Onsite Server v2 (ping-begäran). 4. Kontrollera vakuumavfallsflaskan. Töm avfallsflaskan om den är mer än halvfull. 5. Kontakta Illuminas tekniska support om föregående steg inte löser problemet.
Batch skapas	EM0118	Batchen har misslyckats och kan inte bearbetas vidare.	Den angivna batchen har redan misslyckats och kan inte bearbetas ytterligare.	Batchprotokollet på VeriSeq Onsite Server v2 visar att den valda batchen har misslyckats. Ingen vidare bearbetning är tillåten. Skapa en annan batch med önskade prover.

Processteg	Felkod	Felmeddelande	Beskrivning	Användaråtgärd
Batch skapas	Ej tillämpligt	Batchen har redan slutfört bearbetningsprocessen. Vill du köra om uppsättningen?	Den angivna batchen har bearbetats i uppsättningen. Den enda tillåtna bearbetningen är att köra om uppsättningen.	Kör om uppsättningen enligt följande. <ul style="list-style-type: none"> • Välj Re-Pool (Kör om). • Avbryt metoden och kontrollera att batchnamnet är korrekt innan du kör om uppsättningen.
Isolering av plasma	WP0087	Dubletter av provstreckkoder har lästs in.	Prover med identiska streckkoder har lästs in i systemet.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Följ uppmaningarna i Workflow Manager för att identifiera vilka prover som är dubletter. 2. Ta bort dubletterna och märk antingen om dem eller ersätt dem. 3. Läs in proven igen.
Isolering av plasma	EP0102	Prover som angavs på provarket lästes inte in.	Prover som var med på provarket var inte med bland de inlästa streckkoderna.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Följ uppmaningarna i Workflow Manager för att identifiera vilka prover som saknas. 2. Välj ett av följande alternativ: <ul style="list-style-type: none"> • Lägg till de saknade proverna till batchen och läs in proverna igen. • Avbryt metoden och redigera provarket vid behov. Starta om metoden.
Inläsning av platta	Ej tillämpligt	Venus-streckkodsmaskfel.	Workflow Manager upprätthåller rätt samband mellan platta och batch med Venus-streckkodsmasker.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Kontrollera plattans position för att bekräfta att plattlayouten är korrekt. 2. Kontrollera att platta som lästs in är rätt platta för den angivna batchen.

Processteg	Felkod	Felmeddelande	Beskrivning	Användaråtgärd
cfDNA-extraktion	WE0150	Trycket i vakuumkammaren är för lågt.	Workflow Manager går inte vidare om det vilande vakuumledningstrycket är < 400 torr.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Kontrollera om det förkommer veck eller andra hinder i vakuumledningen. 2. Öppna avfallsledningens tryckklämmor för att frigöra trycket och stäng dem sedan helt. 3. Kontrollera att vakuumstyrenheten och -pumpen är påslagna. 4. Kontakta Illuminas tekniska support om problemet kvarstår.
cfDNA-extraktion	WE0153	Trycket i vakuumkammaren är för högt.	Det kan vara fel på systemet om det uppmätta vakuumtrycket är för högt före start av tryckregleringen.	Kontrollera att alla vakuumanslutningar och -ledningar sitter fast ordentligt på styrenhetens baksida.

Processteg	Felkod	Felmeddelande	Beskrivning	Användaråtgärd
cfDNA-extraktion	WE0996	Det gick inte att försegla vakuumet.	Förseglingsfelet måste åtgärdas innan du kan gå vidare.	<p>Kontrollera att förseglingsfelet är åtgärdat innan du väljer OK.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Kontrollera att bindningsplattan ligger an mot vakuumgrenröret. Använd en behandskad hand för att trycka ned bindningsplattan med hårt tryck. 2. Lyssna efter vakuumets brummande ljud och iaktta flödet av vatten genom bindningsplattan. 3. Öppna vakuumpårningen i Workflow Manager. När den faktiska tryckavläsningen är minst 50 tryckenheter mindre än omgivningsavläsningen väljer du OK för att fortsätta med cfDNA-extraktionen. 4. Välj OK för att fortsätta med den första lyseringslösningen om den önskade tryckavläsningen inte uppnås under den tilldelade tiden. 5. Pausa metoden efter att lyseringslösningen har fördelats på bindningsplattan. Sätt tillbaka bindningsplattan och tryck ned den med hårt tryck. 6. Kontakta Illuminas tekniska support om lyseringslösningen inte flödar genom plattan.

Processteg	Felkod	Felmeddelande	Beskrivning	Användaråtgärd
cfDNA-extraktion	WM0219	Starta om pumpen manuellt om vakuumet är påslaget.	Vakuumet kan fortsätta vara påslaget efter att en metod har avbrutits under extraktion.	1. Tryck på strömbrytaren på vakuumstyrenheten för att stänga av vakuumet. 2. Vänta i tio sekunder och tryck sedan på strömbrytaren igen för att slå på vakuumet.
cfDNA-extraktion	EE0477	Ett fel inträffade när plattan flyttades. (iSWAP-fel)	Om ett iSWAP-fel uppstår (tappad platta, plattan gick inte att lyfta osv.) kommer systemet att uppmana dig att slutföra förflyttningen av plattan manuellt.	Kontrollera att plattan fortfarande kan användas (att inget material har spillts). <ul style="list-style-type: none"> • Avbryt körningen om plattan inte kan användas. • Om plattan kan användas ska du följa anvisningarna för att flytta plattan manuellt.
cfDNA-extraktion	EE0519	Den skannade streckkoden matchar inte den streckkod som angivits för bindningsplattan.	Den inlästa bindningsplattan matchar inte streckkoden på den platta som tagits bort.	Kontrollera att platta som läses in matchar den angivna streckkoden (se spårningsloggen för den förväntade streckkoden).

Processteg	Felkod	Felmeddelande	Beskrivning	Användaråtgärd
API	EA0372	Det går inte att ansluta till dataservern.	VeriSeq Onsite Server v2 svarar inte på dataförfrågningar från Workflow Manager.	1. Kontrollera att ML STAR är ansluten till nätverket. 2. Kontrollera att VeriSeq Onsite Server v2 är på. 3. Kontrollera att ML STAR kan ansluta till VeriSeq Onsite Server v2 (ping-begäran).
	EA0774	Anslutningsfel. Det gick inte att validera API:ns serveranslutning.	VeriSeq Onsite Server v2 har slutat svara på dataförfrågningar från Workflow Manager.	Kontrollera att: 1. Kontrollera att ML STAR är ansluten till nätverket. 2. Kontrollera att ML STAR kan ansluta till VeriSeq Onsite Server v2 (ping-begäran). 3. Kontrollera att VeriSeq Onsite Server v2 är på.
	EA0780	403: Ogiltig begäran Den aktuella transaktionen är ogiltig.	Data som skickas bryter systemets arbetsflödeslogik.	Mer information finns i felinformationen. Vanliga orsaker är indata som tar för lång tid att överföra eller bryter mot listan över godkända tecken.

Referenser

1. Nagaoka S, Hassold T, Hunt P. Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nat Rev Genet*. 2012;13(7):493-504. doi:10.1038/nrg3245.
2. 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 aneuploidi. *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.

Revisionshistorik

Dokument	Datum	Ändringsbeskrivning
Dokumentnr 1000000078751 v08	Augusti 2022	Artikelnummer för arbetsflödet har uppdaterats. Anvisningar för att blanda genom att pipettera om biblioteksplattan har varit frusen har tagits bort.
Dokumentnr 1000000078751 v07	Maj 2022	Avsnittet Begränsningar har delats upp. De två första punkterna finns i Rapportering med VeriSeq NIPT Solution v2. Resten av texten finns i Begränsningar. Har tagits bort: <ul style="list-style-type: none">• "VeriSeq" från alla reagensetiketter.• Anvisningar för att fästa en plattstreckkod på VeriSeq NIPT Adapter Plate i avsnittet Förbereda bibliotek. Har lagts till: <ul style="list-style-type: none">• Ordet "certifierat" till "DNase-/RNase-fritt vatten".• Information om mikroplattläsare (eller motsvarande), SpectraMax M2, M3, M4 och M5, samt en kommentar.• Information i avsnittet VeriSeq NIPT Microlab STAR för att förklara hur en felhanteringshändelse ska hanteras.• En uppmaning om att inspektera brunnarna visuellt.• Anvisningar för batcher med 24 och 48 prover i protokollavsnitten.• Anvisningar för när den lila adapterplattan eller motsvarande ska användas.• Text i avsnittet Befolkningsstatistik och graviditetsegenskaper för att inkludera graviditetsresultat från första trimestern.• En punkt i specifikationerna för Deepwell-plattor för att inkludera att plattan ska vara stabil. Har uppdaterats:

Dokument	Datum	Ändringsbeskrivning
		<ul style="list-style-type: none">• Texten om unika batchnamn för att förtydliga och inkludera ett exempel.• Symboler och formatering för Obs!, Försiktighet! och Varning!.• Resultaten för underpunkterna för tester.• "Guanidintiocyanat" har ändrats till "guanidinhydroklorid".• "CVS" har ändrats till "BVS".• Texten om att använda screening av hela genom och LLR-värden.• Specifikationer: Specifikationer för reagensbehållare, deepwell-plattor, plattor med 384 brunnar, plattor med 96 brunnar.
Dokumentnr 1000000078751 v06	Augusti 2021	Adressen till den auktoriserade europeiska representanten har uppdaterats.

Dokument	Datum	Ändringsbeskrivning
Dokumentnr 1000000078751 v05	December 2020	<p>Avsnitten "Grundläggande principer", "Varningar och försiktighetsåtgärder" och "Märkning av produkter" har uppdaterats med ytterligare information för att uppfylla föreskrifter.</p> <p>Mindre uppdateringar har gjorts i innehållet i protokollet för att matcha Illuminas nuvarande stil och struktur.</p> <p>Beskrivningen i avsnittet "Analysprestanda" (underavsnittet "Precision") av kromosom 21 som "den näst minsta autosomen hos människan" har ändrats till "den minsta autosomen hos människan".</p> <p>Skyddsangivelser har lagts till i avsnitten "Isolera plasma" (underavsnittet "Förberedning") och "Tolkning av resultat", angående felaktig användning av behållare och risken för att prover blandas.</p> <p>Nya artikelnummer har lagts till för den nya servermodellen och uppdaterad programvara.</p> <p>Skyddsangivelser har lagts till i protokoll- och felsökningsinformationen för att uppmärksamma och förhindra att prover flödar över.</p> <p>De aktiva ingredienserna i reagenset DNA Quantification Standard (Standard DNA-kvantifiering) i tillbehörssatsen uppdaterades för att stämma överens med säkerhetsdatabladet.</p> <p>Namngivningskonventionen för Local Run Manager VeriSeq NIPT Module uppdaterades för att stämma överens med annan dokumentation.</p> <p>Revisionshistorik lades till.</p>
Dokumentnr 1000000078751 v04	Oktober 2020	Mindre korrigeringar.
Dokumentnr 1000000078751 v03	September 2020	Listan över material uppdaterades för att visa specifikationer för laboratorieutrustning tillsammans med kända kompatibla alternativ.

Dokument	Datum	Ändringsbeskrivning
Dokumentnr 1000000078751 v02	Februari 2020	<p>Presentationen av information i avsnittet "Klinisk prestanda" uppdaterades för att bättre förmedla skillnaderna mellan screeningtyperna basic (grundläggande) och genomwide (hela genom).</p> <p>Det nya avsnittet "Skillnader i resultat mellan grundläggande screening och screening av hela genom" lades till.</p> <p>Motsägelsefull information angående om den kompletterande rapporten är valfri eller ej har tagits bort från avsnittet "Grundläggande principer".</p> <p>Namngivningskonventionen för programmet VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 har uppdaterats i hela dokumentet för att vara konsekvent.</p> <p>Adresserna till den australiska sponsorn och Illumina Netherlands har uppdaterats för att återspegla de senaste ändringarna.</p>
Dokumentnr 1000000078751 v01	Augusti 2019	Ett duplicerat steg i avsnittet i Extrahera cfDNA, som orsakat av felaktig publiceringsprogramvara, har tagits bort.
Dokumentnr 1000000078751 v00	Maj 2019	Första utgåvan.

Patent och varumärken

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

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

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

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

© 2022 Illumina, Inc. Med ensamrätt.

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

Kontaktinformation



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



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

Australisk sponsor

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

Märkning av produkter

En fullständig lista över symbolerna på produktens förpackning och etiketter finns i symbolförklaringen på support.illumina.com, under fliken *Documentation* (Dokumentation) för respektive produkt.

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