

**BEMÆRK!**

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

Kvalitetskontrol

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

**BEMÆRK!**

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

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

Brugervejledning

Tips og teknikker

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

Påsætning af strekkoder på plader

- Strekkoder til plader med fuldt skørt starter med PL.
- Strekkoder til dybbørndsplader starter med DW.
- Sæt strekkodeme på siden af plademe med fuldt skørt og dybbørndsplademe ved siden af kolonne 12.
- Anbring plademe med strekkodeme mod højre for at muliggøre den automatiserede scanning.

Påføring og fjernelse af forsegling på pladen

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

VeriSeq NIPT Microlab STAR

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

Der bliver automatisk genereret resultater vedrørende fostrets kønskromosomale status, som også kan rapporteres, hvis det ønskes (valgfrit). Hvis der ikke bliver detekteret nogen kønskromosomal aneuploidi, vil rapporten angive NO ANEUPLOIDY DETECTED (INGEN ANEUPLOIDI DETEKTERET) med vedhæftning af kønsklassifikationen: XX (prøven viser drengefoster) eller XY (prøven viser pigefoster). Kønskromosomale aneuploidier bliver rapporteret som ANEUPLOIDY DETECTED (ANEUPLOIDI DETEKTERET) med vedhæftning af den aneuploidi, der er blevet detekteret: XXX, XXY, XYY eller XO (monosomi X). I sjældne tilfælde falder de kønskromosomale værdier uden for det rapporterbare interval, og systemet genererer så resultatet SEX CHROMOSOMES NOT REPORTABLE (IKKE-RAPPORTERBARE KØNSKROMOSOMER). Det kan stadig rapporteres resultater vedrørende autosomal aneuploidi for disse prøver.

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

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

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

Ydelsesegenskaber

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

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

Klinisk studie

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

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

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

Demografi og graviditetskarakteristika

Moderens alder, etnicitet, gestationsalder og graviditetstrimester er opsummeret i [Tabel 7](#).

Tabel 7 Demografi og graviditetskarakteristika

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

^a Dette forsøg blev udført i USA.
^b Rapporteret som "ukendt".

Klinisk ydeevne ved enkeltbarnsgraviditeter

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

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

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

Tabel 8 Krydstabulering af trisomi 21-resultater

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

^a Den kliniske referencestandard blev fastsat ved hjælp af cytogenetisk test eller nyfødtundersøgelse.

Tabel 9 Krydstabulering af trisomi 18-resultater

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

^a Den kliniske referencestandard blev fastsat ved hjælp af cytogenetisk test eller nyfødtundersøgelse.

Tabel 10 Krydstabulering af trisomi 13-resultater

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

^a Den kliniske referencestandard blev fastsat ved hjælp af cytogenetisk test eller nyfødtundersøgelse.

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

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

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

^a CI (konfidensinterval) er udregnet med Wilsons metode.

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

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

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

*CI er udregnet ved Wilsons metode.

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

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

*CI er udregnet ved Wilsons metode.

Detektion af kønskromosomale aneuploidier

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

Tabel 14 Procentvis konkordans vedrørende føtal kønsskikning

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

^a 1 prøve blev 49,XXXXY-klassificeret af VeriSeq NIPT Solution som "kunne ikke rapportere kønskromosomer"

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

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

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

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

NPV = negativ prædiktiv værdi, PPV = positiv prædiktiv værdi

Ydeevne ved tvillingegeaviditeter

Klinisk ydeevne

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

Estimering af ydeevne med trisomi 21, 18 og 13

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

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

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

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

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

Såvel den samlede føtale fraktion som den berørte fraktion for hver simuleret prøve blev derefter anvendt til at beregne antallet af tilfælde af aneuploidi ved hjælp af standardalgoritmen for VeriSeq NIPT Solution.

Sensitiviteten blev beregnet ved at fastlægge, hvor ofte antallet af tilfælde af aneuploidi blandt de simulerede berørte tvillinger var over den tilsvarende grænseværdi for aneuploidi. Tilsvarende blev specificiteten beregnet ved at fastlægge, hvor ofte antallet af tilfælde af aneuploidi blandt de simulerede ikke-berørte tvillinger var under den tilsvarende grænseværdi for aneuploidi (Tabel 16). 95 % konfidensintervaller blev estimeret ud fra antallet af ægte kliniske tvillingeprovér i det oprindelige datasæt, der blev klassificeret som enten berørte eller ikke-berørte af den relevante trisomi.

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

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

*CI er udregnet ved Wilsons metode

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

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

Analytisk ydeevne

Præcision

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

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

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

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

Tabel 17 Reproducerbarhed og intralaboratoriel præcision (samlede data)

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

Krydskontaminering

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

Potentielt interfererende stoffer

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

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

Tabel 18 Potentielt interfererende stoffer (endogene)

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

Naturligt forekommende maternelt genomisk DNA (gDNA) i plasma kan potentielt også interferere med analysens ydeevne, da det kan blive ekstraheret sammen med det føtale cfDNA. Niveauer af genomiske DNA på 1,6, 3,3, og 4,9 ng pr. prøve (svarende til 1, 2 og 3 standardafvigelse over den gennemsnitlige forventede gDNA-koncentration efter 7 dages opbevaring af helblod¹³) blev føjet til cfDNA ekstraheret fra maternel plasma fra graviditeter med ikke-afficerede hunkøn (XX-fostre). Prøverne blev så testet i VeriSeq NIPT Solution (n=16 for hver koncentration). Der blev ikke observeret nogen interferens på analysens ydeevne ved forekomst af forhøjede niveauer af gDNA.

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

Tabel 19 Potentielt interfererende stoffer (eksogene)

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

Fejlfinding

Fejlfinding på VeriSeq NIPT Solution

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

Fejltilstand	Muligt resultat	Fortolkning	Anbefalet handling	Kommentarer
Prøvetilstopning/ langsomt flow	Plasmakontaminering	Individuelle prøver kan tilstoppe bindingspladen, hvis der er signifikant kontaminering i plasmaprøven	Kontrollér prøven. Hvis resterende plasma i røret er rødt eller mælkeagtigt, skal du annullere prøven og anmode om en ny udtrækning. Hvis prøven ser normal ud, skal du teste den igen	
	Hardwarefejl	Utilstrækkelig optagelse af materiale i forbindelse med ekstraktion	Test prøven igen. Kontakt Illuminas tekniske support, hvis problemet i brøndplaceringen fortsætter med andre prøver.	
Mislykket QC af individuel prøveanalyse	Mislykket QC af sekventering	Utilstrækkeligt genetisk input ELLER forkert overførsel i forbindelse med prøvehåndtering	Se prøvekommentarer. Se, om der har været lignende resultater i forbindelse med tidligere prøver i den pågældende pladeposition. Test prøven igen.	Er enten tegn på dårligt prøveinput eller forkert overførsel på ML STAR. Utilstrækkeligt genetisk materiale kan skyldes utilstrækkeligt cellefrit DNA i plasma eller cellebaseret DNA, hvilket resulterer i overfortynding af sekventeringsprøven.
	Lav FF eller NES-tælling	Der er ikke genereret tilstrækkelige data til at lave en præcis rapportering	Test igen fra plasma.	
Mislykket QC af kvantificering	Mislykket kvantificeringskørsel – Batchmedian under minimum	Utilstrækkeligt procesudbytte	Gentag kvantificering. Kontakt Illuminas tekniske support, hvis den gentagne kvantificering også mislykkes.	Vellykkede standardkurvemålinger tyder på problemer med biblioteks-klargøringen.
	Mislykket kvantificeringskørsel.	Standardkurvefejl på grund af dårlig kvantificering	Gentag kvantificering. Kontakt Illuminas tekniske support, hvis den gentagne kvantificering også mislykkes.	
Mislykket puljeoprettelse	Puljeoprettelsen kunne ikke gennemføres	Puljeoprettelsesanalysen kan ikke beregne korrekte puljevoluminer	Revurder puljens målkonzentration, og kør puljeanalysen igen.	

Fejlfinding på VeriSeq NIPT Microlab STAR

Procestrin	Fejlkode	Fejlbesked	Beskrivelse	Brugerløsning
Batchoprettelse	EM0044	The Batch ID entered contains forbidden characters. (Det indtastede batch-ID indeholder forbudte tegn).	VeriSeq NIP Solution tillader kun tal, bogstaver, understregningstegn og bindestreger i alle datafelter.	Omdøb batchen til et navn, der ikke indeholder nogen specialtegn.
Batchoprettelse	EM0051	The Batch ID is greater than 26 characters in length. (Batch-ID'et indeholder mere end 26 tegn).	VeriSeq NIPT Solution begrænser længden af batchnavne til 26 tegn eller derunder.	Omdøb batchen til et navn, der indeholder færre end 26 tegn.
Batchoprettelse	EM0076	Unable to connect to VeriSeq Onsite Server (Der kunne ikke oprettes forbindelse til VeriSeq Onsite Server)	VeriSeq Onsite Server responderer ikke på dataanmodninger fra Workflow Manager.	Kontrollér, at: 1. ML STAR er forbundet til netværket. 2. VeriSeq Onsite Server er tændt. 3. ML STAR kan forbinde til VeriSeq Onsite Server (via ping-anmodning). 4. Send en e-mail til Illuminas tekniske support, hvis ovennævnte trin ikke løser problemet.
Batchoprettelse	EM0118	This batch has been failed and cannot be further processed. (Batchen er blevet ugyldiggjort og kan ikke viderebehandles).	Den angivne batch er allerede blevet ugyldiggjort og kan ikke viderebehandles.	Batchregistret på VeriSeq Onsite Server viser, at den valgte batch er blevet ugyldiggjort. Viderebehandling er ikke tilladt. Opret en anden batch med de ønskede prøver.
Batchoprettelse	I/T	This batch has already completed processing. Would you like to repool? (Denne batch er allerede færdigbehandlet. Vil du oprette en ny pool?)	Den angivne batch er blevet bearbejdet på puljeoprettelsestrinnet. Den eneste tilladte behandling er oprettelse af en ny pulje.	Klik på Re-Pool for at oprette en ny pulje. ELLER Afbryd metoden, og dobbelttjek batchnavnet.
Plasmaisolering	WP0087	Duplicate sample barcodes loaded. (Der er overført prøver med allerede anvendte strekkoder.)	Der er overført prøver med identiske strekkoder til systemet.	1. Følg beskederne i Workflow Manager for at identificere hvilke prøver, der har strekkoder, der allerede er blevet anvendt. 2. Fjern disse prøver, og giv dem nye strekkoder eller erstat dem. 3. Overfør prøverne påny.
Plasmaisolering	EP0102	Samples specified in the Sample Sheet were not loaded. (Manglende overførsel af prøver på prøvearket).	Der er prøver på prøvearket, som ikke er inkluderet i de overførte strekkoder.	1. Følg beskederne i Workflow Manager for at identificere de manglende prøver. 2. Tilføj de manglende prøver til batchen, og overfør prøverne igen ELLER Afbryd metoden, rediger prøvearket efter behov, genstart metoden.

Procestrin	Fejlkode	Fejlbesked	Beskrivelse	Brugerløsning
Pladeoverførsel	I/T	Venus Barcode Mask Error (Venus-stregkodemaskefejl)	Workflow Manager gennemtvinger korrekt plade-til-batch-associering ved brug af Venus-stregkodemaske.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Kontrollér pladens placering for at sikre, at plade-layoutet er korrekt. 2. Kontrollér, at den overførte plade er den korrekte plade til den angivne batch.
cfDNA-ekstraktion	WE0150	Pressure in the vacuum chamber is too low. (Trykket i vakuumkammeret er for lavt.)	Workflow Manager fortsætter ikke, hvis det hvilende tryk i vakuumledningen er < 400 torr.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Kontrollér vakuumledningen for bøjninger eller anden blokering. 2. Åbn affaldsledningens frigøringsclips, så trykket frigøres, luk frigøringsclipsen helt til. 3. Kontrollér, at vakuumkontrolenheden og pumpen er tændt. 4. Kontakt Illuminas tekniske support, hvis problemet fortsætter.
	WE0153	Pressure in the vacuum chamber is too high. (Trykket i vakuumkammeret er for højt)	Hvis det målte vakuumtryk er for højt, inden trykkontrollen starter, kan systemet være fejlbehæftet.	Kontrollér, at alle vakuumforbindelser og ledninger er på plads på bagsiden af kontrolenheden.
	WE0996	Vacuum failed to seal. (Vakuumsforsegling mislykkedes).	Systemet skaber ikke vakuumsforsegling på bindingspladen.	<p>BENMÆRK! Vælg ikke OK, før forseglingsfejlen er helt rettet.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Kontrollér, at bindingspladen er ret mod vakuumfordelingsstykket. Tryk kraftigt ned på bindingspladen med en handskeklædt hånd. 2. Klik på OK for at fortsætte med cfDNA-ekstraktion. 3. Send en e-mail til Illuminas tekniske support, hvis denne fejlbesked bliver vist mere end tre gange i løbet af en kørsel.
	WM0219	If Vacuum is on, manually rest the pump. (Deaktiver pumpen manuelt, hvis vakuum er tændt).	Vakuummet kan fortsætte med at være tændt efter en metodeafbrydelse i løbet af ekstraktionen.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tryk på tænd-/slukknappen på vakuumkontrolenheden for at slukke vakuummet. 2. Vent 10 sekunder, og tryk så på tænd-/slukknappen igen for at tænde for vakuummet.
	EE0477	An error has occurred while moving a plate. (iSWAP error) (Der opstod en fejl i forbindelse med flytning af en plade (iSWAP-fejl))	Hvis der opstår en iSWAP-fejl (tab af plade, manglende opsamling osv.) giver systemet brugeren besked om, at færdiggøre flytningen af pladen manuelt.	Kontrollér, at pladen kan anvendes igen (intet materialespild). <ul style="list-style-type: none"> – I modsat fald skal du afbryde kørslen. – I så fald skal du følge de anviste vejledninger for at færdiggøre overførslen af pladen.

Procestrin	Fejlkode	Fejlbesked	Beskrivelse	Brugerløsning
	EE0519	Scanned barcode does not match binding plate barcode on record. (Den scannede strekkode stemmer ikke overens med bindingspladens strekkode i registret.)	Den overførte bindingsplade stemmer ikke overens med strekkoden på den fjernede plade.	Kontrollér, at den plade, der overføres, stemmer overens med den registrerede strekkode (se den forventede strekkode i sporningslogfilen).
API	EA0372	Unable to connect to the data server. (Der kunne ikke oprettes forbindelse til dataserveren.)	VeriSeq Onsite Server responderer ikke på dataanmodninger fra Workflow Manager.	Kontrollér, at: 1. ML STAR er forbundet til netværket. 2. ML STAR kan forbinde til VeriSeq Onsite Server (via ping-anmodning). 3. VeriSeq Onsite Server er tændt.
	EA0774	Connection Error The API server connection failed to validate. (Forbindelsesfejl. Forbindelsen til API-serveren kunne ikke bekræftes.)	VeriSeq Onsite Server er stoppet med at respondere på dataanmodninger fra Workflow Manager.	Kontrollér, at: 1. ML STAR er forbundet til netværket. 2. ML STAR kan forbinde til VeriSeq Onsite Server (via ping-anmodning). 3. VeriSeq Onsite Server er tændt.
	EA0780	403: Invalid Request The current transaction is not valid. (403: Ugyldig anmodning Den aktuelle transaktion er ikke gyldig.)	De sendte data overholder ikke systemets arbejdsproceslogik.	Du finder yderligere information i fejloplysningerne. Årsagen er ofte, at inputtet er for langt eller ikke overholder de gyldige tegn.

Referencer

- 1 Nagaoka S, Hassold T, Hunt P. Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nat Rev Genet.* 2012;13(7):493-504. doi:10.1038/nrg3245.
- 2 Gamder RJ, Sutherland GR, Schaffer LG. *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling.* 4th edition. New York (NY): Oxford University Press; 2012.
- 3 Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, Ogilvie C, D'Antonio F. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015 Jan;45(1):16-26. doi: 10.1002/uog.14636.
- 4 ACOG Practice Bulletin #163.
- 5 Gil M M, Quezada M S, Revello R, Akolekar R, and Nicolaidis K H (2015), Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 45: 249–266. doi:10.1002/uog.14791
- 6 Benn P, Borrell A, Chiu RW, et al. "Position statement from the Chromosome Abnormality Screening Committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis." *Prenat Diagn* 35 (2015): 725-34.
- 7 2. ACOG Committee on Genetics. "Committee Opinion No. 640: Cell-Free DNA Screening For Fetal Aneuploidy." *Obstet Gynecol* 126 (2015): e31-7.
- 8 Bianchi D, Parker R, Wentworth J et al. DNA Sequencing versus Standard Prenatal Aneuploidy Screening. *N Engl J Med.* 2014;370(9):799-808. doi:10.1056/nejmoa1311037.
- 9 McCullough RM, Almasri EA, Guan X, et al. Non-invasive prenatal chromosomal aneuploidy testing – clinical experience: 100 000 clinical samples. *PLoS One.* 2014; 9(10):e109173.
- 10 Norton ME, Brar H, Weiss J, et al. Non-Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18. *J Obstet Gynecol.* 2012;207:137.e1-8.

- 11 Norton ME, Jacobsson B, Swamy GK, et al. Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy. *New Engl J Med.* 2015; 372(17):1589-97.
- 12 Ryan A, Hunkapiller N, Banjevic M, et al. Validation of an enhanced version of a single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal test for detection of fetal aneuploidies. *Fetal Diagn Ther.* 2016;doi:10.1159/000442931.
- 13 Norton S, Lechner J, Williams T, Fernando M et al. A Stabilizing Reagent Prevents Cell-free DNA Contamination by Cellular DNA in Plasma During Blood Sample Storage and Shipping as Determined by Digital PCR. *Clin. Lab. Biochem.* 2013;46: 1561–1565. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2013.06.002.

Patenter og varemærker

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

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

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

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

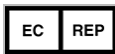
© 2019 Illumina, Inc. Alle rettigheder forbeholdes.

Alle varemærker tilhører Illumina, Inc. eller de respektive ejere. Specifikke varemærkeoplysninger er tilgængelige på www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktoplysninger



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



Illumina Cambridge Limited
Chesterford Research Park, Little Chesterford
Saffron Walden, CB10 1XL
STORBRIITANNIEN

Australsk sponsor
Illumina Australia
1 International Court
Scoresby, Victoria, 3179
Australien

Produktmærkning

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