

## Fylgiseðill

TIL NOTKUNAR VIÐ GREININGU IN VITRO.

## Tilætluð notkun

VeriSeq™ NIPT Solution útgáfa 2 er *in vitro* greiningarpróf sem ætlað er til notkunar sem skimunarpróf til að greina erfðafræðileg frávik í öllu erfðamengi fóstura með mælingu á heilblóðsýnum úr útæðum þungaðra kvenna sem gengnar eru að minnsta kosti 10 vikur. VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 notast við raðgreiningu á öllu erfðamenginu til að finna hlutatvöfaldanir og -úrfellingar í öllum A-litningum og mislitnunarstöðu fyrir alla litninga. Prófið býður upp á möguleikann að greint sé frá mislitnun á kynlitningum (SCA, sex chromosome aneuploidy). Ekki má nota þessa vöru sem eina grundvöll greiningar eða annarra ákvarðana sem tengjast meðgöngunni.

VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 inniheldur: VeriSeq NIPT Workflow Manager útgáfa 2 fyrir VeriSeq NIPT Microlab STAR, Sett fyrir sýnaundirbúning VeriSeq NIPT og VeriSeq Onsite Server útgáfa 2 ásamt VeriSeq NIPT Assay Software útgáfa 2. VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 er ætlað til notkunar með háhraðaraðgreiningartæki.

## Samantekt um og útskýring á prófinu

Litningafrávik hjá fósturum, sér í lagi mislitnum, sem er óeðlilegur fjöldi litninga, eru algeng orsök ófrjósemi, meðfæddra frávika, þroskaskerðingar og þroskahömlunar. Um það bil 1 af hverjum 300 lifandi fæddum börnum eru með mislitnun og tíðni fósturláts og andvana fæðingar er mun hærri meðal fóstura með mislitnun.<sup>1,2</sup> Þar til nýlega hafa verið til tvenns konar próf fyrir þessum kvillum hjá fósturum: greiningarpróf og skimun. Greiningarpróf sem eru ífarandi eins og legvatnsástungur eða sýnatökur úr æðabelgstotu. Þessar prófunaraðferðir teljast besta aðferðin til að greina mislitnun hjá fósturum. Hins vegar eru tengsl milli þeirra og hættu á fósturláti á bilinu 0,11% til 0,22%.<sup>3</sup> Hefðbundnum skimunum á fleiri en einu erfðamarki fylgir engin hættu á fósturláti þar sem þær eru ekki ífarandi en þær eru ekki eins nákvæmar og greiningarpróf. Greiningartíðni fyrir þrístæðu 21 er á bilinu 69–96% eftir því um hvaða skimun er notuð, aldri móður og meðgöngulengd við prófun.<sup>4</sup> Það skiptir sköpum að tíðni falskra jákvæðra niðurstaðna sé um það bil 5% en það getur leitt til ífarandi greiningarprófa ef það þarf að staðfesta niðurstöðuna og því hættu á fósturláti í tengslum við aðgerðina.<sup>4</sup> Skimanir með ómskoðun geta einnig greint litningafrávik en þær eru enn ónákvæmari en hinar aðferðirnar.

Hægt er að greina mislitnun hjá fósturum í litningum 21, 18, 13, X og Y af mikilli nákvæmni með fósturprófunumprófum sem eru ekki ífarandi (NIPT, noninvasive prenatal testing) þar sem notast er við erfðamengisraðgreiningu á frumlausu DNA (cfDNA) sem fæst úr plasma móður sem gengin er 10 vikur eða lengur. Nýleg safngreining á mörgum klínískum rannsóknum greindi frá veginni samanlagðri greiningartíðni og sértæki fyrir þrístæðu 21 og þrístæðu 18 í einburameðgöngum sem hér segir: þrístæða 21 annars vegar 99,7% og hins vegar 99,96% og þrístæðu 18 annars vegar 97,9% og hins vegar 99,96%.<sup>5</sup> Ein rannsókn bendir til þess að notkun NIPT sem aðalskimunar á öllum meðgöngum gæti leitt til 89% fækkunar á fjölda ífarandi aðgerða til staðfestingar.<sup>6</sup>

Í ljósi þess að tíðni falskra jákvæðra niðurstaðna hefur lækkað verulega hjá NIPT samanborið við hefðbundna skimun á fleiri en einu erfðamarki, hafa fjölmargar heilbrigðisstofnanir gefið út álit þar sem mælt er með notkun NIPT við nokkrum ábendingum.

Sér í lagi mæla International Society for Prenatal Diagnosis, American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) / Society for Maternal Fetal Medicine (SMFM, American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) og European Society of Human Genetics / American Society of Human Genetics með að bjóða öllum þunguðum konum NIPT.<sup>7,8,9</sup> Mælt er með ráðgjöf fyrir próf, upplýstu samþykki og greiningarprófum til að staðfesta jákvæða niðurstöðu úr skimun á cfDNA.<sup>4</sup>

VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 er in vitro greiningarpróf (IVD, in vitro diagnostic) sem er ekki ífarandi og notast við raðgreiningu á öllu erfðaefni í cfDNA-brotum sem fengin eru úr útlægum blóðsýnum móður úr þunguðum konum sem gengnar eru að minnsta kosti 10 vikur. Prófið býður upp á tvenns konar skimun: grunnskimun og skimun á heildarerfðamenginu. Grunnskimunin veitir aðeins upplýsingar um stöðu mislitnunarstöðu litninga 21, 18, 13, X og Y. Skimanir á heildarerfðamenginu veita upplýsingar um hlutatvöfaldanir og -úrfellingar fyrir alla A-litninga og mislitnunarstöðu fyrir alla litninga. Báðar tegundir skimunar bjóða upp að greina frá mislitnunarstöðu kynlitninga (SCA, sex chromosome aneuploidy) ásamt því að greina frá kyni fósturs eða ekki. Það er hægt að slökkva á möguleikanum að greina frá SCA. Ef slökkt er á möguleikanum að greina frá SCA er ekki heldur greint frá kyni fósturs. Nánari upplýsingar um möguleika á að greina frá kyni fósturs er að finna í *Leiðarvísir fyrir hugbúnað VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 (skjal númer 1000000067940)*.

## Meginreglur um ferli

VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 er sjálfvirk lausn fyrir NIPT-prófanir á rannsóknarstofum sem samanstendur af sjálfvirkum sýnaundirbúningi og greiningu raðgreiningargagna. Sett fyrir sýnaundirbúning VeriSeq NIPT eru sérhæfð einnota prófefni sem notuð eru ásamt VeriSeq NIPT Microlab STAR til að undirbúa runur með 24, 48 eða 96 sýnum fyrir háhraðaraðgreiningu. Endapöruð raðgreiningargögn um allt erfðamengið eru greind með sérhæfðum hugbúnaði, sem heitir VeriSeq NIPT Assay Software útgáfa 2, og skýrsla með eiginlegum niðurstöðum er búin til.

Í verkflæðinu felast eftirfarandi ferli: sýnataka, einangrun plasma, útdráttur cfDNA, undirbúningur safns, magngreining safns, samnýting safna, raðgreining og greining sem lýst er nánar:

- **Sample Collection** (Sýnataka) – 7–10 ml af útlægu heilblóði móður er safnað í Streck frumulaust DNA-blóðsöfnunarrör (BCT, Blood Collection Tube), sem kemur í veg fyrir frumurof og erfðamengun og heldur heilblóðinu stöðugu.
- **Plasma Isolation** (Einangrun plasma) – Innan 5 daga frá söfnun er plasma einangrað úr útlægu heilblóði móður með hefðbundinni skilvindu. VeriSeq NIPT Microlab STAR sagnar upp og dreifir plasma í plötu með 96 djúpbrunnum fyrir síðari vinnslu. Komi til þess að endurtaka þurfi prófunina má setja lok aftur á sýnin eftir vinnslu og geyma þau við 4°C í 5 daga til viðbótar (allt að 10 daga eftir blóðtöku).



### VARÚÐ

Það getur haft neikvæð áhrif á tíðni þess að raðgreining einstakra sýna takist ekki að geyma þau lengur.

- **cfDNA Extraction** (cfDNA-útdráttur) – Hreinsun cfDNA úr plasma næst með aðsogi á bindiplötu, með því að þvo mengunarefni af bindiplötunni og útlosun.
- **Library Preparation** (Undirbúningur safns) – Hreinsuð cfDNA-brot gangast undir endaviðgerðarferli til að breyta 5' og 3' yfirhengjum í sljóa enda. Næst er deoxýadenosín kirni bætt við 3' endana til að mynda eins basa yfirhengi. Vísasettir breytar sem hafa eins basa 3, deoxýtýmíðín yfirhengi er síðan skeytt við unnu cfDNA-brotin. Samskeytta DNA-ið er hreinsað með því að nota öfugar festiperlur í föstum fasa. Hvert sýni í mengi af 24, 48 eða 96 sýnum fær einkvæman vísasettan breyti. Breytarnir þjóna tvennum tilgangi:

**VARÚÐ**

Gætið ítrustu varúðar til að forðast krossmengun vísanna en það getur leitt til rangra niðurstaðna.

- Vísarnir gera kleift að auðkenna sýni við síðari raðgreiningu.
- Vísabreytar innihalda raðir sem gera kleift að taka upp söfn á föstu yfirborði flæðiflögunnar til raðgreiningar til að mynda klasa og til síðari raðgreiningar.
- **Quantification** (Mangngreining) – Afurð safnsins er mangngreind með flúrljómandi litarefni þar sem þéttin ræðst af samanburði við DNA-staðalkúrfu.
- **Library Pooling and Sequencing** (Samnýting safna og raðgreining) – Sýnasöfnin eru sett saman í samsöfn með 24 eða 48 sýnum í magni sem er fínstillt til að lágmarka breytileika í þekju. Hvert samsöfn er síðan raðgreint með kerfi til háhraðaraðgreiningar.
- VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 felur ekki í sér raðgreiningarbúnað og rekstrarvörur.
- **Analysis** (Greining) – Fyrir hvert sýni samanstandur greiningin af eftirfarandi:
  - Auðkenning safnbrotanna með vísaröð og samræmingu paraðra endalestra við viðmiðunarerfðamengi manna.
  - Mat á hlutfalli safnsins frá fóstri með því að sameina upplýsingar úr dreifingu bæði lengda og hnita safnbrotanna innan erfðamengisins.
  - Að teknu tilliti til þekktra skekkja greinir tölfræðilegt líkan svæði innan genmengisins sem eru van- eða offramsett í safninu á þann hátt sem samræmist fráviki á áætluðu stigi hlutfalls frá fóstri.
  - Í NIPT-skýrslunni er samantekt á niðurstöðum fyrir valda prófunarvalmynd þar sem ANOMALY DETECTED (FRÁVIK FANNST) eða NO ANOMALY DETECTED (EKKERT FRÁVIK FANNST) er skráð ásamt mati á hlutfalli erfðaefnis frá fóstri fyrir sýni sem standast gæðaeftirlit.
  - Í viðbótarskýrslunni má finna megindleg mæligildi sem lýsa hverju fráviki sem fannst.

# Takmarkanir aðgerðarinnar

## Takmarkanir prófunarinnar

- Vísbendingar sem styðja við næmi og sértæki prófsins ná yfir einbura- og tvíburapunganir. Þessar notkunarleiðbeiningar veita ekki upplýsingar um næmi eða sértæki við fjölburaþungun með þremur eða fleiri fósturum.
- VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 er ekki ætlað til að greina fjöllitnun, svo sem þrílitnun.
- VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 er ekki ætlað til að greina litningaumröðun í jafnvægi (e. balanced chromosome rearrangements).
- Prófunin krefst heilblóðsýna úr útæðum frá móður hjá þunguðum konum sem eru að minnsta kosti gengnar 10 vikur.
- Við grunnskimanir leitar VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 prófið að sértækum litningafrávikum. Niðurstöður sem tilkynntar eru sem „NO ANOMALY DETECTED“ (EKKERT FRÁVIK GREINDIST) útiloka ekki möguleikann á litningafrávikum í þeim litningunum sem prófaðir voru. Neikvæð niðurstaða útilokar ekki möguleikann á því að þungunin feli í sér önnur litningafrávik, erfðasjúkdóma eða fæðingargalla (t.d. opinn galli í taugapípu).
- Við skimanir á heildarerfðamengi geta stórar úrfellingar og tvöfaldanir sem eru undir 75% af stærð litningsins verið vísbendingar um mislitnun á heilum litningi.
- Ákveðin svæði eru útilokuð frá greiningu fyrir skimanir á heildarerfðamengi. Listi yfir slík bannsvæði er aðgengilegur á vefsvæði þjónustudeildar Illumina. Greining erfðafrávika fer aðeins fram á svæðum sem ekki eru útilokuð.
- Það er ekki í boði að tilgreina kyn fósturs á öllum svæðum vegna staðbundinna reglugerða sem gilda um slíkt.
- Samkvæmt fræðilegum gögnum geta ákveðnir þættir hjá móður og fóstri haft áhrif á niðurstöður skimunar á frumlausu DNA. Sumir þeirra eru taldir upp hér að neðan, en takmarkast ekki við eftirfarandi:
  - Móðir hefur nýlega fengið blóðgjöf.
  - Fyrri líffæraígræðsla móður / stofnfrumuígræðsla
  - Sjálfsofnæmissjúkdómur móður
  - Æxli hjá móður (góðkynja og illkynja)
  - Tíglun hjá móður
  - Breytingar á eintakafjölda hjá móður
  - Fóstur- og fylgjutíglun / afmörkuð fylgjutíglun
  - Fósturlát / tvíburi sem hverfur

## Skýrslugerð í VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2

- VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 er skimunarpróf og má ekki nota það eitt og sér án tillits til annarra klínískra niðurstaðna og prófniðurstaðna. Ályktanir um ástand fósturs og ákvarðanir um meðgöngu skulu ekki eingöngu byggjast á niðurstöðum NIPT-skimunar.<sup>7</sup>
- VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 býr til skýrslur um eftirfarandi:
  - Grunnskimun prófar fyrir yfirtjáningu (e. overrepresentation) litninga 13, 18 og 21.
  - Skimanir á heildar erfðamengi sem prófa undir- og yfirtjáningu allra A-litninga, þar á meðal úrfellingar og tvöfaldanir að hluta sem eru að minnsta kosti 7 Mb.
  - Í einburapungunum þar sem „Yes“ (já) eða „SCA“ (mislitnun á kynlitningi) er valið sem valkostur fyrir greiningu kyns, koma eftirfarandi kynlitningafrávik fram: XO, XXX, XXY og XYY.
  - Í einburapungunum þar sem „Yes“ (já) er valið sem valkostur fyrir greiningu kyns, kemur kyn fósturs fram.
  - Y-litningur í tvíburapungun.

## Íhlutir vöru

VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 samanstendur af eftirfarandi sýnaundirbúningi:

- Sett fyrir sýnaundirbúning VeriSeq NIPT (24 sýni) (hlutnúmer 20025895)
- Sett fyrir sýnaundirbúning VeriSeq NIPT (48 sýni) (hlutnúmer 15066801)
- Sett fyrir sýnaundirbúning VeriSeq NIPT (96 sýni) (hlutnúmer 15066802)

VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 samanstendur af eftirfarandi hugbúnaðaríhlutum:

- VeriSeq NIPT Assay Software útgáfa 2 (hlutnúmer 20047024), fyrirfram uppsett á VeriSeq Onsite Server útgáfa 2.
  - VeriSeq Onsite Server útgáfa 2 (hlutnúmer 20028403, 20047000, 20101927) eða núverandi VeriSeq Onsite Server (hlutnúmer 15076164 eða 20016240) sem er uppfært í útgáfu 2.
- VeriSeq NIPT Workflow Manager útgáfa 2 (hlutnúmer 20044988), fyrirfram uppsett á VeriSeq NIPT Microlab STAR.
  - VeriSeq NIPT Microlab STAR (hlutnúmer Hamilton Company Reno: 95475-01 (115) V) & 95475-02 (230 V), Hamilton Company Bonaduz: 806288).
- Local Run Manager VeriSeq NIPT-eining (hlutnúmer 20044989)

## Prófefni

### Prófefni sem fylgja

Illumina afhendir eftirfarandi prófefni: Sett fyrir sýnaundirbúning VeriSeq NIPT (24 sýni) (hlutnúmer 20025895), Sett fyrir sýnaundirbúning VeriSeq NIPT (48 sýni) (hlutnúmer 15066801) og Sett fyrir sýnaundirbúning VeriSeq NIPT (96 sýni) (hlutnúmer 15066802). Sett fyrir sýnaundirbúning VeriSeq NIPT er fínstillt fyrir notkunar með VeriSeq NIPT Microlab STAR (ML STAR) (hlutnúmer 95475-01, 95475-02 eða 806288), sem er frá Hamilton Company.

### Sett fyrir sýnaundirbúning VeriSeq NIPT, útdráttarkassi

Tafla 1 VeriSeq NIPT Útdráttarkassi (24) og (48), hlutnúmer 20025869 og 15066803

Nafn prófefnis á merkimiða	Fjöldi íláta í setti	Virk innihaldsefni	Geymsla
Lysis Buffer	1	Gúaníðínhýdróklóríð í vatnsjafnalausn	15°C til 30°C
Wash Buffer I	1	Gúaníðínhýdróklóríð og 2-própanól í vatnsjafnalausn	15°C til 30°C
Wash Buffer II	1	Vatnsjafnalausnir sem innihalda sölt	15°C til 30°C
Elution Buffer	1	Vatnsjafnalausn	15°C til 30°C
Proteinase Buffer	1	Glýseról í vatnsjafnalausn	15°C til 30°C
Proteinase K	3	Frostþurrkað Proteinase K	15°C til 30°C

Tafla 2 VeriSeq NIPT Útdráttarkassi (96), hlutnúmer 15066807

Nafn prófefnis á merkimiða	Fjöldi íláta í setti	Virk innihaldsefni	Geymsla
Lysis Buffer	1	Gúaníðínhýdróklóríð í vatnsjafnalausn	15°C til 30°C
Wash Buffer I	1	Gúaníðínhýdróklóríð og 2-própanól í vatnsjafnalausn	15°C til 30°C
Wash Buffer II	2	Vatnsjafnalausnir sem innihalda sölt	15°C til 30°C

Nafn prófefnis á merkimiða	Fjöldi íláta í setti	Virk innihaldsefni	Geymsla
Elution Buffer	1	Vatnsjafnalausn	15°C til 30°C
Proteinase Buffer	1	Glýseról í vatnsjafnalausn	15°C til 30°C
Proteinase K	4	Frostþurrkað Proteinase K	15°C til 30°C

### Sett fyrir sýnaundirbúning VeriSeq NIPT undirbúningskassi safns

Tafla 3 VeriSeq NIPTsafn undirbúningskassi (24) og (48), hlutarnúmer 20026030 og 15066809

Nafn prófefnis á merkimiða	Fjöldi íláta í setti	Virk innihaldsefni	Geymsla
End Repair Mix	1	DNA polymerase og dNTP í vatnsjafnalausn	-25°C til -15°C
A-Tailing Mix	1	DNA polymerase og dATP í vatnsjafnalausn	-25°C til -15°C
Ligation Mix	1	DNA ligase í vatnsjafnalausn	-25°C til -15°C
Hybridization Buffer	1	Vatnsjafnalausn	-25°C til -15°C
NIPT DNA-breytiplata	1	Ólígónúkleótíð í vatnsjafnalausn	-25°C til -15°C

Tafla 4 VeriSeq NIPT Library Prep Box (96) hlutarnúmer 15066810

Heiti prófefnis á merkimiða	Fjöldi íláta í setti	Virk innihaldsefni	Geymsla
End Repair Mix	1	DNA polymerase og dNTP í vatnsjafnalausn	-25°C til -15°C
A-Tailing Mix	2	DNA polymerase og dATP í vatnsjafnalausn	-25°C til -15°C
Ligation Mix	2	DNA ligase í vatnsjafnalausn	-25°C til -15°C
Hybridization Buffer	1	Vatnsjafnalausn	-25°C til -15°C

Heiti prófefnis á merkimiða	Fjöldi íláta í setti	Virk innihaldsefni	Geymsla
NIPT DNA-breytiplata	1	Ólígónúkleótíð í vatnsjafnalausn	-25°C til -15°C

## Sett fyrir sýnaundirbúning VeriSeq NIPT aukahlutakassi

Tafla 5 VeriSeq NIPT aukahlutakassi, hlutnúmer 15066811

Nafn prófefnis á merkimiða	Fjöldi íláta í setti	Virk innihaldsefni	Geymsla
DNA-bindiplata	1	Örplata úr própýleni með breyttri sílikonhimnu	2°C til 8°C
Resuspension Buffer	1	Vatnsjafnalausn	2°C til 8°C
Sample Purification Beads	1	Meðseglandi perlur í föstu formi í vatnsjafnalausn.	2°C til 8°C
DNA-magngreiningarprófefni	1	DNA-innskotslitarefni í DMSO	2°C til 8°C
DNA-magngreiningarstaðall	1	dsDNA staðall, ósértækt DNA og natríumazíð í vatnsjafnalausn	2°C til 8°C

## Sett fyrir sýnaundirbúning VeriSeq NIPT, verkflæðisrör og merkimiðar

Tafla 6 Workflow Tubes and Labels, hlutnúmer 15071543

Vöruheiti á merkimiða	Fjöldi hluta í setti	Geymsla
Merki (LBL) – Strikamerki plötu	9	15°C til 30°C
Merki (LBL) – Strikamerki djúpbrunnspötu	12	15°C til 30°C
Rör (TB) – Tómt safnrör	5	15°C til 30°C

## Prófefni fylgja ekki með

### Nauðsynleg prófefni, fylgja ekki með

- Nauðsynleg prófefni fyrir raðgreiningu og rekstrarvörur fyrir háhraðaraðgreiningarkerfi (NGS, next-generation sequencing system)
- Vatn vottað án DNasa/RNasa – hentar fyrir sameindalíffræði
- Etanól, 100% (200 proof) – hentar fyrir sameindalíffræði



ATHUGASEMD Etanól, sem ekki hentar fyrir sameindalíffræði, getur hugsanlega haft neikvæð áhrif á virkni prófsins.

## Prófefni valfrjálst. Fylgir ekki með

- Fosfatjöfnuð saltvatnslausn Dulbecco (DPBS, Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) fyrir samanburð án sniðmáts (NTC, no template control)

## Geymsla og meðhöndlun

1. Stofuhiti er skilgreindur sem 15°C til 30°C.
2. Öll prófefni eru eingöngu einnota. Prófefni sem hafa verið undirbúin til notkunar á að nota strax.
3. Ef umbúðirnar eða innihald íhluta VeriSeq NIPT lausnarinnar skemmast eða er í hættu, hafið samband Illumina þjónusta við viðskiptavini.
4. Prófefni eru stöðug þegar þau eru geymd eins og tilgreint er þar til tilgreindur fyrningardagur rennur út á merkimiðum settsins. Sjá dálkinn Geymsla í töflunum í kaflanum [Prófefni](#) varðandi geymsluskilyrði. Ekki nota útrunnin prófefni.
5. Breytingar á útliti prófefnanna sem fylgja geta bent til niðurbrots efnanna. Ef breytingar verða á útliti (t.d. augljósar breytingar á lit prófefnisins eða skýjun sem virðist tilkomin vegna örverumengun) skaltu ekki nota prófefnin.
6. Við meðhöndlun Sample Purification Beads skaltu nota eftirfarandi besta verklag:
  - Aldrei frysta perlurnar.
  - Leyfðu perlunum að ná stofuhita áður en þær eru notaðar.
  - Rétt fyrir notkun skal hvirfilblanda perlunum þar til þær svífa aftur og liturinn verður einsleitur.
7. Lysis Buffer, Wash Buffer I, Wash Buffer II, Elution Buffer og Proteinase Buffer geta myndað sýnileg útfellingar eða kristalla. Fyrir notkun skaltu hvirfilblanda kröftuglega og síðan skoða til að ganga úr skugga um að engar útfellingar séu til staðar.
8. Frystu aldrei heilblóð eftir söfnun.
9. Raðgreindu söfn eins fljótt og auðið er eftir samnýtingu. Samsöfnuð söfn eru stöðug í allt að sjö daga við -25°C til -15°C. Ekki er þörf fyrir frekari eðlisbreytingu ef þau eru geymd í þennan tíma við þessar aðstæður.

## Búnaður og efni

### Nauðsynlegur búnaður og efni. Fylgir ekki með

#### Nauðsynlegur búnaður, fylgir ekki með

Búnaður	Birgir
Háhraðaraðgreiningarkerfi (NGS, next-generation sequencing) með eftirfarandi eiginleikum: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 x 36 bp endapöruð raðgreining</li> <li>• Samhæft við Sett fyrir sýnaundirbúning VeriSeq NIPT tvöfalda vísisbreyta</li> <li>• Sjálfvirk framleiðsla BCL-skráa</li> <li>• Tveggja rása efnafræði</li> <li>• 400 milljónir paraðra endalestra í hverri keyrslu</li> <li>• Samhæft við VeriSeq NIPT Assay Software útgáfa 2 eða NextSeq 550Dx raðgreiningarkerfi.</li> </ul>	Birgir tækja eða Illumina, hlutnúmer 20005715
Frystir, -25°C til -15°C	Almennur rannsóknarstofubirgir
Örskilvinda	Almennur rannsóknarstofubirgir
Pípettuaðstoð	Almennur rannsóknarstofubirgir
Ísskápur, 2°C til 8°C	Almennur rannsóknarstofubirgir
20 µl einrásarpípettur	Almennur rannsóknarstofubirgir
200 µl einrásarpípettur	Almennur rannsóknarstofubirgir
1.000 µl einrásarpípettur	Almennur rannsóknarstofubirgir
Hvirfilblandari	Almennur rannsóknarstofubirgir
Skilvinda og þyrilbúnaður fyrir blóðsöfnunarrör	

Búnaður	Birgir
<p>Jafngilt:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Kæld skilvinda sem er fær um 1600 × g með slökkt á bremsu</li> <li>Sveiflufötupyrill með fötum</li> <li>Fötuinnlegg með 76 mm lágmarksdýpt</li> <li>Innleggsbreytar til stuðnings við 16 mm x 100 mm blóðsöfnunarrör</li> </ul>	Almennur rannsóknarstofubirgir
<p>Mælt með:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Skilvinda úr vörulínunni Allegra X12R, 1.600 g</li> <li>Allegra Centrifuge GH-3.8 pyrrill með fötum</li> <li>Lok fyrir skilvindufötur frá Allegra, tvö í setti</li> <li>Breytibúnaður fyrir Allegra skilvindu, 16 mm, fjögur stykki í setti</li> </ul>	<p>Beckman Coulter, hlutnúmer 392304 (120 V eða 230 V)</p> <p>Beckman Coulter, hlutnúmer 369704</p> <p>Beckman Coulter, hlutnúmer 392805</p> <p>Beckman Coulter, hlutnúmer 359150</p>
Skilvindu- og pyrrillbúnaður fyrir örplötur	
<p>Jafngilt:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Skilvinda sem er fær um 5.600 × g</li> <li>Sveiflandi plötupyrill með höldurum ffyrir plötu með 96 brunnum, lágmarksdýpt 76,5 mm.</li> <li>Multifuge X4 Pro-MD 120 V TX-1000BT</li> <li>Sorvall Legend XTR skilvinda</li> </ul>	<p>Almennur rannsóknarstofubirgir</p> <p>Thermo Fisher Scientific númer 75016034</p> <p>Thermo Fisher Scientific, vörulistanúmer 75004521 (120 V) eða vörulistanúmer 75004520 (230 V)</p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>HIGHPlate 6000 örplötupyrill</li> <li>Pyrrill high plate 6000</li> </ul> <p>Stuðningsgrunnur fyrir örplötur</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Mælt með: <ul style="list-style-type: none"> <li>MicroAmp stuðningsgrunnur fyrir 96 brunna</li> <li>PCR-plötuhaldari fyrir 96 brunna</li> </ul> </li> </ul>	<p>Thermo Fisher Scientific vörulistanúmer 75003606</p> <p>Thermo Scientific VWR, vörulistanúmer 97040-244</p> <p>Thermo Fisher Scientific vörulistanúmer 4379590</p> <p>Thermo Fisher Scientific vörulistanúmer AB-0563/1000</p>
<p>Einn af eftirfarandi örplötulesurum, eða jafngildur, (flúrskímumælir) með SoftMax Pro útgáfa 6.2.2–7.1.2:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Gemini XPS</li> <li>SpectraMax M2, M3, M4 og M5. <ul style="list-style-type: none"> <li>Fjólublátt innlegg með örplötulesara til notkunar í verkflæði er nauðsynlegt.</li> </ul> </li> </ul>	<p>Molecular Devices, hlutnúmer XPS</p> <p>Molecular Devices, hlutnúmer M2, M3, M4 og M5</p>

Búnaður	Birgir
SpectraMax háhraða USB, raðbreytir	Molecular Devices, hlutnúmer 9000-0938
Hitahringrásarvél með eftirfarandi forskriftum: <ul style="list-style-type: none"> <li>Hitað lok</li> <li>Hitastig á bilinu 4°C til 98°C</li> <li>±2°C hitastignákvæmni</li> <li>Hitastigshækkun um að lágmarki 2°C á sekúndu</li> <li>Samhæft við PCR-plötu með heilhlíf frá Twin.tec með 96 brunnnum</li> </ul>	Almennur rannsóknarstofubirgir
VeriSeq NIPT Microlab STAR	Hamilton, hlutnúmer 95475-01 (115 V), hlutnúmer 95475-02 (230 V) eða hlutnúmer 806288 (hjá Hamilton Company Bonaduz)
VeriSeq Onsite Server útgáfa 2 eða uppfærður VeriSeq Onsite Server	Illumina, hlutnúmer 20028403 eða númer 20047000 (v2) eða númer 20101927, númer 15076164, eða númer 20016240 (uppfært)
Ef NextSeq 550Dx sequencing system er notað: <ul style="list-style-type: none"> <li>NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit útgáfa 2.5, 75 lotur</li> </ul>	Illumina, hlutnúmer 20028870

### Valfrjáls búnaður, fylgir ekki með

Búnaður	Birgir
Pluggo opnunarkerfi	LGP Consulting, hlutnúmer 4600 4450
SpectraMax SpectraTest FL1 staðfestingarplata fyrir flúrskimun	Molecular Devices, hlutnúmer 0200-5060
Röhrvolfir/-þyrill, 15 ml rör, 40 snúningar á mínútu, 100–240 V	Thermo Scientific, vörulistanúmer 88881001 (Bandaríkin) eða vörulistanúmer 88881002 (ESB)

### Nauðsynlegir hlutir, fylgja ekki með

Rekstrarvara	Birgir
1.000 µl leiðandi, ósmitsæfðir síuoddar	Hamilton, hlutnúmer 235905
300 µl leiðandi, ósmitsæfðir síuoddar	Hamilton, hlutnúmer 235903
50 µl leiðandi, ósmitsæfðir síuoddar	Hamilton, hlutnúmer 235948

Rekstrarvara	Birgir
<p>Djúpbrunnsgeymir samkvæmt eftirfarandi forskriftum:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• SLAS 1–2004 örplötusnið með 96 brunnum með pýramída- eða keilulaga botn og lágmarksrúmmál 240 ml.</li> <li>• Pólýprópýlen með áherslu á litla DNA-bindingu fyrir alla fleti sem komast í snertingu við sýni.</li> <li>• Innri víddir (vökvastig) samhæfast sjálfvirkum sog- og skömmtunarskrefum í VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Hæðarvíddir samhæfast sjálfvirkum hreyfingum VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> </ul>	<p>Almennur rannsóknarstofubirgir</p> <p>Samhæfðir geymar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Corning Axygen, vörunúmer RES-SW96-HP-SI</li> <li>• Agilent, vörunúmer 201246-100</li> </ul>
<p>Prófefnisílát með eftirfarandi forskriftum:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ílát sem passar tryggilega, en þarf ekki að þvinga í, inn í haldarann á VeriSeq NIPT Microlab STAR, hefur mjókkandi botn og lágmarksrúmmál 20 ml.</li> <li>• Pólýprópýlen sem er laust við RNasa/DNasa.</li> <li>• Innri víddir geymisins (vökvastig) mynda vökvastig með því að nota magn prófefna í prófinu sem samhæfast sjálfvirkum sog- og skömmtunarskrefum VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Hæðarvíddir samhæfast sjálfvirkum hreyfingum VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> </ul>	<p>Samhæfð ílát:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Illumina Reagent Tub, hlutnúmer 20095418</li> </ul>
<p>Djúpbrunnspötur samkvæmt eftirfarandi forskriftum:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• SLAS 1–2004, 3–2004 og 4–2004 örplötusnið með 96 brunnum með pýramída- eða keilulaga botn og lágmarksrúmmál brunns 2 ml.</li> <li>• Gegnsætt pólýprópýlen með áherslu á efni með litla DNA-bindingu fyrir alla fleti sem komast í snertingu við sýni.</li> <li>• Víddir brunnsins mynda vökvastig sem samhæfast sjálfvirkum sog- og skömmtunarskrefum í VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Plötuhlíf þar sem hægt er að staðsetja strikamerki plötunnar í nauðsynlega stöðu og þar sem hún nær að loða við slétt yfirborð.</li> <li>• Snúningsþolinn rammi sem þolir að lágmarki 5.600 × g.</li> <li>• Hæðarvíddir plötu samhæfast sjálfvirkum hreyfingum VeriSeq NIPT Microlab STAR</li> </ul>	<p>Almennur rannsóknarstofubirgir</p> <p>Samhæfðar plötur:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Eppendorf, hlutnúmer 0030505301</li> <li>• Eppendorf, hlutnúmer 30502302</li> <li>• USA Scientific, hlutnúmer 1896-2000</li> </ul>

Rekstrarvara	Birgir
<p>Plata með 384 brunnum samkvæmt eftirfarandi forskriftum:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Örplata með 384 brunnum, fínstillt fyrir lítið magn, með lágmarksrúmmál brunna 50 µl.</li> <li>• Svart ógegnsætt pólýstýren þar sem allir snertifletir við sýni útiloka ljós og hafa litla DNA-bindingu.</li> <li>• Víddir brunnsins mynda vökvastig sem samhæfist sjálfvirkum sog- og skömmunarskrefum í VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Hæðarvíddir plötu samhæfast sjálfvirkum hreyfingum VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Plötuhlíf þar sem hægt er að staðsetja strikamerki plötunnar í nauðsynlega stöðu og þar sem hún nær að loða við slétt yfirborð.</li> </ul>	<p>Almennur rannsóknarstofubirgir</p> <p>Samhæfðar plötur:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Corning, vörunúmer 3820</li> </ul>
<p>Plata með 96 brunnum samkvæmt eftirfarandi forskriftum:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Örplata með snúningsþolnum ramma sem polir að lágmarki 5.600 × g og 96 gegnsæir brunnar með mjókkandi botn, upphækkuðum brúnum og lágmarksrúmmál brunns 150 µl.</li> <li>• Pólýprópýlen sem er laust við RNasa/DNasa með litla DNA bindingu í öllum snertiflötum við sýni.</li> <li>• Víddir brunnsins mynda vökvastig sem samhæfist sjálfvirkum sog- og skömmunarskrefum í VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Hæðarvíddir plötu samhæfast sjálfvirkum hreyfingum VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> </ul> <p><b>ATHUGASEMD:</b> Ekki er víst að hægt sé skipt milli samhæfðra plastvara með mismunandi hlutnúmerum, til dæmis samhæfðar plötur með 96 brunna frá ólíkum framleiðendum, án þess að kerfið VeriSeq NIPT Microlab STAR sé sérstaklega kvarðað m.t.t. hlutarins af þjónustu- og stuðningsstarfsmönnum Illumina. Ef þú vilt skipta milli plastvara skaltu ráðfæra þig við stuðningsteymi Illumina.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Plötuhlíf þar sem hægt er að staðsetja strikamerki plötunnar í nauðsynlega stöðu og þar sem hún nær að loða við slétt yfirborð.</li> <li>• Samhæft við hitahringrásarvélar fyrir eðlisbreytingar.</li> </ul>	<p>Almennur rannsóknarstofubirgir</p> <p>Samhæfðar plötur:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Eppendorf, hlutnúmer 0030129512</li> <li>• Eppendorf, hlutnúmer 30129580</li> <li>• Eppendorf, hlutnúmer 30129598</li> <li>• Eppendorf, hlutnúmer 30129660</li> <li>• Eppendorf, hlutnúmer 30129679</li> <li>• Bio-Rad, hlutnúmer HSP9601</li> </ul>
<p>Eitt af eftirfarandi innsiglium:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Örpéttingarþynna „F“</li> <li>• Þynnuinnsigli</li> </ul>	<p>Bio-Rad, vörunúmer MSF1001 Beckman Coulter, hlutnúmer 538619</p>

Rekstrarvara	Birgir
Frumulaust DNA BCT CE	Streck, vörulistanúmer 218997
Lok til að ýta á	Sarstedt, pöntunarnúmer 65.802
2 ml rör með skrufloki	Almennur rannsóknarstofubirgir
20 µl síuoddar fyrir 20 µl pípettu	Almennur rannsóknarstofubirgir
200 µl síuoddar fyrir 200 µl pípettu	Almennur rannsóknarstofubirgir
1.000 µl síuoddar fyrir 1.000 µl pípettu	Almennur rannsóknarstofubirgir
Jafngilt:	Almennur rannsóknarstofubirgir
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fljótvirkandi sótthreinsandi úði sem inniheldur alkóhól</li> <li>• Lausn með sótthreinsandi hreinsiefni</li> </ul>	
Mælt með:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Afjónað vatn og 70% etanól</li> </ul>	

### Valfrjáls efni, fylgja ekki með

Rekstrarvara	Birgir
Fosfatjöfnuð saltvatnslausn Dulbecco (DPBS, Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) fyrir samanburð án sniðmáts (NTC, no template control)	Almennur rannsóknarstofubirgir
Rör, skruflok, 10 ml (eingöngu fyrir samanburðarsýni)	Sarstedt, pöntunarnúmer 60.551
Rör, skruflok, 50 ml	Almennur rannsóknarstofubirgir
25 ml sermifræðilegar pípettur	Almennur rannsóknarstofubirgir
10 ml sermifræðilegar pípettur	Almennur rannsóknarstofubirgir

## Sýnataka, flutningur og geymsla



### VARÚÐ

Meðhöndlaðu öll sýni eins og þau innihaldi hugsanlega smitbera.

- Heilblóðsýni, 7–10 ml, verða að vera tekin í Streck Cell-Free DNA BCT. Má ekki frysta.
- Flutningur á heilublóði verður að vera í samræmi við allar gildandi reglugerðir um flutning sýkla. Mælt er með hraðari sendingar-/flutningsaðferðum.
- Geymdu við hitastig á bilinu 4°C til 30°C meðan á flutningi stendur. Eftir að sýni hafa borist skal geyma þau við 2°C til 8°C þar til þau eru tilbúin til notkunar. Ekki ættu að líða meira en 5 dagar frá því að blóði er safnað að upphaflegri einangrunar plasma.

- Komi til þess að endurtaka þurfi prófunina má setja lok aftur á sýnin eftir vinnslu og geyma þau við 4°C í 5 daga til viðbótar (allt að 10 daga eftir blóðtöku).

**VARÚÐ**

Útsetning fyrir hækkuðu hitastigi yfir fyrrnefndum mörkum getur haft neikvæð áhrif á tíðni þess að einstök sýni og/eða afköst sýna bregðist.

## Viðvaranir og varúðarráðstafanir

- Þetta greiningarpróf inniheldur K-próteasa. Líkamstjón getur hlotist af innöndun, neyslu, snertingu við húð og augu. Notaðu í vel loftræstu rými, klæðstu hlífðarfatnaði, forðastu að anda að þér ryki og fargaðu ílátum og ónotuðu innihaldi í samræmi við gildandi öryggisstaðla.
- Þetta greiningarpróf inniheldur gúanidíníumklóríð. Líkamstjón getur hlotist af innöndun, neyslu, snertingu við húð eða augu. Notaðu í vel loftræstu rými, klæðstu hlífðarfatnaði og fargaðu ílátum og ónotuðu innihaldi í samræmi við gildandi öryggisstaðla á staðnum.
- Þetta greiningarpróf inniheldur 2-própanól sem er eldfimt íðefni. Hafið fjarri hitagjöfum og opnum eldi. Líkamstjón getur hlotist af innöndun, neyslu, snertingu við húð eða augu. Notaðu í vel loftræstu rými, klæðstu hlífðarfatnaði og fargaðu ílátum og ónotuðu innihaldi í samræmi við gildandi öryggisstaðla á staðnum.
- Þetta greiningarpróf inniheldur dímetýlsúlfoxíð sem er ætandi og brennanlegur vökvi. Líkamstjón getur hlotist af innöndun, neyslu, snertingu við húð eða augu. Notaðu í vel loftræstu rými, klæðstu hlífðarfatnaði og fargaðu ílátum og ónotuðu innihaldi í samræmi við gildandi öryggisstaðla á staðnum.
- Til að koma í veg fyrir myndun skaðlegra lofttegunda má ekki farga úrgangi cfDNA-útdráttar (inniheldur gúanidíníumklóríð) með úrgangi sem inniheldur bleikiefni (natríumhýpóklórít).
- Meðhöndlaðu öll sýni eins og þau innihaldi hugsanlega smitbera.
- Fylgdu venjubundnum varúðarráðstöfunum á rannsóknarstofu. Ekki má nota munninn til að draga efni upp í pípettu. Neyttu ekki matar, drykkjar eða tóbaks á tilgreindum vinnusvæðum. Notaðu einnota hanska og rannsóknarstofusloppa þegar sýni og prófefni fyrir prófanir eru meðhöndluð. Þvoðu hendur vandlega eftir meðhöndlun sýna og prófefna fyrir prófanir.
- Ekki nota neina íhluti prófunar eftir uppgafna fyrningardagsetningu á merkimiðanum á öskjunni. Ekki skipta á milli íhluta prófana úr mismunandi greiningarlotum. Prófunarlotur eru auðkenndar á merkimiða öskjunnar. Geymdu prófunaríhlutina við tilgreint hitastig.
- Til að koma í veg fyrir niðurbrot sýna eða prófefnis skal ganga úr skugga um að allar natríumhýpóklórítgufur frá hreinsun hafi horfið að fullu áður en aðferðarlýsingin er hafin.
- Ef verklagsreglum er ekki fylgt getur það leitt til þess að niðurstöður verði rangar eða gæði sýna skerðist verulega.
- Tilkynntu tafarlaust öll alvarleg atvik sem tengjast þessari vöru til Illumina og lögbærs yfirvalds í aðildarríkinu þar sem notandinn og sjúklingurinn hafa aðsetur.



- Upplýsingar um umhverfisáhrif, heilsu og öryggi má finna á öryggisblaðinu (SDS, safety data sheet) á [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html).

## Athugasemdir við aðgerð

### Að forðast mengun

- Notið ónotaða odda og ónotaðar rekstrarvörur til notkunar á rannsóknarstofum.
- Notaðu úðabrusapolna stúta til að draga úr hættu á flutningi og krossmengun milli sýna.
- Vegna hættu á mengun skal gæta ítrustu varúðar til að tryggja að innihald brunnsins haldist að fullu inni í brunnum. Ekki skvetta innihaldinu. Notaðu skilvindu eftir hvert hvirfilblöndunarstig.
- Fylgdu gildandi reglum um rétta rannsóknarstofuvinnu og hreinlæti við meðhöndlun blóðs og blóðafurða.
- Ekki nota bleikiefnisúða þegar safnið er undirbúið. Smávægileg mengun af bleikiefni getur leitt til þess að prófunin mistekst.
- Þegar innsigli á plötum er opnað skal gæta þess að setja diskinn á sléttan og traustan flöt og halda fast í hann. Fjarlægðu innsiglið hægt og gætið þess að það snerti ekki útsetta brunna. Gætið þess að snerta ekki útsetta brunna eða raska innihaldinu. Víxlmengun á milli brunna getur veitt rangar niðurstöður.

### Hreinsun á dekki VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Fyrir notkun skal athuga hvort dekkið sé hreint. Framkvæmdu vikulegt viðhald að minnsta kosti einu sinni í viku og fylgdu eftirfarandi leiðbeiningum fyrir þrif.
- Fjarlægðu alla haldara sem hægt er að afferma og hreinsaðu með hraðvirkandi sótthreinsiefni sem inniheldur alkóhól, afjónað vatn og 70% etanól og láttu þorna. Ef þeir eru mjög óhreinir skaltu leggja þá í bleyti í sótthreinsandi hreinsilausn, skola þá með sótthreinsiefni sem inniheldur alkóhól og leyfa þeim að þorna.
- Opnaðu framhliðina og þurrkaðu af dekkinu með klút vættum í afjónuðu vatni og 70% etanóli. Sér í lagi þarf að athuga hvort rennibrautirnar séu hreinar.
- Fjarlægðu greinina í einfalda lofttæmikerfinu (BVS, Basic Vacuum System) og hreinsaðu greinina, þéttinguna og innri hólf BVS með klút. Forðastu að hreinsa þéttingar með etanóli þar sem efnið getur orðið stökkt.
- Tæmdu úrgang frá oddum fyrir CORE 96-hausinn og sjálfstæðu rásina.
- Fjarlægðu oddtæmingarplötu úrgangsstöðvar oddsins og hreinsaðu hana: úðaðu afjónuðu vatni og 70% etanóli beint á yfirborðið og þurrkaðu af því. Dragðu nýjan plastpoka yfir rammann og festu hann aftur á. Settu oddtæmingarplötuna aftur á sinn stað.
- Úðaðu afjónuðu vatni og 70% etanóli beint á yfirborð úrgangskassa og -rennu CORE 96-haussins og þurrkaðu af þar til hreint.

- Ef erfitt er að fjarlægja uppsafnað úrgangsefni af oddum skaltu strjúka af með klút sem vættur er með vatni án DNasa/RNasa þar til uppsöfnuðu efnaleifarannar hafa verið fjarlægðar. Fargaðu klútnum á viðeigandi hátt. Haltu áfram að sótthreinsa með sótthreinsiefni sem inniheldur alkóhól.
- Vættu klút sem skilur ekki eftir sig ló eða bómullarpinna með 70% etanóli. Strjúktu glugga leysiskannans á strikamerkjalesaranum. Hreinsaðu sérhvern brunn á CPAC-plötubreytinum með sama klútnum eða pinnanum. Ef þú notar klút skaltu þrýsta honum ofan í hvern brunn á breytinum með oddinum á penna til að tryggja að innra byrði brunnsins sé þrifið vel.
- Hreinsaðu sjálfstæðu rásirnar:
  - Hreinsaðu oddtæmingarermína á sjálfstæðu rásunum (ytri hluta pípetturásanna) með klút sem ekki skilur eftir sig ló og hefur verið vættur í afjónuðu vatni og 70% etanóli. (Sjá *Hamilton Microlab STAR leiðbeiningar nr. 15070074.*)
  - Hreinsaðu stoppdiskinn og O-hringina á pípettuhausnum (ytri hluta pípetturásanna) með klút sem ekki skilur eftir sig ló og hefur verið vættur í afjónuðu vatni og 70% etanóli.
- Hreinsaðu CORE 96-hausinn:
  - Hreinsaðu hulstrið af 96-hausnum og neðri hlið stoppdiskanna með sama klútnum sem ekki skilur eftir sig ló og hefur verið vættur í afjónuðu vatni og 70% etanóli.
  - Þræddu sama klútinn, eða ræmu sem rifin er af klút, sem hefur verið vættur í afjónuðu vatni og 70% etanóli, meðfram hliðum pípetturásanna á 96-hausnum til að hreinsa O-hringina. Endurtaktu þetta ferli fyrir hverja pípetturás á 96-hausnum.
- Úðaðu afjónuðu vatni og 70% etanóli á fram- og hliðarhlífina og þurrkaðu af.
- Hreinsaðu verndarborðann fyrir sjálfvirka hleðslu með klút sem hefur verið vættur í afjónuðu vatni og 70% etanóli og þurrkaðu af án þess að þrýsta á hann.
- Þegar dekkið og íhlutirnir eru alveg þurrir skaltu koma höldurunum aftur fyrir.

**ATHUGASEMD** Ef ML STAR er ekki þrifið eða viðhaldið rétt getur það valdið víxlmengun og því að prófin virki illa.

## Gæðæftirlit

Hægt er að meta samanburðarefni með þekkta virknieiginleika til að greina mun á vinnslu og tæknilegum aðferðum í rannsóknarstofunni.

Keyrsla samanburðarsýnis eða samanburðarsýnis án sniðmáts dregur úr heildarfjölda óþekktra móðursýna sem hægt er að vinna með hverjum sýnaundirbúningi.

Ekki greina fleiri en tvö NTC-sýni í hverri runu með 24 eða 48 sýnum eða fjögur NTC-sýni í hverja runu með 96 sýnum.

# Notkunarleiðbeiningar

## Ráð og aðferðir

Nema öruggur stöðvunarstaður sé tilgreindur í aðferðarlýsingunni skal halda strax áfram í næsta skref.

### Strikamerki sett á plötur

- Strikamerki fyrir plötur með heilhlíf byrja á PL.
- Strikamerki fyrir djúpbrunnspötur byrja á DW.
- Settu strikamerki á plötur með heilhlíf og djúpbrunnspötur á hliðina við hliðina á dálki 12.
- Settu plöturnar í með strikamerkin til hægri til að virkja sjálfvirka skönnun.

### Plötur innsiglaðar og opnaðar

- Gættu ítrustu varúðar til að koma í veg fyrir víxlmengun – enginn vökvi á að vera sýnilegur á neðri hlið innsiglisins.
  - Gakktu úr skugga um að óvarin undirhlið innsiglisins komist ekki í snertingu við óvarða brunna.
  - Gættu þess að snerta ekki óvarða brunna.
- Innsiglaðu alltaf plötuna með 96 brunnum fyrir eftirfarandi skref í aðferðinni:
  - Skref með skilvindu
  - Skref með hitahringrás
- Til að innsigla plötuna skaltu setja þynnuinnsigli á plötuna og innsigla hana síðan. Gættu þess að þrýsta á alla plötuna og að innsiglið liggja þétt að hverjum einstökum brunni.
- Áður en platan er opnuð skaltu gera eftirfarandi:
  - Settu plötuna með 96 brunnum stuttlega í skilvindu við 1.000 × g í 20 sekúndur.
  - Settu plötuna á slétt yfirborð og fjarlægðu innsiglið svo hægt.

### VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Fyrir notkun skaltu framkvæma og skrá niður nauðsynlegt viðhald í samræmi við leiðbeiningar framleiðanda.
- Fylgstu með ML STAR á meðan sjálfvirku aðgerðirnar eru framkvæmdar. Hafðu auga með fyrirmælum og notendaleiðbeiningum í hugbúnaðarviðmóti VeriSeq NIPT Workflow Manager útgáfa 2.
- Hafðu framhliðina á sínum stað meðan á notkun stendur.
- Hafðu enga hluti á dekkinu meðan á notkun stendur.
- Ef valmöguleikinn **Exclude** (Útiloka) stendur til boða þegar villa kemur upp skal ekki velja þann valkost undir neinum kringumstæðum. Ef aðferðin kemst ekki fram hjá villunni eða möguleikar til að bregðast við villunni eru takmarkaðir skaltu hætta við keyrsluna.
- Á meðan skrefum með plötulofttæmi stendur skaltu, ef VeriSeq NIPT Workflow Manager útgáfa 2 óskar eftir því, aðstoða handvirkt við að þétta milli plötunnar og lofttæmisgreinarinnar.

- Leyfðu kerfinu að losa odda sjálfkrafa úr breytnum. Ekki fjarlægja oddana handvirkt nema hugbúnaðurinn óski eftir því.
- Fjarlægðu notuð prófefni og notaðar rekstrarvörur samkvæmt fyrirmælum verkflæðisstjórans.
- Tæmdu glerflöskurnar undir lofttæmisúrgang daglega. Fyrsta flöskan á aldrei að verða meira en hálf full. Of mikill lofttæmisúrgangur getur skemmt lofttæmisdæluna og minnkað lofttæmið í kerfinu.
- Í runum með 24, 48 og 96 sýnum skal setja fullan rekka af 8-rása oddium þar sem hver og einn er talinn áður en aðferðin er hafin.

## Vinna sýni

### Ferli

1. Ljúktu eftirfarandi skrefum fyrir hvern skammt:
  - a. Settu sýni með strikamerki í skilvindu við 1600 × g í 10 mínútur við 4°C og hafðu bremsuna óvirka.
  - b. Fjarlægðu sýnarörin þegar skilvindan hefur stöðvast alveg.Byrjaðu að einangra plasma innan 15 mínútna eftir skilvinduna. Ef meira en 15 mínútur líða skaltu setja sýnin í skilvinduna aftur.
2. Skoðaðu hvert rör til að kanna hvort sýnið henti með því að staðfesta eftirfarandi kröfur:
  - Rúmmál sýnisins er eins og búist var við.
  - Eftir skilvindun eru rauðu blóðkornin og plasmað greinilega aðskilin í sýnunum.
  - Plasmalagið er að minnsta kosti 1,5 ml fyrir ofan gulbrúna hjúpinn.
  - Ekki hefur orðið mikið rauðkornarof í sýninu (þ.e. plasma er ekki djúprautt að lit).
  - Sýnið er ekki með fitusýrur (þ.e. plasma er ekki skýjað, hvítt eða mjólkurkennt og ógegnsætt að útliti).
  - Það er ekki storka í sýninu.



#### VARÚÐ

Sýni sem hafa verið geymd eða meðhöndluð á rangan hátt geta orðið óhentug. Ef óhentug sýni eru unnin í gegnum verkflæðið geta þau stíflað bindiplötuna við útdrátt og valdið því að sýni flæði yfir í aðliggjandi brunna.

3. Taktu lokið af rörunum og settu þau í rörhaldarana. Settu öll sýnin og allar plasmamasamanburð fyrir rununa í.



#### VARÚÐ

Ef valkosturinn Exclude (Útiloka) birtist meðan á villumeðhöndlun stendur skaltu ekki velja hann. Ef aðferðin kemst ekki fram hjá villunni og þú hefur takmarkaða möguleika til að bregðast við villunni skaltu hætta við keyrsluna.

## Einangra plasma

### Undirbúningur

1. Merktu eina djúpbrunnspötu Millistigsplasma og settu strikamerki á hana.
2. Merktu eina djúpbrunnspötu Lokaplasma og settu strikamerki á hana.
3. Í runum með 24, 48 og 96 sýnum skal setja fullan rekka af 8-rása oddium þar sem hver og einn er talinn áður en aðferðin er hafin.



#### VARÚÐ

Gakktu úr skugga um að nota rétta tegund plötu fyrir millistigsplasma og lokaplasma. Notkun djúpbrunnsgeymis í stað djúpbrunnspötu leiðir til blöndunar sýna og getur gefið rangar niðurstöður.

### Ferli

1. Opnaðu AppLauncher og veldu síðan **VeriSeq NIPT Method** (aðferð).
2. Sláðu inn einkvæmt auðkenni rununnar og notandanafn og smelltu síðan á **OK** (Í lagi).  
Auðkenni runu má innihalda ≤ 26 stafi. Þú getur notað tölur, bókstafi, undirstrik (\_) eða bandstrik (-). Til dæmis: 2025-10-16\_Batch3.  
Auðkenni runu er ekki háð há- og lágstöfum. Auðkenni runu sem eru háð há- og lágstöfum teljast ekki einkvæm.  
Heiti runa verða að vera einkvæm og eini munurinn má ekki vera að lágstafur í einu heiti sé hástafur í öðru eða öfugt. Til dæmis eru runuheitin Batch01 og batch01 ekki einkvæm. Sama regla gildir fyrir heiti sýnaauðkenna.
3. Veldu **New Batch** (Ný runa).
4. Eftir ræsingu skaltu velja **OK** (Í lagi) til að hefja einangrun plasma.
5. Veldu stærð runu og veldu síðan **OK** (Í lagi).
6. Veldu fjölda sýna án samanburðarsniðmáts (NTC, no template control) og veldu síðan **OK** (Í lagi).  
NTC-hólfín eru alltaf síðustu hólfín sem eru valin. Til dæmis, eru stöður 23 og 24 NTC-sýni í keyrslu með 24 sýnum og tveimur NTC-sýnum.
7. Framkvæmdu eitt af eftirfarandi skrefum:
  - Til að hlaða inn fyrirbyggjandi sýnablaði skaltu velja sýnablaðið sem tengist rununni og velja síðan **OK** (Í lagi).
  - Veldu **No Sample Sheet** (Ekkert sýnablað) til að halda áfram án þess að velja sýnablað.Sjá frekari upplýsingar um sýnablað í *Leiðarvísir fyrir hugbúnað VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 (skjal númer 1000000067940)*.

**ATHUGASEMD** Það verður að skrá gerð sýnis, hvort sem um er að ræða einbura eða tvíbura, nákvæmlega fyrir hvert sýni til að tryggja rétta gagnagreiningu. Ef þú velur **No Sample Sheet** (ekker sýnablað) skaltu ganga úr skugga um að þú stillir á sjálfgefin gildi fyrir sýnin í Workflow Manager Service Tools (þjónustutólum verkflæðisstjórans). Sjá frekari upplýsingar í *Leiðarvísir fyrir hugbúnað VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 (skjal númer 1000000067940)*.

8. Gakktu úr skugga um að öll strikamerki séu föst á og settu síðan sýnin, oddana og plöturnar (með strikamerkin til hægri) á haldarann.
9. Veldu **OK** (í lagi) eftir hverja hleðslukvaðningu.

Stærð sýnarunu	Haldari Tegund	Rás	Hlutur	Staðsetning stöðu
24, 48, 96	Oddur	7–12	1.000 µl oddar	5
			1.000 µl oddar (aðeins runur með 96 sýni)	4, 5
	Rör	15	Undirbúin blóðsýnatökurör 1–24 (fyrir allar runustærðir)	1–24
	Rör	16	Undirbúin blóðsýnatökurör 25–48 (eingöngu fyrir runur í stærðum 48 og 96)	25–48
	Rör	17	Undirbúin blóðsýnatökurör 49–72 (eingöngu fyrir runur í stærð 96)	49–72
	Rör	18	Undirbúin blóðsýnatökurör 73–96 (eingöngu fyrir runur í stærð 96)	73–96
	Multiflex	19–24	Tóm djúpbrunnspata, lokaplasma – strikamerkt	4
	Multiflex	19–24	Tóm djúpbrunnspata, millistigsplasma – strikamerkt	5
	Prófefni	47	<b>[Valfrjálst]</b> Fosfatjöfnuð saltvatnslausn Dulbecco (DPBS, Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) – notuð fyrir sýni án samanburðarsniðmáts (NTC, no template control)	5

10. Gakktu úr skugga um að haldarar, rannsóknarbúnaður og prófefni séu rétt sett í.
11. Á skjánum Pre-Spin Deck Verification (Staðfesting á dekki fyrir snúning) skaltu velja **OK** (í lagi).
12. Fylgstu með ML STAR framkvæma sjálfvirku aðgerðirnar.
13. Þegar verkflæðisstjórinn óskar eftir því skaltu ganga úr skugga um að ekkert sé fyrir hleðsludekkinu á ML STAR svo ML STAR geti affermt haldarana.
14. Veldu **Unload** (Afferma) til að afferma dekkið.

15. Fjarlægðu djúpbrunnspötuna fyrir millistigsplasma á eftirfarandi hátt.
  - a. Skoðaðu plötuna til að tryggja að sama rúmmál sé í hverjum brunni (engar pípettuvillur). Vænt rúmmál er 1.000 µl.
  - b. Skráðu niður allt ósamræmi þegar aðgerðinni til að einangra plasma er lokið.
  - c. Innsiglaðu plötuna, settu jafnvægisþyngd á hana og keyrðu skilvinduna við 5.600 × g í 10 mínútur og hafðu bremsuna óvirka eða á lægstu stillingu.
16. Veldu **Yes** (Já) til að halda áfram í endanlegan undirbúning plasma.
17. Fjarlægðu innsiglið af plötunni og settu plötuna aftur á haldarann.

Stærð sýnarunu	Haldari Tegund	Rás	Hlutur	Staðsetning stöðu
24, 48, 96	Multiflex	19– 24	Djúpbrunnspata fyrir millistigsplasma	5

18. Hakaðu við gátreitinn **Intermediate Plasma plate has been spun** (Millistigsplasma hefur verið snúið) og veldu síðan **OK** (Í lagi).
19. Fylgstu með ML STAR framkvæma sjálfvirku aðgerðirnar.
20. Þegar verkflæðisstjórinn óskar eftir því skaltu ganga úr skugga um að ekkert sé fyrir hleðsludekkinu á ML STAR svo ML STAR geti affermt haldarana.
21. Veldu **Unload** (Afferma) til að afferma dekkið.
22. Þegar verkflæðisstjórinn óskar eftir því skaltu tæma haldarana og dekkið.
23. Fjarlægðu djúpbrunnspötuna fyrir lokaplasma.
24. Athugaðu hvort eftirfarandi plötur séu til staðar á plötunni:
  - Ósamræmi í rúmmáli milli brunna. Vænt rúmmál er 900 µl.
  - Sýnileg frumukorn.
  - Of mikið rauðkornarof.

Ef þú tekur eftir óeðlilegum sýnilegum frumukornum eða of miklu rauðkornarofi skaltu ógilda viðkomandi sýni að lokinni aðferðinni til að einangra plasma eða nota runustjóran. Frekari upplýsingar um runustjóran má finna í *Leiðarvísir fyrir hugbúnað VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 (skjal númer 1000000067940)*.
25. Þegar verkflæðisstjórinn óskar eftir því skaltu velja **OK** (Í lagi).
26. Sláðu inn athugasemdir við viðkomandi brunna og veldu síðan **OK** (Í lagi).
27. Framkvæmdu eitt af eftirfarandi skrefum.
  - Veldu **Yes** (Já) til að halda áfram með cfDNA-útdrátt.
  - Veldu **Exit** (Hætta) til að hætta.

## ÖRUGGUR STAÐUR TIL AÐ HÆTTA

Ef þú ætlar að hætta skaltu innsigla plötuna fyrir lokaplasma og geyma hana við 2°C til 8°C í allt að 7 daga.

## Draga út cfDNA

### Undirbúningur

1. Skoðið útdráttar- og fylgihlutakassana til að staðfesta að settin séu ekki útrunnin.
2. Undirbúðu eftirfarandi prófefni. Merktu prófefnaflátin og djúpbrunnageymana með heitum prófefnanna.

Prófefni	Geymsla	Leiðbeiningar
Djúpbrunnspata fyrir lokaplasma	2°C til 8°C	Ef hún var í geymslu skaltu láta hana standa í 30 mínútur til að ná stofuhita. Settu hana í skilvindu við 1.000 × g í 20 sekúndur. Opnaðu djúpbrunnspötunni fyrir lokaplasma fyrir notkun.

3. Bættu hægt við 3,75 ml af Proteinase Buffer í hvert prófefnahettuglas með Proteinase K.
  - Undirbúðu 3 hettuglös fyrir 24 og 48 sýni.
  - Undirbúðu 4 hettuglös fyrir 96 sýni.
4. Lokaðu hettuglösunum með Proteinase K og hvirfilblandaðu þar til agnirnar svífa um lausnina.



### VARÚÐ

Ekki menga gúmmítappann. Ef önnur efni komast á gúmmítappann getur það mengað síðari sýni.

5. Safnaðu saman tilbúnum próteinasa K úr öllum hettuglösunum í prófefnaflátið og merktu það Proteinase K.
6. Bættu við 100 ml af 100% EtOH í hverja próffefnaflösku með Wash Buffer II.
  - Undirbúðu 1 flösku fyrir 24 og 48 sýni.
  - Undirbúðu 2 flöskur fyrir 96 sýni.
7. Hvolfdu flöskunum með Wash Buffer II til að blanda.
8. Hakaðu í gátreitina á flöskunum með Wash Buffer II.
9. Merktu 1 nýja plötu með heilhlíf Milliefni og settu strikamerki á hana.
10. Merktu 1 nýja plötu með heilhlíf cfDNA-skol og settu strikamerki á hana.
11. Merktu 1 nýja djúpbrunnspötu Útdráttarmilliefni og settu strikamerki á djúpbrunnspötuna.
12. Settu strikamerki á DNA-bindiplötuna.
13. Settu pynnuinnsigli á ónotaða brunna í runum með 24 og 48 sýnum.
14. Útbúðu 70% EtOH hreinsilausn (70% EtOH, 30% vatn án DNasa/RNasa) til að hreinsa lofttæmikerfið.
15. Undirbúðu lofttæmikerfið á eftirfarandi hátt.
  - a. Fjarlægðu lofttæmisgreinina og hreinsaðu með 70% EtOH.  
Forðastu að hreinsa þéttingar með EtOH þar sem efnið getur orðið stökkt.
  - b. Losaðu lofttæmisúrganginn.
  - c. Gakktu úr skugga um að lofttæmiskerfi ML STAR sé í gangi.



## Ferli

1. Veldu **OK** (í lagi) til að hefja cfDNA-útdrátt.
2. Ef **VeriSeq NIPT Method** (VeriSeq NIPT aðferð) er ekki þegar opið:
  - a. Opnaðu AppLauncher og veldu síðan **VeriSeq NIPT Method** (VeriSeq NIPT aðferð).
  - b. Sláðu inn auðkenni rununnar og notandanafn og smelltu síðan á **OK** (í lagi).
3. Settu oddana í oddhaldarana á eftirfarandi hátt og veldu síðan **OK** (í lagi).



## VARÚÐ

Áður en aðferðin fyrir runur með 24, 48 og 96 sýni er hafin skaltu bæta við fullum rekka af 8 rása oddum.

Stærð sýnarunu	Haldari Tegund	Rás	Hlutur	Staðsetning stöðu
24	Oddur	1–6	1.000 µl oddar	1
		7–12	300 µl oddar	1
48	Oddur	1–6	1.000 µl oddar	1, 2
		7–12	300 µl oddar	1
96	Oddur	1–6	1.000 µl oddar	1, 2, 3, 4
		7–12	300 µl oddar	1

4. Settu talda oddana á oddhaldarana á eftirfarandi hátt.

Stærð sýnarunu	Haldari Tegund	Rás	Hlutur	Staðsetning stöðu
24, 48, 96	Oddur	49–54	1.000 µl oddar	1
			300 µl oddar	2
			50 µl oddar	3

5. Sláðu inn staðsetningu fyrsta og síðasta oddsins fyrir hvern oddarekka og veldu síðan **OK** (í lagi).

6. Skannaðu strikamerkin á útdráttarkassanum.
7. Sláðu inn notandanafn eða upphafsstafi undirbúningsaðila prófefnanna og veldu síðan **OK** (Í lagi).
8. Skannaðu strikamerkin á fylgihlutakassanum.
9. Sláðu inn notandanafn eða upphafsstafi undirbúningsaðila prófefnanna og veldu síðan **OK** (Í lagi).
10. Gakktu úr skugga um að strikamerki séu föst á.
11. Opnaðu innsiglið á djúpbrunnspötunni fyrir lokaplasma ef þess þarf.
12. Settu plötur (með strikamerkið til hægri) á plötuhalдарann eins og hér segir og veldu síðan **OK** (Í lagi).

Stærð sýnarunu	Haldari Tegund	Rás	Hlutur	Staðsetning stöðu
24, 48, 96	Multiflex	19– 24	Ný plata með heilhlíf, millistig, strikamerkt	1
			Ný plata með heilhlíf, skolun cfDNA, strikamerkt	2
			Ný djúpbrunnspлата, útdráttur millistig, strikamerkt	4
			Djúpbrunnspлата fyrir lokaplasma, strikamerkt	5

13. Staðfestu að DNA-bindiplatan sé strikamerkt og veldu síðan **OK** (Í lagi).
14. Þegar aðeins hluti af plötunni er nýttur í runu skal láta tilklipt plötuinnsigli yfir ónotaða brunna (dálkar 4–12 fyrir runur með 24 sýni og dálkar 7–12 fyrir runur með 48 sýni).
15. Settu DNA-bindiplötuna á lofttæmisgreinina með strikamerkið til hægri.
16. Áður en bindiplatan er látin á BVS-greinina skal skoða hvort einhverjar hindranir séu á brunnunum. Þetta getur truflað flæði prófefna í lofttæmi.
17. Ef notaðar eru runur með 24 eða 48 sýnum skaltu hylja ónotaða brunna og innsigla með álinnsigli. Hakaðu við gátreitinn **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (Eru dálkar DNA-bindiplötu innsiglaðir?) og veldu síðan **OK** (Í lagi).
18. Settu ílátin með prófefnunum á prófefnahaldarann eins og hér segir og veldu síðan **OK** (Í lagi).

Stærð sýnarunu	Haldari Tegund	Rás	Hlutur	Staðsetning stöðu
24, 48	Prófefni	47	16 ml Elution Buffer	1
			11 ml Proteinase K	2
96	Prófefni	47	16 ml Elution Buffer	1
			15 ml Proteinase K	2

19. Flyttu tilgreind prófefni í djúpbrunnageymana og láttu síðan geymana á djúpbrunnaberana eins og hér segir.  
20. Veldu **OK** (í lagi).

Stærð sýnarunu	Haldari Tegund	Rás	Hlutur	Staðsetning stöðu
24, 48	Djúpbrunnur	39– 44	125 ml Wash Buffer II	1
			125 ml Wash Buffer I	2
			60 ml 100% EtOH	3
			100 ml Lysis Buffer	4
			60 ml vatn án DNasa/RNasa	5
96	Djúpbrunnur	39– 44	200 ml Wash Buffer II	1
			125 ml Wash Buffer I	2
			100 ml 100% EtOH	3
			100 ml Lysis Buffer	4
			100 ml vatn án DNasa/RNasa	5

21. Bíddu eftir að sjálfvirkri athugun á rúmmáli prófena ljúki.  
22. Staðfestu að frárennslisflaskan fyrir lofttæmi sé tóm (mælt er með að hún sé hálf full) og smelltu síðan á **OK** (í lagi).  
23. Staðfestu stöðu allra haldara, rannsóknarbúnaðar og prófefna og veldu síðan **OK** (í lagi) á skjánum fyrir staðfestingu á útdráttardekki.  
24. Fylgstu með ML STAR á meðan sjálfvirku aðgerðirnar eru framkvæmdar.



### VARÚÐ

Þú verður að ógilda handvirkt yfirflæði sýna sem kerfið greinir ekki áður en nálægir brunnar mengast.

25. Þegar síðasta ryksuguskrefi er lokið skaltu fjarlægja DNA-bindiplötuna og hreinsa botninn með 70% EtOH.  
26. Lokaðu öllum opnum brunnum á DNA-bindiplötunni og láttu hana á tóma djúpbrunnspötu fyrir lokaplasma.  
27. Settu DNA-bindiplötuna / plötuna fyrir lokaplasma í skilvindu við  $5.600 \times g$  í 10 mínútur og hafðu bremsuna virka.  
28. Veldu **OK** (í lagi).  
29. Á meðan DNA-bindiplatan er í skilvindunni skaltu klára að hreinsa lofttæmið:
- Fjarlægðu lofttæmisgreinina og veldu síðan **OK** (í lagi).
  - Bíddu eftir að sjálfvirkri förgun úrgangs sé lokið.
  - Hreinsaðu lofttæmisgreinina og innvols lofttæmiskerfisins með 70% EtOH og komdu svo lofttæmisgreininni aftur fyrir.

- d. Hakaðu við gátreitinn **Manifold is on Vacuum** (Greinin er á lofttæmi) til að hefja flutning skolonarplötunnar yfir á lofttæmisgreininni og veldu síðan **OK** (Í lagi).
30. Eftir skilvindan er búin skaltu opna brunnana sem innihalda sýni á DNA-bindiplötunni.
31. Settu setja DNA-bindiplötuna ofan á cfDNA-skolonarplötuna sem er á lofttæmisgreininni.
32. Láttu DNA-bindiplötuna í með strikamerkið til hægri og veldu síðan **OK** (Í lagi).
33. Fylgstu með ML STAR á meðan sjálfvirku aðgerðirnar eru framkvæmdar.
34. Eftir kvíunarskrefið skaltu haka við gátreitinn **Plates are assembled as indicated** (Plötunar eru settar saman eins og fram kemur). Staðfestu að DNA-bindiplatan og cfDNA-skolonarplatan séu á stoðgrunni (ef þess þarf fyrir skilvinduna).
35. Innsiglaðu opna brunna á DNA-bindiplötunni.
36. Keyrðu skilvinduna við  $5.600 \times g$  í 2 mínútur og hafðu bremsuna virka og veldu síðan **OK** (Í lagi).
37. Skoðaðu hvort sama rúmmál sé í hverjum brunni á cfDNA-skolonarplötunni.  
Vænt rúmmál er um það bil 55  $\mu$ l.
38. Innsiglaðu og geymdu cfDNA-skolonarplötuna fyrir undirbúning safnsins.
39. Þegar verkflæðisstjórnin óskar eftir því skaltu ganga úr skugga um að ekkert sé fyrir hleðsludekkinu á ML STAR svo ML STAR geti affermt haldarana.
40. Veldu **Unload** (Afferma) til að afferma dekkið.
41. Affermdu alla haldara og hreinsaðu dekkið á ML STAR og veldu síðan **OK** (Í lagi).
42. Sláðu inn athugasemdir við viðkomandi brunna og veldu síðan **OK** (Í lagi).
43. Framkvæmdu eitt af eftirfarandi skrefum:
- Veldu **Yes** (Já) til að halda áfram að undirbúa söfn.
  - Veldu **Exit** (Hætta) til að hætta.

#### ÖRUGGUR STAÐUR TIL AÐ HÆTTA

Ef þú ætlar að hætta skaltu innsigla cfDNA-skolonarplötuna og geyma hana við  $-25^{\circ}\text{C}$  til  $-15^{\circ}\text{C}$  í allt að 7 daga.

## Undirbúa söfn

### Undirbúningur

1. Skoðið safnsundirbúnings- og fylgihlutakassana til að staðfesta að settin séu ekki útrunnin.
2. Undirbúðu eftirfarandi prófefni. Merktu prófefnaflátin- og djúpbrunnageymana með heitum prófefnanna.

Prófefni	Geymsla	Leiðbeiningar
A-Tailing Mix	-25°C til -15°C	Þíddu efnin við stofuhita. Hvirfilblandaðu til að blanda og settu síðan stuttlega í skilvindu.
cfDNA skolunarplata	-25°C til -15°C	Ef platan hefur verið geymd áður skal ganga úr skugga um að hún hafi ekki verið geymd lengur en í 7 daga og þíða hana við stofuhita. Hvirfilblandaðu við 1.500 snúninga á mínútu í 1 mínútu. Settu hana í skilvindu við 1.000 × g í 20 sekúndur.
End Repair Mix	-25°C til -15°C	Þíddu efnin við stofuhita. Hvirfilblandaðu til að blanda.
Hybridization Buffer	-25°C til -15°C	Þíddu efnin við stofuhita. Hvirfilblandaðu til að blanda. <b>Settu efnin aftur í geymslu eftir notkun.</b>
Ligation Mix	-25°C til -15°C	Þíddu efnin við stofuhita. Hvirfilblandaðu til að blanda og settu síðan stuttlega í skilvindu.
NIPT DNA-breytiplata	-25°C til -15°C	Þíddu efnin við stofuhita. Hvirfilblandaðu til að blanda. Settu hana í skilvindu við 1.000 × g í 20 sekúndur.
Resuspension Buffer	2°C til 8°C	Hvirfilblandaðu til að blanda. <b>Settu efnin aftur í geymslu eftir notkun.</b>
Sample Purification Beads	2°C til 8°C	Láttu standa í 30 mínútur til að ná stofuhita. Hvirfilblandaðu kröftuglega fyrir hverja notkun. Blandaðu með hvirfilblöndun eða viðsnúningi þar til allar perlurnar hafa dreifst og blandan er einsleit.



#### VARÚÐ

Þegar NIPT DNA-breytiplatan er opnuð skaltu gæta þess að forðast víxlmengun agnúða milli brunna en það getur valdið röngum niðurstöðum.

3. Ef cfDNA skolunarplatan var geymd í frysti skaltu undirbúa hana á eftirfarandi hátt.
  - a. Þíddu efnin við stofuhita.
  - b. Hvirfilblandaðu við 1.500 snúninga á mínútu í 1 mínútu.
  - c. Settu hana í skilvindu við 1.000 × g í 20 sekúndur.

4. Merktu eina nýja plötu með heilhlíf Söfn og settu strikamerki á hana.
5. Undirbúðu 80% EtOH úr hreinu EtOH. Blandaðu saman 40 ml af 100% EtOH og 10 ml af vatni án DNasa/RNasa. Hvolfdu til að blanda.
6. Gættu þess að kveikt sé á hitastýringu ML STAR.

## Þynna ensím

1. Sameinaðu A-Tailing Mix og Resuspension Buffer í rör með skrúflok. Hvirfilblandaðu til að blanda og settu síðan stuttlega í skilvindu.

Stærð sýnarunu	A-Tailing Mix (µl)	Resuspension Buffer (µl)
24, 48	900	1.200
96	1.800	2.400

2. Blandaðu saman Ligation Mix og Resuspension buffer í rör með skrúflok. Hvirfilblandaðu til að blanda og settu síðan stuttlega í skilvindu.

Stærð sýnarunu	Ligation Mix (µl)	Resuspension Buffer (µl)
24, 48	230	1.713
96	440	3.278

## Ferli

1. Veldu **OK** (Í lagi) til að hefja undirbúning safns. Ef **VeriSeq NIPT Method** er ekki þegar opið:
  - a. Opnaðu AppLauncher og veldu **VeriSeq NIPT Method**.
  - b. Sláðu inn auðkenni rununnar og notandanafn og smelltu síðan á **OK** (Í lagi).
2. Gakktu úr skugga um að eftirfarandi rekstrarvörur séu til reiðu eins og fram kemur á skjánum Reagent Preparation (Undirbúningur prófefa):
  - A-Tailing Mix, Ligation Mix og 80% EtOH
  - Hreinsiperlur fyrir sýni (Sample purification beads), endaviðgerðablanda (end repair mix) og DNA-breytiplata fyrir NIPT
3. Hakaðu við gátreitina og veldu síðan **OK** (Í lagi).
4. Skannaðu strikamerkin í safnundirbúningskassanum.
5. Sláðu inn notandanafn eða upphafsstafi undirbúningsaðila prófefnanna og veldu síðan **OK** (Í lagi).
6. Skannaðu strikamerkin á fylgihlutakassanum.
7. Sláðu inn notandanafn eða upphafsstafi undirbúningsaðila prófefnanna og veldu síðan **OK** (Í lagi).

8. Settu oddana í oddhaldarana á eftirfarandi hátt og veldu síðan **OK** (Í lagi) fyrir hvern haldara.

Stærð sýnarunu	Haldari Tegund	Rás	Hlutur	Staðsetning stöðu
24	Oddur	1–6	50 µl oddar	1
		7–12	300 µl oddar	1, 2
48	Oddur	1–6	50 µl oddar	1, 2
		7–12	300 µl oddar	1, 2, 3, 4
96	Oddur	1–6	50 µl oddar	1, 2, 3, 4
		7–12	300 µl oddar	1, 2, 3, 4, 5

9. Ef þú stöðvaðir aðferðina eftir cfDNA-útdráttarferlið skaltu setja talda odda á oddahaldarana á eftirfarandi hátt.

Stærð sýnarunu	Haldari Tegund	Rás	Hlutur	Staðsetning stöðu
24, 48, 96	Oddur	49–54	1.000 µl oddar	1
			300 µl oddar	2
			50 µl oddar	3

10. Sláðu inn staðsetningu fyrsta oddsins fyrir hvern oddarekka og veldu síðan **OK** (Í lagi).

11. Gakktu úr skugga um að strikamerki séu föst á og settu síðan plöturnar (með strikamerkin til hægri) á plötuholdarann eins og hér segir og veldu loks **OK** (Í lagi).

Stærð sýnarunu	Haldari Tegund	Rás	Hlutur	Staðsetning stöðu
24, 48, 96	Multiflex	19–24	cfDNA skolonarplata, strikamerkt	1
			DNA-breytiplata fyrir NIPT, strikamerkt	2
			Ný plata með 96 brunnum og heilhlíf, söfn, strikamerkt	3
			Nýjar plötur með 96 brunnum og heilhlíf	4, 5

12. Settu djúpbrunnahaldarann í á eftirfarandi hátt og veldu síðan **OK** (Í lagi).

Stærð sýnarunu	Haldari Tegund	Rás	Hlutur	Staðsetning stöðu
24, 48, 96	Djúpbrunnur	39–44	50 ml af 80% EtOH í djúpbrunnsgeymi	1
			Nýjar plötur með 96 brunnum og heilhlíf	2, 3, 4, 5

13. Settu ílátin með prófeyfnunum á prófeyfnahaldarann eins og hér segir og veldu síðan **OK** (Í lagi).

Stærð sýnarunu	Haldari Tegund	Rás	Hlutur	Staðsetning stöðu
24, 48, 96	Prófeyfni	47	2,5 ml end repair mix	1
			Tilbúin A-tailing mix (heildarrúmmál)	2
			Tilbúin ligation mix (heildarrúmmál)	3
			10 ml sample purification beads	4
			12 ml Hybridization Buffer	5

- Geymdu afganginn af 12 ml af Hybridization Buffer (HT1) í ílátinu til samnýtingar.
- Gakktu úr skugga um að haldararnir, rannsóknarbúnaðurinn og prófeyfnin séu sett í eins og tilgreint er og veldu síðan **OK** (Í lagi) á skjánum Library Deck Verification (staðfesting á safndekki).
- Bíddu eftir að sjálfvirkri athugun á rúmmáli prófeyfna ljúki.
- Fylgstu með ML STAR á meðan sjálfvirkur aðgerðirnar eru framkvæmdar.
- Þegar verkflæðisstjórnin óskar eftir því skaltu ganga úr skugga um að ekkert sé fyrir hleðsludekkinu á ML STAR svo ML STAR geti affermt haldarana.
- Veldu **Unload** (Afferma) til að afferma dekkið.
- Athugaðu hvort sama rúmmál sé í hverjum brunni á safnplötunni.



### VARÚÐ

Ef ósamræmi er milli rúmmáls í brunnum geta sýni fallið á sjálfvirkur gæðaeftirliti.

- Ef þú ætlar að geyma safnplötuna skaltu innsigla hana og halda henni til haga.
- Affermdu haldarana og hreinsaðu dekkið á og veldu síðan **OK** (Í lagi).
- Sláðu inn athugasemdir við viðkomandi brunna og veldu síðan **OK** (Í lagi).
- Framkvæmdu eitt af eftirfarandi skrefum:
  - Veldu **Yes** (Já) til að halda áfram að magngreina söfn.
  - Veldu **Exit** (Hætta) til að hætta.

### ÖRUGGUR STAÐUR TIL AÐ HÆTTA

Ef þú ert að hætta skaltu innsigla safnplötuna fyrir geymslu. Safnplatan helst stöðug í allt að 7 daga frá undirbúningsdegi við -25°C til -15°C.

## Magngreina söfn

### Undirbúningur

- Undirbúðu eftirfarandi prófeyfni:



Prófefni	Geymsla	Leiðbeiningar
DNA- magngreiningarprófefni	2°C til 8°C	Verjist gegn ljósi. Þíðið við stofuhita í 30–150 mínútur. (Mælt er með að fjarlægja prófefnið í upphafi undirbúningsferlisins fyrir söfn.) Hvirfilblandaðu til að blanda og settu síðan stuttlega í skilvindu.
DNA- magngreiningarstaðall	2°C til 8°C	Hvirfilblandaðu til að blanda og settu síðan stuttlega í skilvindu.
Resuspension Buffer	2°C til 8°C	Hvirfilblandaðu til að blanda.

- Ef safnplatan var geymd í frysti skaltu undirbúa hana á eftirfarandi hátt.
  - Gakktu úr skugga um að hún hafi ekki verið geymd lengur en í 7 daga og þíða hana við stofuhita.
  - Hvirfilblandaðu til að blanda
  - Láttu í skilvindu við 1000 × g í 1 mínútu.
- Kveiktu á flúrskímumælinum 10 mínútum fyrir notkun.
- Settu strikamerki fyrir plötu á nýja plötu með 384 brunnnum.
- Settu strikamerki fyrir plötu á nýja plötu með heilhlíf.

## Ferli

- Veldu **OK** (Í lagi) til að hefja magngreiningu.
- Ef VeriSeq NIPT Method er ekki þegar opið:
  - Opnaðu AppLauncher og veldu **VeriSeq NIPT Method**.
  - Sláðu inn auðkenni rununnar og notandanafn og smelltu síðan á **OK** (Í lagi).
- Skannaðu strikamerkin á fylgihlutakassanum.
- Sláðu inn notandanafn eða upphafsstafi undirbúningsaðila prófefnanna og veldu síðan **OK** (Í lagi).
- Settu oddana í oddhaldarann á eftirfarandi hátt og veldu síðan **OK** (Í lagi).

Stærð sýnarunu	Haldari Tegund	Rás	Hlutur	Staðsetning stöðu
24, 48	Oddur	1–6	300 µl oddarekki	1
			50 µl oddarekki	2
96	Oddur	1–6	300 µl oddarekki	1
			50 µl oddarekki	2, 3

6. Gakktu úr skugga um að strikamerki séu föst á.
7. Opnaðu safnsplötuna ef þörf krefur.
8. Settu plötur (með strikamerkið til hægri) á Multiflex-haldarann eins og hér segir og veldu síðan **OK** (í lagi).

Stærð sýnarunu	Haldari Tegund	Rás	Hlutur	Staðsetning stöðu
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Nýjar plötur með heilhlíf, strikamerktar	1
			Ný plata með 384 brunnum, strikamerkt	2
			Safnplata, strikamerkt	3
			Nýjar plötur með 96 brunnum og heilhlíf	4, 5

9. Settu prófefnarör án tappa í rörahaldarann á eftirfarandi hátt og smelltu síðan á **OK** (í lagi).

Stærð sýnarunu	Haldari Tegund	Rás	Hlutur	Staðsetning stöðu
24, 48, 96	Rör	46	DNA-magngreiningarstaðall	1
			DNA-magngreiningarprófefni	2

10. Settu ílátin með prófefnunum á prófefnahaldarann eins og hér segir og veldu síðan **OK** (í lagi).

Stærð sýnarunu	Haldari Tegund	Rás	Hlutur	Staðsetning stöðu
24, 48, 96	Prófefni	47	Nýtt ílát fyrir prófefni (tómt)	1
			16 ml Resuspension Buffer	2

11. Ef þú stöðvaðir aðferðina eftir undirbúning safns skaltu setja talda odda á oddahaldarana á eftirfarandi hátt.

Stærð sýnarunu	Haldari Tegund	Rás	Hlutur	Staðsetning stöðu
24, 48, 96	Oddur	49–54	1.000 µl oddar	1
			300 µl oddar	2
			50 µl oddar	3

12. Sláðu inn staðsetningu fyrsta og síðasta oddsins fyrir hvern oddarekka og veldu síðan **OK** (í lagi).
13. Gakktu úr skugga um að haldararnir, rannsóknarbúnaðurinn og prófefnin séu sett í eins og tilgreint er og veldu síðan **OK** (í lagi) á skjánum Quant Deck Verification (staðfesting á magngreiningardekki).
14. Bíddu eftir að sjálfvirkri athugun á rúmmáli prófena ljúki.
15. Fylgstu með ML STAR á meðan sjálfvirku aðgerðirnar eru framkvæmdar.
16. Þegar verkflæðisstjórnin óskar eftir því skaltu ganga úr skugga um að ekkert sé fyrir hleðsludekkinu á ML STAR svo ML STAR geti affermt haldarana.
17. Veldu **Unload** (Afferma) til að afferma dekkið.

18. Affermdu safnplötuna.
  - a. Athugaðu hvort sama rúmmál sé í hverjum brunni.
  - b. Innsiglaðu safnplötuna og geymdu við stofuhita þar til greiningu á gögnum flúrskímumælingu er lokið.
19. Affermdu restina af plötunum með 96 brunnum og athugaðu hvort sama rúmmál sé í hverjum brunni. Mikill munur á rúmmáli getur bent til vandamála í pípettararskrefunum.
20. Affermdu plötuna með 384 brunnum úr og athugaðu hvort vökvi sé í viðeigandi brunnum.
21. Innsiglaðu plötuna með þynnuinnsigli.
22. Settu hana í skilvindu við 1.000 × g í 20 sekúndur.
23. Ræktaðu við stofuhita í 10 mínútur og verðu fyrir ljósi.
24. Affermdu alla haldara út.
25. Hreinsaðu dekkið á ML STAR og veldu síðan **OK** (Í lagi).

**VARÚÐ**

Ekki farga prófunarefnunum fyrir magngreiningu fyrr en gagna hefur verið aflað. Þú þarft prófefnin ef þú þarft að endurtaka magngreininguna.

26. Eftir kvíun skaltu fjarlægja þynnuinnsiglið og setja plötuna með 384 brunnum á örplötulesarann. Gættu þess að nota fjólubláa breytinn (hlutnúmer: 0310-4336) frá Molecular Devices (sameindatæki) eða sambærilegt ef við á, eftir því hvaða tæki er notað.
  - Gakktu úr skugga um að A1 sé efst í vinstra horninu þegar þú setur hana í.
27. Tvíveldu VeriSeq NIPT sniðmátið til að opna það í SoftMax Pro.
28. Veldu **New Experiment** (Ný tilraun) í flípanum Home (Heima).
29. Veldu **Read** (Lesi).
30. Flyttu gögnin út á XML-sniði á eftirfarandi hátt.
  - a. Hægriveldu **Plate** (Plata) og veldu síðan **Rename** (Nefna aftur).
  - b. Skannaðu strikamerkið á magngreiningarplötunni og veldu síðan **OK** (Í lagi).
  - c. Efst í vinstra horninu á skjánum skaltu velja plötutáknið og velja síðan **Export** (Flytja út) af valmyndinni.
  - d. Hakaðu við gátreitinn **Expt name** (Heiti útflutnings), stilltu valkostinn fyrir dagsetningu plötu á raw (hrátt), stilltu úttakssniðið á XML og veldu síðan **OK** (Í lagi).
  - e. Stilltu slóð og heiti úttaksskrárinnar og veldu síðan **Save** (Vista).  
Hamilton-tölvan verður að geta nálgast staðsetninguna fyrir skrána. Ekki nota bil í heiti eða slóð skráarinnar.

## Greining

1. Á ML STAR, á upplýsingaskjánum fyrir skanna, sláðu inn auðkenni flúrskímumælisins.
2. Sláðu inn athugasemdir um keyrslu flúrskímumælisins og veldu síðan **OK** (Í lagi).
3. Farðu í \*.xml magngreiningarskrána sem inniheldur flúrskímumæligögnin og veldu síðan **OK** (Í lagi).
4. Farðu yfir staðalkúrfuna og niðurstöður greiningar á þéttni sýnis og veldu síðan **OK** (Í lagi).

5. Ef þú verður að skanna plötuna aftur skaltu velja **Endurskönnun**.  
Sýnin eru tíma- og ljósnæm. Framkvæmið endurskönnun strax ef þörf krefur.
6. Sláðu inn athugasemdir við viðkomandi brunna og veldu síðan **OK** (Í lagi).
7. Leggðu mat á niðurstöðurnar og haltu áfram eins og hér segir.
  - Ef niðurstöðurnar standast forskriftina skal halda áfram í [Samnýta söfn á síðu 36](#). Fyrir forskriftir sjá magngreiningargæðaeftirlit í töflu um mælikvarða og mörk í [Leiðarvísir fyrir hugbúnað VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 \(skjal númer 1000000067940\)](#).
  - Ef niðurstöðurnar samræmast ekki forskriftinni hættir kerfið við aðferðina. Endurtaktu magngreiningarferlið frá og með [Undirbúningur á síðu 32](#).
8. Framkvæmdu eitt af eftirfarandi skrefum:
  - Til að halda áfram í [Samnýta söfn á síðu 36](#) skaltu velja **Já**.
  - Veldu **Exit** (Hætta) til að hætta.

### ÖRUGGUR STAÐUR TIL AÐ HÆTTA

Ef þú ert að hætta skaltu innsigla safnplötuna fyrir geymslu. Safnplatan helst stöðug í allt að 7 daga samanlagt í geymslu við -25°C til -15°C.

## Samnýta söfn

### Undirbúningur

1. Undirbúðu eftirfarandi prófefni:

Prófefni	Geymsla	Leiðbeiningar
Hybridization Buffer	-25°C til -15°C	Þíddu efnin við stofuhita. Hvirfilblandaðu til að blanda. Settu efnin aftur í geymslu eftir notkun.

2. Ef safnplatan var geymd í frysti skaltu undirbúa hana á eftirfarandi hátt.
  - a. Gakktu úr skugga um að hún hafi ekki verið geymd lengur en í 7 daga og þíddu hana við stofuhita.
  - b. Hvirfilblandaðu við 1.500 snúninga á mínútu í 1 mínútu.
  - c. Settu hana í skilvindu við 1.000 × g í 20 sekúndur.
  - d. Notaðu pípettu til að blanda.
3. Merktu tómt safnrör, Samsafn A. Fyrir 96 sýni, merktu annað tómt safnrör, Samsafn B.
4. Geymdu eftirfarandi eðlisbreytingarformúlu á hitahringrásartækinu með upphituðu loki.
  - a. Veldu forhitaða lokið og stilltu hitann á 102°C.
  - b. Stilltu viðbragðsrúmmálið á 50 µl.
  - c. Stilltu ramphraðann á hámark (≥ 2°C á sekúndu).
  - d. Ræktaðu við 96°C í 10 mínútur og síðan við 4°C í 5 sekúndur.
  - e. Hafðu við 4°C hitastig.

## Ferli

- Settu safnplötuna á forforrituðu hitahringrásarvélina og keyrðu eðlisbreytingarforrit. Ekki eðlisbreyta safnplötunni fyrr en magngreining hefur staðist mæligildi gæðaeftirlitsins, þar sem þú gætir viljað endurtaka magngreiningu.
- Settu safnplötuna í skilvindu við 1.000 × g í 20 sekúndur.
- Veldu **Í lagi** til að byrja að samnýta söfn.
- Ef VeriSeq NIPT Method er ekki þegar opið:
  - Opnaðu AppLauncher og veldu **VeriSeq NIPT Method**.
  - Sláðu inn auðkenni rununnar og notandanafn og smelltu síðan á **OK** (Í lagi).
- Veldu þéttni samsafnsins og veldu síðan **OK** (í lagi).  
Markþéttni klasans er 220–260 K/mm<sup>2</sup>.

**ATHUGASEMD** Það gæti þurft að auka þéttleika og/eða samnýtingarrúmmál sýnanna fyrir runur með 24 sýnum til að viðhalda svipaðri klasaþéttni og fæst í runum með 48/96 sýnum.

- Ef verkflæðisstjórnin óskar eftir því skaltu framkvæma eitt af eftirfarandi skrefum:
  - Til að hlaða inn sýnablaði skaltu velja sýnablaðið sem tengist rununni og velja síðan **Load** (Setja).
  - Til að nota sjálfgefin gildi í kerfinu fyrir hinar gerðir sýna, hvort greina eigi frá kynlitningum eða gerð skimun, skaltu velja **Use Default** (Nota sjálfgefið) fyrir hverja stillingu.  
Sjá frekari upplýsingar um sýnablað í *Leiðarvísir fyrir hugbúnað VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 (skjal númer 1000000067940)*.
- Veldu **Start** (Byrja) til að hefja tímamælingu á eðlisbreytingarplötunni.
- Settu talda oddana á oddhaldarana á eftirfarandi hátt.

Stærð sýnarunu	Haldari Tegund	Rás	Hluttur	Staðsetning stöðu
24, 48, 96	Oddur	7–12	50 µl síuoddar	1

- Settu eðlisbreyttu safnplötuna (með strikamerkið til hægri) á Multiflex-haldarann eins og hér segir og veldu síðan **OK** (Í lagi).

Stærð sýnarunu	Haldari Tegund	Rás	Hluttur	Staðsetning stöðu
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Eðlisbreytt safnplata (strikamerkt)	1

10. Settu safnrörin í rörhaldarana á eftirfarandi hátt og smelltu síðan á **OK** (í lagi).

Stærð sýnarunu	Haldari Tegund	Rás	Hlutur	Staðsetning stöðu
24, 48	Rör	46	Nýtt 2 ml rör, samsafn A	1
96	Rör	46	Nýtt 2 ml rör, samsafn A	1
			Nýtt 2 ml rör, samsafn B	2

11. Settu ílátin með prófefnunum á prófefnahaldarann eins og hér segir og veldu síðan **OK** (í lagi).

Stærð sýnarunu	Haldari Tegund	Rás	Hlutur	Staðsetning stöðu
24, 48, 96	Prófefni	47	3 ml Hybridization Buffer	1

12. Settu talda oddana á oddhaldarana á eftirfarandi hátt.

Stærð sýnarunu	Haldari Tegund	Rás	Hlutur	Staðsetning stöðu
24, 48, 96	Oddur	49–54	1.000 µl síuoddar	1
			300 µl síuoddar	2
			50 µl síuoddar	3

13. Sláðu inn staðsetningu fyrsta og síðasta oddsins fyrir hvern oddarekka og veldu síðan **OK** (í lagi).

14. Gakktu úr skugga um að haldarar, rannsóknarbúnaður og prófefni séu sett í eins og fram kemur.

15. Á skjánum Pooling Deck Verification (Staðfesting á samnýtingardekki) skaltu velja **OK** (í lagi).

16. Fylgstu með ML STAR á meðan sjálfvirku aðgerðirnar eru framkvæmdar.

17. Sláðu inn athugasemdir við viðkomandi brunna og veldu síðan **OK** (í lagi).

18. Þegar verkflæðisstjórnin óskar eftir því skaltu ganga úr skugga um að ekkert sé fyrir hleðsludekkinu á ML STAR svo ML STAR geti affermt haldarana.

19. Veldu **Unload** (Afferma) til að afferma dekkið.

20. Affermdu rörhaldarann.

21. Lokaðu sérhverju safnröri, hvirfilblandaðu og settu síðan í skilvindu í stutta stund.

22. Veldu **OK** (í lagi).

23. Raðgreindu söfn eins fljótt og auðið er eftir samnýtingu. Innsiglaðu safnplötuna og geymdu hana við -25°C til -15°C í allt að 7 daga til að hægt sé að endurtaka samnýtingu.

## ÖRUGGUR STAÐUR TIL AÐ HÆTTA

Ef þú ætlar að hætta skaltu setja lok á safnrörin og geyma þau við -25°C til -15°C í allt að 7 daga.

## Undirbúa samsöfn fyrir raðgreiningu

### Undirbúningur

1. Undirbúðu eftirfarandi prófefni:

Prófefni	Geymsla	Leiðbeiningar
Samsafnarör	-25°C til -15°C	Ef það var í geymslu skaltu þíða það við stofuhita. Hvirfilblandaðu stuttlega. Settu það stuttlega í skilvindu.

2. Undirbúðu kerfi til háhraðaraðgreiningar með því að fylla út eftirfarandi reiti í einingunni Local Run Manager VeriSeq NIPT-eining:

- a. Heiti keyrslu
- b. [Valfrjálst] Lýsing á keyrslu
- c. Strikamerki samsafns



#### VARÚÐ

Strikamerkið samsafns sem slegið er inn í Local Run Manager eining verður að passa við strikamerkið sem slegið er inn í verkflæðisstjórnann. Röngum keyrslustillingum er hafnað af greiningarhugbúnaðinum og þá þarf að endurtaka raðgreiningu.

Frekari upplýsingar um notkun Local Run Manager VeriSeq NIPT-eining má finna í *Leiðarvísir fyrir hugbúnað VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 (skjal númer 1000000067940)*.

### Ferli

1. Blandið eftirfarandi rúmmáli saman við prófefnishylkið og blandið síðan með pípettu.
  - Hybridization Buffer (900 µl)
  - 450 µl Samsafn A (450 µl)
2. Haltu áfram með raðgreiningu með því að nota tilvísunarleiðbeiningarnar fyrir háhraðaraðgreiningarkerfi. Fyrir NextSeq 550Dx, sjá *Tækjaleiðbeiningar fyrir NextSeq 550Dx (skjal nr. 1000000009513)* (eða sjá viðkomandi fylgiseðil eins og fram kemur á Illumina hjálparsíðunni [www.support.illumina.com](http://www.support.illumina.com)).
3. Staðfestu rétta keyrslustillingu þegar beðið er um það.
4. Ef nauðsyn krefur skaltu endurtaka þetta ferli fyrir samsafn B.
  - Til að ná markþéttleika klasa er hægt að samnýta safnplötuna aftur með því að nota mismunandi samnýtingarþéttni á Hamilton. Endurtekin samnýting ógildir upprunalegu samnýtinguna.
  - Einnig er hægt að breyta hlutfallinu milli safns og HT1 (450 µl + 900 µl) til að ná markþéttleika klasa.

## Háhraðaraðgreining

Hægt er að nota VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 með kerfi til háhraðaraðgreiningar með eftirfarandi forskriftum:

- Getur lesið 2x36 endaparaða lestra
- Samhæft við vísisbreytana í Sett fyrir sýnaundirbúning VeriSeq NIPT
- Tveggja rása efnafræði
- Sjálfvirk framleiðsla á BCL (\*.bcl) skrám (hrágögn úr raðgreiningartæki)
- 400 milljónir paraðaðir endalestrar í hverri keyrslu
- Samhæft við VeriSeq NIPT Assay Software útgáfa 2

NextSeq 550Dx er samhæft við VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2

## Greining raðgreiningargagna

Eftir að raðgreiningunni er lokið eru raðgreiningargögnin sjálfkrafa send til VeriSeq NIPT Assay Software útgáfa 2 til greiningar og skýrslugerðar. Skýrslan inniheldur flokkun fyrir hvert sýni í rununni ásamt mati á öllum mæligildum gæðaeftirlits með keyrslunni. Greiningarferlið frá því að raðgreiningu er lokið þar til lokaniðurstöður eru tilbúnar tekur um það bil 4 klukkustundir fyrir 48 sýna runu. Frekari upplýsingar um gagnagreiningu og úttaksskrána er að finna í *Leiðarvísir fyrir hugbúnað VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 (skjal númer 1000000067940)*.

## Túlkun niðurstaðna

Reikniritið í VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 notar háþróað tölfræðilíkan sem sameinar nokkrar mismunandi gerðir upplýsinga úr þöruðum brotum úr endaraðgreindum söfnum. Þetta líkan er notað til að finna svæði í erfðamenginu sem eru van- eða offramsett í safni hvers sýnis. Mikilvægt er að þetta líkan tekur tillit til þess hvort umfang van- eða offramsetningar samræmist megindelega mislitnunarátburði í erfðamengi fósturs á því stigi hlutfalls erfðaeftnis frá fósturi sem áætlað var fyrir safnið.

Þöruð endaraðgreiningargögn eru samræmd við viðmiðunarerfðamengið (HG19) fyrir alla litninga. Einstökum, samræmdum lestrum sem ekki eru tvöfaldaðir er safnað saman í 100 kb hólf. Samsvarandi fjöldi hólfra er leiðréttur m.t.t. GC-skekkju og samkvæmt áður staðfestri svæðisbundinni þekju í erfðamenginu. Með því að nota slíkan staðlaðan fjölda hólfra eru tölfræðileg stig fengin fyrir hvern A-litning með því að bera saman þekjusvæðin sem geta orðið fyrir áhrifum mislitnunar við afgang A-litninganna. Log-líkindahultfall (LLR, Log-Likelihood Ratio) er reiknað fyrir hvert sýni með því að taka tillit til þessara þekjutengdu stiga og áætlaðs hlutfalls erfðaeftnis frá fósturi. LLR er líkurnar á að sýni verði fyrir áhrifum miðað við framkomna þekju og hlutfall erfðaeftnis frá fósturi samanborið við líkurnar á að sýni verði ekki fyrir áhrifum miðað við sömu framkomnu þekju. Við útreikning á þessu hlutfalli er einnig tekið tillit til áætlaðrar óvissu í hlutfalli erfðaeftnis frá fósturi. Við síðari útreikninga er náttúrulegi lógaritminn af hlutfallinu notaður. Assay Software metur LLR fyrir hvern marklitning og hvert sýni til að ákvarða um mislitun.



Við gerð runu verður þú að skilgreina tegund sýnisins (einburi eða tvíburar), tegund skimunar (grunnskimun eða heildarerfðamengið) og hvers konar tilkynning fyrir kynlitninga (Já, Nei og SCA) óskast fyrir hvert sýni. Saman ákvarða þessir valkostir upplýsingarnar sem greint er frá fyrir hvert sýni.

Gerð skimunar ákvarðar skimunargerðin hvaða frávikum í sjálflitningum er greint frá. Aðeins er greint frá þrlitnun fyrir heila litninga sem nær til litninga 13, 18 og 21 við grunnskimun. Greint er frá heildar- eða hlutaúrfellingu eða -tvöföldun á sérhverjum sjálflitningi við skimun á heildarerfðamenginu. Lengd minnstu tilkynningarskyldu úrfellingar úr eða tvöföldun á litningi er 7 Mb.

Hægt er að slökkva á að greint sé frá kynlitningum fyrir einburasýni. Í einburasýnum getur þú einnig stillt hvort greint sé frá mislitnun í kynlitningum, annaðhvort ásamt því að greina frá kyni eða ekki.

Í tvíburasýnum takmarkast niðurstaðan við að greina frá hvort Y-litningur er í safninu eða ekki, ef Yes (Já) er valið við hvort greint skuli frá kynlitningum. Ekki er hægt að greina frá mislitnum í kynlitningum í tvíburasýnum.

**ATHUGASEMD** Þegar greint er frá sama kyni fyrir öll sýni í runu, mun villutilkynning í tölvupósti/vefviðmóttinu vara notandann við með viðvörðun um íblöndum/mengun sýnisins. Runan verður ógilt og engin skýrsla er búin til. (Gildir fyrir netþjónahugbúnað útgáfa 2.2 og síðari útgáfur fyrir VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2.)

Niðurstaðan ANOMALY DETECTED (MISLITNUN GREIND) gefur til kynna að niðurstaða skimunar á sýninu sé jákvæð m.t.t. einnar eða fleiri mislitnunar í samræmi við valda tegund skimunar og hvort greint skuli frá kynlitningum. Þegar mislitnun greinist lýsir skýrslan mislitnuninni með frumuerfðafræðilegum táknum.

VeriSeq NIPT Assay Software útgáfa 2 notar tölfraði sem búin er til við raðgreiningu til að gefa upp mat á hlutfalli erfðaefnis frá fóstri (FFE, fetal fraction estimation) fyrir hvert sýni. FFE er áætlaður cfDNA-þáttur fósturs sem endurheimtur er í prófinu og greint er frá honum með námundaðri prósentu fyrir hvert sýni.

Meðalstaðalfrávik þessa mats fyrir öll sýni er 1,3%. Ekki skal nota FFE eitt og sér til að útiloka sýni þegar greint er frá niðurstöðum.

Til að framkvæma litningaframsetningarköll, notar VeriSeq NIPT Assay Software útgáfa 2 einstaklingsbundið áreiðanleikapróf fyrir mislitnun hjá fósturum (iFACT, individualized Fetal Aneuploidy Confidence Test), sem er breytilegt þröskulds mæligildi sem gefur til kynna hvort kerfið hafi myndað nægilega raðgreiningarþekju miðað við áætlað hlutfall erfðaefnis frá fóstri fyrir hvert sýni. Aðeins er greint frá neikvæðum köllum ef sýnið nær iFACT-þröskuldinum. Ef sýni nær ekki þessum þröskuldi birtir mat gæðaeftirlitsins FAILED iFACT (STÓÐST EKKI iFACT) og kerfið skilar ekki niðurstöðum.

Auk iFACT, metur VeriSeq NIPT Assay Software útgáfa 2 nokkur önnur mæligildi meðan á greiningu stendur. Meðal viðbótarmæligilda eru mat á einsleitni þekju á svæðum viðmiðunarerfðamengisins og dreifingu lengda cfDNA-brota. Mat gæðaeftirlitsins sýnir annað hvort flagg frá gæðaeftirlitinu eða að gæðaeftirlitið tókst ekki fyrir mæligildi utan viðunandi marka. Ef gæðaeftirlitið tekst ekki býr kerfið ekki til niðurstöðu fyrir sýnið. Ef sýni stenst ekki gæðaeftirlit er hægt að endurtaka vinnslu að því tilskildu að nægilegt magn plasma sé í blóðsöfnunarrörinu.

VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 býr til gögn sem nota má í lokaskýrslu. Það býr ekki til lokaskýrslu fyrir sjúklinginn. Viðskiptavinir bera ábyrgð á uppsetningu og innihaldi lokaskýrslunnar sem á að afhenda lækni á umönnunarstað. Illumina ber ekki ábyrgð á nákvæmni orðalagsins í lokaskýrslu til viðskiptavinar.

**VARÚÐ**

Athugaðu áætluð hlutföll erfðaefnis frá fóstri fyrir öll sýni. Ef áætluð hlutföll erfðaefnis frá fóstri eru svipuð fyrir öll sýni í keyrslu, gætu sýni hafa blandast og það haft áhrif á niðurstöður. Hafðu samband við tæknilega aðstoð hjá Illumina til að fá aðstoð við úrræðaleit.

## Virknieiginleikar

Eftirfarandi gögn sem tilgreind eru í köflum samantektar á virknimati voru búin til með því að nota aðferðarlýsingar og efni sem lýst er í notkunarleiðbeiningum og byrja með blóðvökva. Öll raðgreiningargögn fyrir þennan hluta voru búin til á NextSeq 500/550 raðgreiningarkerfi eða NextSeq 550Dx Sequencing System með eftirfarandi stillingum:

	NextSeq 500/550	NextSeq 550Dx
Hugbúnaður í tæki	NextSeq Control Software 4.0	NextSeq Operating Software 1.3
Útgáfa prófefnasetts	NextSeq 500/550 High Output útgáfa 2.5 (75 lotur) Reagent Kit	NextSeq 550Dx High Output útgáfa 2.5 (75 lotur) Reagent Kit
Raðgreiningaraðferð	2x36 raðgreining með endapörun (e. paired-end), keyrð í háafkastastillingu	2x36 raðgreining með endapörun (e. paired-end), keyrð í háafkastastillingu

## Klínísk rannsókn

Sýnt var fram á klíniska nákvæmni VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 með því að meta blóðvökvasýni úr þunguðum konum sem gengu með einbura eða tvíbura. Sýni voru fengin úr óauðkennanlegum blóðvökvasýnum sem höfðu áður verið unnin úr heilblóðsýnum úr útæðum. Yfir 45.000 sýni voru fyrirhuguð til notkunar í rannsókninni. Þessi sýni höfðu áður gengið undir fósturskimun þar sem leitað var eftir mislitnun litninga fósturs og úrfellingum og tvöföldunum að hluta sem voru 7 Mb eða meira. Öll sýni úr þungunum sem urðu fyrir áhrifum og undirhópur samfelldra sýna úr þungunum sem ekki urðu fyrir áhrifum voru metin hæf til prófunar ef klínískar niðurstöður voru tiltækar og skilyrði fyrir sýni voru uppfyllt. Alls voru 2.335 sýni í greiningarsafninu fyrir prófun. Úr þessu safni voru 2.328 sýni úr einburapungunum og sjö sýni úr tvíburapungunum.

Af þessum sýnum stóðust 28 (1,2%, 28/2.335) ekki fyrstu umferð gæðaeftirlits prófunar við greiningu á fullnum raðgreiningargögnum:

- 27 iFACT-villur (eitt XO, 26 sem urðu ekki fyrir áhrifum)
- Ein villa vegna gagna utan áætlaðra marka

## Lýðfræðilegar upplýsingar og einkenni meðgöngu

Aldur móður, meðgöngualdur og þriðjungur meðgöngu eru tekin saman í [Tafla 7](#) fyrir sýnin í skimun á heildarerfðamengi, þar á meðal þekkt tiglunarsýni (e. mosaic samples). Meirihluti (98%) prófana eru frá fyrsta þriðjungu meðgöngu.

Lýðfræðilegar upplýsingar voru metnar á milli grunnskímunarhópa og hópa sem fóru í skímun á heildarerfðamengi og sýndu engan tölfræðilegan mun. Lýðfræðilegar upplýsingar og einkenni meðgöngu voru svipuð hvort sem þekkt tiglunarsýni voru tekin með eða útilokuð.

Tafla 7 Lýðfræðilegar upplýsingar og einkenni meðgöngu

Samantekt tölfræði	Heildarerfðamengi (þar á meðal þekkt tiglun)
Fjöldi sýna	2.307*
<b>Aldur móður í árum</b>	
Meðaltal	35,08
Staðalfrávik	4,04
Miðgildi	34,95
25. hundraðshlutamark, 75. hundraðshlutamark	32,31; 37,79
Lágmark, hámark	20,22; 53,02
<b>Meðgöngualdur við blóðsýnatöku – vikur</b>	
Meðaltal	10,93
Staðalfrávik	1,20
Miðgildi	10,57
25. hundraðshlutamark, 75. hundraðshlutamark	10,29; 11,14
Lágmark, hámark	10,00; 27,86
<b>Þriðjungur meðgöngu – n (%)</b>	
< Fyrsti (<14 vikur)	2.252 (98%)
Annar	54 (2%)
Þriðji (≥27 vikur)	1 (0%)

\*Lokasýni sem eru birt innihéldu 7 tvíbura

## Klínísk virkni

Niðurstöður samkvæmt VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 voru bornar saman við niðurstöður klínískra viðmiðunarstaðla. Öll rannsóknarsýnin voru með niðurstöður í samræmi við klíníska viðmiðunarstaðla (klínísk sannindi) sem tengjast mislitnunarstöðu litninga hjá fóstri, úrfellingum og tvöföldunum að hluta sem eru 7 Mb eða meira. Niðurstöður í samræmi við klíníska viðmiðunarstaðla fyrir sýni sem tekin voru með í þessari rannsókn

voru háðar niðurstöðum litningagreiningar eða nýburaskoðunar með NIPT-neikvæðri skimun sem byggðist á háhraðaraðgreiningu (NGS, Next Generation Sequencing). Þjálfað starfsfólk rannsóknarinnar framkvæmdi flokkun á stöðluðum klínískum viðmiðunargögnum í samræmi við læknisfræðilegt kóðunarskjal frá bakhjarlinum. Litningagreiningaraðferðir voru m.a. greining á kjarnagerð (e. karyotyping), flúrljómandi staðbundin þáttatenging (FISH, fluorescence in situ hybridization) eða CMA-greining (e. comparative genomic hybridization chromosome microarray). Litningagreining var gerð á sýnum úr útæðablóði eða munnvatni nýbura eða ungbarna, þungunarvefjum (POC, products of conception), líknarbelgsfrumum (e. amniocytes), æðabelgskögr (e. chorionic villi), fylgjuvefjum eða naflastrengsblóði eftir fæðingu.

Tiglun er skilgreind sem tvær eða fleiri frumulínur með mismunandi litningasamsetningu hjá einstaklingi. Frumulínurnar eiga uppruna sinn í sömu okfrumu. Tegund og stig tiglunar er mismunandi og er háð tímasetningu tiglunartilvika fósturvísismyndunar og þroskaskeiðum fósturs. Mismunandi tegundir tiglunar koma fram í greiningum fyrir fæðingu á dreifingu óeðlilegra frumulína samanborið við dreifingu eðlilegra frumulína yfir frumunæriþekju, bandvefskím eða fóstur.<sup>10</sup> Þrátt fyrir að tiglun geti komið fram með hvaða litningafráviki sem er, er algengi tiglunar í sjaldgæfum þrístæðum hærra en í þrístæðum litninga 21, 18 og 13 (T21, T18 og T13).<sup>11</sup> Í virknimatinu voru tiglunartilvik tekin með í greiningu á heildarerfðamengi, þar sem tilgangur þessarar skimunargerðar fyrir þetta próf er að greina sjaldgæfa mislitnun á sjálfslitningum (RAA, rare autosomal aneuploidies).

## Virgni grunnskimunar

Frávik við grunnskimun eru meðal annars T21, T18 og T13. Samtals voru 2.243 einbura- og tvíburasýni tekin með í greiningunni. Allar sjö tvíburaþunganirnar greindust réttilega sem T21 og eru ekki tilgreindar í eftirfarandi töflu.

Tafla 8 Næmi og sértæki VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 til að greina þrístæður 21, 18 og 13 í grunnskimun fyrir einburaþunganir (að undanskildri þekktri tiglun)

	T21	T18	T13
Næmi	> 99,9% (130/130)	> 99,9% (41/41)	> 99,9% (26/26)
Tvíhliða 95% öryggisbil	97,1%; 100%	91,4%; 100%	87,1%; 100%
Sértæki	99,90% (1.982/1.984)	99,90% (1.995/1.997)	99,90% (2.000/2.002)
Tvíhliða 95% öryggisbil	99,63%; 99,97%	99,64%; 99,97%	99,64%; 99,97%

Frammistaða prófunarinnar í grunnskimuninni, eins og sýnt er í [Tafla 8](#) er reiknuð út án þess að undanskilja undirhóp af 64 sýnum sem eru fyrir áhrifum af RAA, hlutaúrfellingum eða tvöföldunum sjálfslitninga (autosomal partial deletions) eða þekktri tiglun. Þessi 64 sýni innihéldu átta T21 og þrjár T18 tiglianir. Fimm af þessum 11 sýnum reyndust vera með frávikum sem greint var af VeriSeq NIPT Assay Software útgáfa 2.

## Virkni heildarerfðamengisskimunar

Fyrir skimun á heildarerfðamengi ná öll frávik yfir þrístæður, einstæður og úrfellingar og tvöfaldanir að hluta sem eru 7 Mb eða meira. Sýni fyrir skimun heildarerfðamengis innihéldu 36 sýni með þekkta tiglun. Alls voru 2.307 einbura- og tvíburasýni prófuð. Allar sjö tvíburapunganirnar greindust réttilega með frávik í litningi 21 og er ekki greint frá þeim í eftirfarandi töflum.

## Virkni heildarerfðamengisskimunar við hvaða frávik sem er

Tafla 9 Næmi og sértæki VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 við greiningu hvaða frávíks sem er við heildarerfðamengisskimun (þ.m.t. talin þekkt tiglun)

	Næmi	Sértæki
Áætlað % (n/N)	95,5% (318/333)	99,34% (1.954/1.967)
Tvíhliða 95% öryggisbil	92,7%; 97,3%	98,87%; 99,61%

## Virkni heildarerfðamengisskimunar við sjaldgæfa mislitnun í sjálflitningi

Tafla 10 Næmi og sértæki VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 við greiningu sjaldgæfrar mislitnunar í sjálflitningi (RAA, Rare Autosomal Aneuploidy) við heildarerfðamengisskimun (þ.m.t. talin þekkt tiglun)

	Næmi	Sértæki
Áætlað % (n/N)	96,4% (27/28)	99,80% (2.001/2.005)
Tvíhliða 95% öryggisbil	82,3%; 99,4%	99,49%; 99,92%

## Virkni heildarerfðamengisskimunar fyrir hlutúrfellingar og -tvöfaldanir

Tafla 11 Næmi og sértæki VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 fyrir hlutúrfellingar og -tvöfaldanir upp á 7 Mb eða meira í heildarerfðamengisskimun (þ.m.t. talin þekkt tiglun)

	Næmi	Sértæki
Áætlað % (n/N)	74,1% (20/27)	99,80% (2.000/2.004)
Tvíhliða 95% öryggisbil	55,3%; 86,8%	99,49%; 99,92%

## Munur á virkni milli grunnskimunar og skimum á heildarerfðamenginu

Stigunaraðferðin fyrir algengar þrístæður og mislitnun á kynlitningum er sú sama fyrir grunnskimanir og heildarerfðamengisskimanir. Grunnskimunin beitir aðeins algrími á T21, T18 og T13. Hins vegar víkkar heildarerfðamengisskimunin út þessa aðferðafræði til mats á öllum þrístæðum, sjaldgæfri mislitnun á A-litningum og úrfellingum og tvöföldunum að hluta.

Tvenns konar munur er á tilkynningum um virkni á milli grunn- og heildarerfðamengisskimana sem lýst er. Í fyrsta lagi voru sýni með þekkta tiglun tekin með bæði fyrir algengar þrístæður og fyrir sjaldgæfa mislitnun á A-litningum og úrfellingar og tvöfaldanir að hluta fyrir virknimælingar á heildarerfðamengisskimunum. Í öðru lagi

getur heildarerfðamengisskimun frekar greint tvöföldun eða úrfellingu að hluta en heila þrístæðu. Hægt er að sjá hvort um er að ræða heila þrístæðu auk tvöföldunar eða úrfellingar að hluta með því að skoða LLR-stig sem gefin eru upp í viðbótarskýrslunni.

## Tiglun tekin með í skimun á heildarerfðamengi

Tiglun er talin upp sem takmörkun á þessu prófi. Þegar tiglun er til staðar dregur úr merkjum fósturs um frávik og því getur verið erfiðara að greina þau án þess að skerða heildarsértæki prófsins. Hins vegar, vegna þess að tiglun skiptir meira máli fyrir stækkað efni, voru sýni með tiglun tekin með í heildarerfðamengisskimuninni.

Af þeim 64 sýnum sem tekin voru með í heildarerfðamengisskimuninni en ekki grunnskimuninni voru 36 sýni greind með tiglun samkvæmt klínískum viðmiðunarstaðli. Af þessum 36 sýnum pössuðu 23 ákvarðanir við klínískan viðmiðunarstaðal.

## Úrfelling eða tvöföldun að hluta samanborið við greiningu á mislitnun í heilum litningum

VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 býður upp á valmyndir fyrir bæði grunnskimun og skimun á heildarerfðamengi. Við grunnskimun er aðeins greint frá niðurstöðunni „ANOMALY DETECTED“ (FRÁVIK GREINDIST) þegar full mislitnun greinist á litningum 21, 18 eða 13 og ef allir gæðaeftirlitsmælikvarðar eru uppfylltir. Við skimanir á heildarerfðamengi greinir kerfið mislitnun á öllum A-litningum og tilvik um úrfellingu og tvöföldun að hluta sem eru að minnsta kosti 7 Mb.

Þegar heildarerfðamengisskimun er notuð, í tilfellum þar sem tilfelli í heilum litningi sem og CNV-tilfelli innan sama litnings fara yfir LLR-mörkin, setur kerfið tilkynningar um tilvik úrfellingar eða tvöföldun að hluta í forgang fram yfir ákvörðun á heilum litningi ef stærð úrfellingar eða tvöföldunar að hluta nær yfir u.þ.b. 75% eða minna af litningnum sem tilvikið greindist á. Ef svæði fyrir úrfellingu og tvöföldun að hluta sem greinist er stærra en 75% af stærð litningsins, er greint frá tilvikinu sem heildarþrístæðu eða heildareinstæðu fyrir allan litninginn ef á sama tíma er farið yfir LLR-mörkin fyrir allan litninginn. Af þessari ástæðu geta verulega stórar úrfellingar og tvöfaldanir sem eru minni en eða jafnar 75% af stærð litningsins bent til mislitnunar á heilum litningi.

Í öllum sýnum er hægt að fá LLR-stig fyrir flokkun heils litnings í viðbótarskýrslunni. Endurskoða skal LLR-stigið með tilliti til tiltekins lokunargildis á **95% greiningarlíkur fyrir meðalsvæði eftir stærð fyrir VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 á síðu 56** áður en niðurstöður eru túlkaðar. Til dæmis styður CNV-kall þar sem LLR-stig á stigi litnings fara yfir viðmiðunarmörkin enn frekar við túlkun sem samræmist mislitnun í öllum litningnum, sjá dæmi í **Tafla 12**.

Í klínísku rannsókninni voru tvö sýni einburapungunar með verulega stórum tvöföldunum (önnur var á litningi 21 og hin á litningi 18) sem voru innan við 75% af hlutfallslegri stærð litningsins (sjá **Tafla 12**). Tilkynnt var um bæði tilvikin sem tvöfaldanir að hluta frekar en heildarþrístæðu fyrir þann litning. LLR-stig fyrir þessi tilvik voru yfir lokunargildum í samræmi við niðurstöðu sem varð fyrir áhrifum af heildarþrístæðu. Þegar um er að ræða annaðhvort tvöföldun að hluta eða ákvörðun á heildarþrístæðu felst eftirfylgni fyrir jákvæða NIPT-ákvörðun í því að bjóða sjúklingi upp á staðfestingarrannsókn með forburðargreiningu.

Tafla 12 Dæmi um stór tvöföldunartilvik sem greinast í heildarerfðamengisskimun

	Klínísk sannindi	Kerfisafköst við heildarerfðamengisskimun	Stærð fráviks (Mb)	% af litningi	LLR-stig
Sýni 1	Þrístæða 21, einburapungun	Tvöföldun að hluta á 21	22,50	48,9	19,43
Sýni 2	Þrístæða 18, einburi	Tvöföldun að hluta á 18	47,00	60,2	12,99

Frekari upplýsingar um gæðaeftirlitsmælingar sem notaðar eru til að tilkynna niðurstöður mislitnunar er að finna í *Leiðarvísir fyrir hugbúnað VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 (skjal númer 1000000067940)*.

## Kynlitningar

Niðurstöður um kynlitninga samkvæmt VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 voru bornar saman við niðurstöður klínískra viðmiðunarstaðla og eru teknar saman í eftirfarandi töflu. Prósentuhlutfall samsvörunar var reiknað fyrir hvern kynlitning innan hversar niðurstöðu samkvæmt klínískum viðmiðunarstaðli. Prósentuhlutfall samsvörunar var reiknað sem fjöldi sýna þar sem VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 kynlitningaákvörðun samsvaraði stöðluðu klínísku viðmiðunarflokkuninni, deilt með heildarfjölda sýna með sömu stöðluðu klínísku viðmiðunarflokkunina.

Tafla 13 Prósentuhlutfall samsvörunar fyrir kynflokkun fósturs\*

Flokkun eftir kyni fósturs		Svipgerð úr læknisskoðun nýbura		Frumuerfðafræðilegar niðurstöður							
Greint	Kjarngerð	Kvenkyns	Karlkyns	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY	Annað**	Vantar
Frávik greindist ekki	XX	997	0	21	0	2	0	0	0	0	0
Frávik greindist ekki	XY	0	966	0	15	0	0	0	0	0	1
Frávik fannst	XO	0	0	0	0	19	0	0	1	0	0
Frávik fannst	XXX	0	0	0	0	0	17	0	0	1	0
Frávik fannst	XXY	0	0	0	0	0	0	23	0	1	0
Frávik fannst	XYY	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0
Samtals		997	966	21	15	21	17	23	12	2	1
Prósentuhlutfal í samsvörunar		100	100	100	100	90,5	100	100	91,7	Á ekki við	Á ekki við

\* Fimm tvíburapunganir með Y voru rétt flokkaðar. Tvær þunganir þar sem Y var ekki til staðar voru rétt flokkaðar.

\*\* Aðrar frumuerfðafræðilegar niðurstöður voru XXXXX og XXYY.

## Jákvætt forspárgildi og neikvætt forspárgildi samkvæmt VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2

Jákvætt forspárgildi (PPV, positive predictive value) og neikvætt forspárgildi (NPV, negative predictive value) prófsins veita upplýsingar um hversu vel prófið nýtist til að taka upplýsta klíníska ákvörðun, byggða á næmi prófsins, sértæki og líkum fyrir prófun um hvort fóstur verði fyrir áhrifum af þrístæðu (algengi). Vegna þess að PPV og NPV eru háð algengi, og algengi þessarar mislitnunar getur verið breytilegt á milli mismunandi hópa einstaklinga, voru PPV og NPV reiknuð út fyrir ýmis sennileg gildi algengis sem byggt á gildum næmis og sértæki sem komu fram við basaskimun (án þekktra tiglunartilvika) í klínísku nákvæmnisrannsókninni. [Tafla 17](#) er byggt á heildarerfðamengisskimun (með þekktri tiglun).

Tafla 14 Algengi þrístæðu 21, PPV og NPV í grunnskimun (að undanskildri þekktri tiglun)

Algengi (%)	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

Tafla 15 Algengi þrístæðu 18, PPV og NPV í grunnskimun (að undanskildri þekktri tiglun)

Algengi (%)	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

Tafla 16 Algengi þrístæðu 13, PPV og NPV í grunnskimun (að undanskildri þekktri tiglun)

Algengi (%)	PPV (%)	NPV (%)
0,01	9,10	>99,99
0,02	16,68	>99,99
0,05	33,37	>99,99



Algengi (%)	PPV (%)	NPV (%)
0,10	50,05	>99,99
0,20	66,73	>99,99

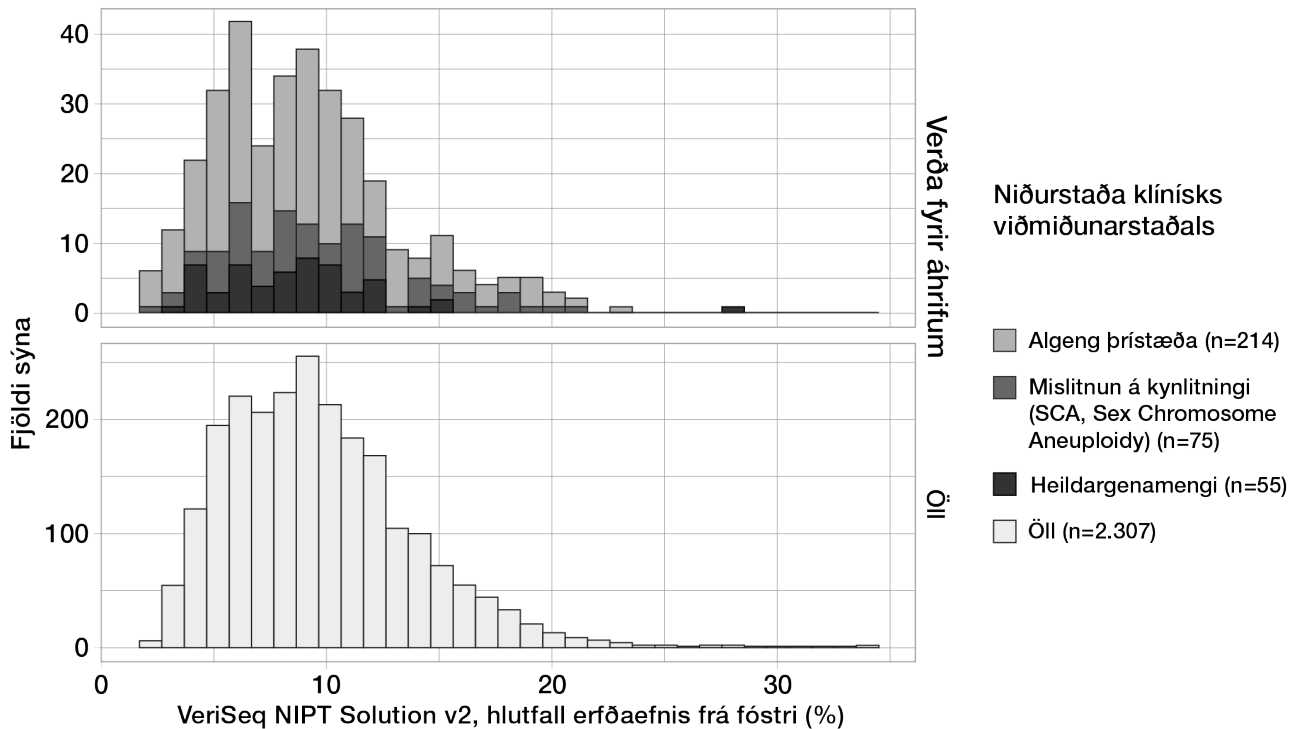
Tafla 17 Algengi hvaða frávíks sem er, PPV og NPV í heildarerfðamengisskimun (þ.m.t. þekkt tiglun)

Algengi (%)	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

### Hlutfallsleg dreifing erfðaefnis frá fósttri

Dreifing áætlaðs hlutfalls erfðaefnis frá fósttri (FF) samkvæmt VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 út frá skimunum á heildarerfðamengi ásamt tiglunartilvikum er sýnd með niðurstöðum flokkunar samkvæmt klínískum viðmiðunarstaðli á [Mynd 1](#).

Mynd 1 Hlutfallsleg dreifing erfðaefnis frá fóstri



5 sýni voru með frávik í fleiri en einum flokki.

Algeng þrístæða felur í sér sýni með þrístæðu 21, 18 og/eða 13.

Heildargenamengi felur í sér sýni með mögnum með aðstoð endurröðunarsíms (RAA, recombinase-aided amplification) eða úrfellingar að hluta og/eða tvöfaldanir að hluta.

Mat á FF var á bilinu 2% til 34% í heild með miðgildið 9% og millifjórðungsbilið (e. interquartile, IQ) 6% til 12%. Miðgildi FF-mats fyrir algengar þrístæður og tilvik sem greindust við heildarerfðamengisskimun er 8% og 9% fyrir mislitnun á kynlitningum. Bil FF-mats var í samræmi fyrir allar niðurstöðurnar. Engin greinileg breyting er á dreifingu FF á milli algengar þrístæða, mislitnunar á kynlitningum, tilvika sem greindust með heildarerfðamengisskimun eða allra sýna í greiningu á heildarerfðamengi.

## Virkni fyrir tvíburapunganir

### Mat á virkni þrístæðu 13, 18 og 21 og Y-litning í tvíburapungunum

Þar sem algengi þrístæðu 21, 18 og 13 er lágt í tvíburapungunum voru aðeins örfá tvíburasýni tiltæk fyrir klínísku rannsóknina. Til að meta virkni VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 fyrir tvíburapunganir var notast við tölvulíkön byggð á athugunum á klínískum sýnum, til að líkja eftir þýði tvíburapungana. Þessi herming var í samræmi við ætlað þýði fyrir notkun. Dreifing á erfðaeftni frá fóstri var ákvörðuð út frá um það bil 4.500 sýnum úr tvíburapungunum og borin saman við dreifingu úr um það bil 120.000 sýnum úr einburapungunum. Dreifing erfðaeftnis frá fóstri sem var skilyrt við mislitnunarstöðu var ákvörðuð út frá áætluðum einburapungunum (1.044 með þrístæðu 21, 307 með þrístæðu 18 og 192 með þrístæðu 13). Með því að sameina dreifingarnar tvær var

hægt að álykta um greiningu mislitnunar hjá tvíburum. Hermt var eftir ein- og tvíeggja tvíburum og vegið meðaltal fundið fyrir algengi þeirra í þýðinu fyrir ætlaða notkun (2 tvíeggja: 1 eineggja) til að meta næmi. Hermt var eftir ósnortnum tvíburum til að finna út sértæki.

Hlutfall hvers hermisyntis sem varð fyrir áhrifum vegna þrístæðu (þ.e. það hlutfall sem varð fyrir áhrifum) var reiknað á mismunandi hátt fyrir hvern sýnaflokk:

- Hjá eineggja tvíburum var hlutfallið sem varð fyrir áhrifum í hverju sýni ákvarðað sem 1,0 vegna þess að við þessar aðstæður hefur þrístæðan áhrif á báða tvíburana.
- Hjá tvíeggja tvíburum var gert ráð fyrir að aðeins annar tvíeggja tvíburinn yrði fyrir áhrifum (það er afar sjaldgæft að báðir tvíeggja tvíburarnir verði fyrir áhrifum). Hermt var eftir hlutfallsgildum sem urðu fyrir áhrifum með því að nota þekkta dreifingu erfðaeftnis frá fósttri sem ákvörðuð var út frá klínískum sýnum úr tvíburapungunum þar sem ósamræmi var á kyni. Varfærin nálgun var notuð þar sem gert var ráð fyrir að tvíburinn sem varð fyrir áhrifum væri alltaf með lægsta hlutfall erfðaeftnis frá fósttri af tvíburunum tveimur. Leiðréttingarstuðull var notaður fyrir hlutfall erfðaeftnis frá fósttri sem var að meðaltali lægri í pungunum með þrístæðu 13 og 18.
- Fyrir tvíbura sem ekki urðu fyrir áhrifum var það hlutfall sem varð fyrir áhrifum í hverju sýni ákvarðað sem núll.

Hjá tvíburum sem urðu annaðhvort fyrir áhrifum af þrístæðu 18 eða 13 var hlutfall erfðaeftnis frá fósttri sem samsvaraði því hlutfalli sýntisins sem varð fyrir áhrifum, minnkað. Lækkunin var í réttu hlutfalli við meðaltalslækkun á hlutfalli erfðaeftnis frá fósttri sem kom fram í klínískum gögnum um einburapunganir með þrístæðu 18 eða 13 samanborið við einburapunganir með jafnlitnu.

Bæði heildarhlutfall erfðaeftnis frá fósttri og það hlutfall sem varð fyrir áhrifum úr hverju hermisynti voru síðan notuð til að reikna út mislitnunarstig með því að nota staðlað reiknirit VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2. Næmi var reiknað út með því að ákvarða hversu oft mislitnunarstig fyrir hermisynti hjá tvíburum sem urðu fyrir áhrifum voru yfir samsvarandi mislitnunarmörkum. Á sama hátt var sértæki reiknað út með því að ákvarða hversu oft mislitnunarstig fyrir hermisynti hjá tvíburum sem ekki höfðu orðið fyrir áhrifum voru undir samsvarandi mislitnunarmörkum ([Tafla 18](#)). 95% öryggisbil voru metin út frá fjölda raunverulegra klínískra tvíburasýna í upprunalega gagnasafninu sem voru flokkuð annaðhvort sem sýni sem urðu fyrir áhrifum eða ekki frá viðkomandi þrístæðu.

Til að meta næmi Y-litnings í tvíburasýnum var hermt eftir söfnum af XY/XY- og XX/XY-tvíburum. Vegið meðaltal var fundið sem sýnir algengi þeirra hjá ætluðu þýði fyrir notkun (1 XY/XY: 1 XX/XY). Til að meta sértæki Y-litnings hjá tvíburum var hermt eftir safni XX/XX-tvíbura. Hermt var eftir heildargildum erfðaeftnis frá fósttri samkvæmt þekktri dreifingu erfðaeftnis frá fósttri í klínískum sýnum úr tvíburapungunum.

Fyrir XY/XY- og XX/XY-tvíbura voru samsvarandi stig Y-litninga metin með því að nota þekkt samband milli hlutfalls erfðaeftnis frá fósttri og stiga Y-litninga í klínískum sýnum einbura sem voru flokkuð sem karlkyns. Fyrir XX/XY-tvíbura eingöngu var hermt eftir gildum erfðaeftnis frá fósttri sem urðu fyrir áhrifum (þ.e. karlkyns) með því að nota þekkta dreifingu hlutfalls erfðaeftnis frá fósttri sem kom fram á milli tvíbura í sömu þungun, samkvæmt niðurstöðum úr klínískum sýnum frá tvíburapungunum þar sem ósamræmi var á kyni. Varfærin nálgun var notuð þar sem val á því hlutfalli sem varð fyrir áhrifum samsvaraði tvíburanum með lægra hlutfall. Fyrir hvert XX/XY-hermisynti voru stig Y-litnings margfölduð með hlutfallinu sem varð fyrir áhrifum.

Fyrir XX/XX-tvíbura var tekið úrtak úr Y-litningastigum af þeim stigum sem komu fram í klínískum einbúrasýnum og voru flokkuð sem kvenkyns. Stig fyrir Y-litninga og heildarhlutfall erfðaeftirlita frá fósturi voru síðan notuð til að flokka hvert hermisyndi í flokk Y-litninga sem voru til staðar eða flokk Y-litninga sem voru ekki til staðar með því að nota staðlað reiknirit VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2.

Næmi var reiknað út með því að ákvarða hversu oft hermisyndi XY/XY- eða XX/XY-tvíburapungana voru rétt flokkuð í hópa þar sem Y-litningur var til staðar. Sérteki var reiknað út með því að ákvarða hversu oft hermisyndi XX/XX-tvíburapungana voru rétt flokkuð í hópa þar sem Y-litningur var ekki til staðar. 95% öryggisbil var metið út frá fjölda raunverulegra klínískra tvíbúrasýna í upprunalega gagnasafninu sem voru flokkuð sem annaðhvort með Y-litning til staðar eða án Y-litnings.

Tafla 18 Mat fyrir þrístæðu 21, 18 og 13 í hermipýði fyrir tvíburapunganir

	Þrístæða 21	Þrístæða 18	Þrístæða 13	Y-litningur til staðar
Næmi	96,4%	95,7%	93,6%	> 99,9%
Tvíhliða 95% öryggisbil	(86,4%; 98,9%)	(68,3%; 99,4%)	(64,1%; 98,9%)	(99,9%; > 99,9%)
Sérteki	99,9%	> 99,9%	> 99,9%	> 99,9%
Tvíhliða 95% öryggisbil	(99,8%; > 99,9%)	(99,9%; > 99,9%)	(99,9%; > 99,9%)	(99,7%; > 99,9%)

Í **Tafla 18** er að finna punktmat og áætlað 95% öryggisbil fyrir næmi og sérteki VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 til að greina þrístæðu 21, 18, 13 og tilvist Y-litnings í hermipýði tvíburapungana sem er í samræmi við þýði fyrir ætlaða notkun. Öryggisbil voru metin út frá fjölda gæðaeftirlita sem stóðust hjá klínískum tvíbúrasýnum sem voru flokkuð annaðhvort sem sýni sem urðu fyrir áhrifum eða án áhrifa frá viðkomandi þrístæðu. Við útreikning á næmi er gert ráð fyrir að tveir þriðju hlutar tvíburapungana sem verða fyrir áhrifum séu tvíeggja þunganir þar sem annar tvíburinn verður fyrir áhrifum á meðan að einn þriðji tvíburapungana sem verða fyrir áhrifum eru eineggja þunganir þar sem báðir tvíburarnir verða fyrir áhrifum.

Matið sem fram kemur í **Tafla 18** á aðeins við um tvíburapunganir. Vegna enn lægra algengis nægðu gögn um þunganir með fleiri fjölburum (þríburar eða fleiri) ekki til að setja upp viðeigandi tölfræðilíkön til að áætla nákvæmni greiningar á mislitnun.

## Greiningarhæfni

### Nákvæmni

Til að meta og mægngreina nákvæmni greininga var gerð endurgreining á gögnum með VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 prófunarhugbúnaðinum úr tveimur fyrri rannsóknum sem framkvæmdar voru með VeriSeq NIPT Solution:

- Fjölsetra rannsókn á samanburðarnákvæmni sem samanstóð af þremur rannsóknum gerðum af þremur notendum á þremur rannsóknarsetrum með einni lotu af prófefni í samtals níu tilraunum.
- Nákvæmnisrannsókn innan rannsóknarstofu sem samanstóð af 12 tilraunum á stöku setri þar sem notuð voru tvö ML STAR tæki, tvö raðgreiningartæki og þrjár prófefnalotur fyrir raðgreiningu.

Markmiðið með nákvæmnisrannsókninni var að mæla nákvæmni prófunarinnar með tilliti til þrístæðu 21 (T21) og Y-litnings og áætla breytileika milli mismunandi mælitækja, undirbúningssetta safna og prófefnalota fyrir raðgreiningu. Endurtekningargæfni aðstæðna sem ekki er lýst hér að ofan var ekki metin í rannsóknunum.

Sjóður með 5% hlutfall erfðafnis frá fóstri með T21 var stofnað með því að sameina cfDNA-útdrátt úr blóðvökva móður hjá þunguðum konum (fóstur með T21) og cfDNA úr blóðvökva frá konum sem ekki voru þunguðar. Einnig var stofnaður cfDNA-sjóður móður fyrir karlkyns fóstur með 10% hlutfall erfðafnis frá fóstri (XY-fóstur). Sýnahópurinn fyrir hverja rannsókn og hverja keyrslu náði yfir 4 endurtekningar á sýnasamsafni með 5% hlutfall erfðafnis frá fóstri með T21 og 20 endurtekningar á cfDNA-samsafni móður fyrir karlkyns fóstur með 10% erfðafni frá fóstri. Prófun fór fram á 10 dögum í samtals 21 keyrslu fyrir rannsóknirnar tvær samanlagt.

T21 og tilvist Y-litnings voru valin til mats á því hversu dæmigert klínískt ástand var og hversu flókin fráviksgreiningin var. Stærð litnings 21, sem er minnsti A-litningurinn hjá mönnum, hefur bein áhrif á næmi T21-greiningar, sérstaklega við lág gildi erfðafnis frá fóstri, eins og þau sem notuð eru í þessari rannsókn. Y-litningurinn, eins og hann kemur fyrir í blóðvökva móður, er eingöngu upprunninn hjá fósturinu og því auðveldara fyrir greiningarprófið að greina hann.

Meðaltal og staðalfrávik fyrir LLR-stig litnings 21 og eðlileg litningagildi (NCV, normalized chromosomal values) Y-litnings sem fram komu sýndu að staðalfrávik (SD, standard deviation) fyrir endurtekningu var stærsta orsök breytileika. Breytileiki á milli setra, mælitækja og prófefnalota jók breytileika ómarktækt, eins og sést á muninum á heildarstaðalfrávikum og staðalfrávikum endurtekninga í [Tafla 19](#) og [Tafla 20](#).

Tafla 19 Samantekt á staðalfrávikum (SD) svara í fjölsetra (samanburðarnákvæmni) raðgreiningum

Svörun	N	Meðaltal	Staðalfrávik endurtekninga	Heildarsamanburðarnákvæmni staðalfrávika*
LLR-stig fyrir litning 21	36	34,43	11,36	11,36
Y-litningur NCV	180	190,56	7,96	10,20

\* Heildartala felur í sér breytileika vegna seturs, notanda, keyrslu, dags og endurtekningar.

Tafla 20 Yfirlit yfir nákvæmni svörunar við raðgreiningu innan rannsóknarstofu

Svörun	N	Meðaltal	Staðalfrávik endurtekninga	Heildarstaðalfrávik á rannsóknarstofu*
LLR-stig fyrir litning 21	48	36,01	9,07	10,25
Y-litningur NCV	240	198,68	7,63	7,82

\* Heildartala felur í sér breytileika vegna raðgreiningartækis, prófefnalotu, notanda, keyrslu, dags og endurtekningar.

Viðbótarrannsókn var gerð til að bera saman raðgreiningarnákvæmni (heildarstaðalfrávik) VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 með því að nota flæðiflögu (e. flow cell) af útgáfu 2.0 samanborið við útgáfu 2.5. Rannsóknin fól í sér tvö konar flæðiflögur (v2.0 og útgáfa 2.5), þrjár lotur af raðgreiningarsettum, fjögur mælitækjakerfi og tvær raðgreiningarkeyrslur fyrir hverja samsetningu, samtals 48 keyrslur á einu setri. Eitt raðgreiningarsafn var búið til úr cfDNA-plötum sem voru undirbúnar handvirkt. Sýnahópurinn náði yfir 4 endurtekningar á sýnasafni með 5%

hlutfall erfðaeftis frá fóstri með T21 og 20 endurtekningar á cfDNA-safni með 10% erfðaefti frá fóstri frá móður í karlkyns fóstri (XY-fóstur). Niðurstöður rannsóknarinnar eru sýndar í [Tafla 21](#) og styðja að enginn munur sé á nákvæmni raðgreininga þegar flæðiflaga útgáfa 2.0 var notuð samanborið við útgáfa 2.5.

Tafla 21 Samantekt á svörunarnákvæmni raðgreiningar með flæðiflaga útgáfa 2.0 samanborið við flæðiflögútgáfa 2.5

Svörun	Fjöldi athugana fyrir hverja útgáfu	Heildarstaðalfrávik fyrir útgáfa 2.0*	Heildarstaðalfrávik fyrir útgáfa 2.5*	Tölfræðileg niðurstaða**
LLR-stig fyrir litning 21	96	9,56	8,44	Tölfræðilega jafngilt (p-gildi=0,25)
Y-litningur NCV	480	7,74	7,38	Tölfræðilega jafngilt (p-gildi=0,38)

\* Heild felur í sér breytileika vegna raðgreiningartækis, prófefnalotu, keyrslu, dags og endurtekningar

\*\*Miðað við F-próf á jöfnuði frávik (staðalfrávik í öðru veldi)

## Víxlmengun

Víxlmengun var metin í verkflæði við undirbúning sýna í VeriSeq NIPT Solution. Blóðvökvasöfn frá konum sem ekki voru þungaðar (XX) og fullorðnum karlmönnum (XY) voru prófuð með skákborðsmynstri á 4 plötum með 96 sýnatökusvæðum. N = 48 sýni frá konum annars vegar og 48 sýni frá körlum hins vegar á hverri plötu, samtals 192 sýni frá konum og 192 frá körlum. Ekkert sýnanna frá konum sýndi þekju Y-litnings sem var tölfræðilega hærri en áætlaður bakgrunnur, sem bendir til þess að engin víxlmengun frá sýnum karla á sömu plötu hafi átt sér stað. Engin greinanleg víxlmengun kom fram í VeriSeq NIPT Solution.

## Efni sem gætu haft truflandi áhrif

Áhrif hugsanlega truflandi efna voru metin í VeriSeq NIPT Solution með því að meta virkni prófsins í návist slíkra efna.

Albúmín, gallrauði, blóðrauði og þríglýseríð (innræn) voru hvert um sig sett í blóðvökvasöfn mæðra frá þungunum sem ekki urðu fyrir áhrifum (XX-fóstur). Þau voru prófuð í tveim þéttnistigum fyrir hvert prófunarefni (n=16 fyrir hvort). Engar truflanir á virkni prófsins komu fram.

Tafla 22 Efni sem gætu haft truflandi áhrif (innræn)

Prófunarefni	Lág prófunarþéttni (mg/ml)	Há prófunarþéttni (mg/ml)
Albúmín	35	50
Gallrauði	0,01	0,15
Blóðrauði	100	200
Þríglýseríð	1,5	5

Náttúrulegt DNA úr erfðamengi móður (gDNA) í blóðvökva getur einnig haft áhrif á virkni prófsins, þar sem hægt er að draga það út ásamt cfDNA úr fóstri. DNA-gildi erfðamengis við 1,6, 3,3 og 4,9 ng í hverju sýni (samsvarar 1, 2 og 3 staðalfrávikum yfir meðaltali fyrir áætlaða gDNA-þéttni eftir 7 daga geymslu á heilblóði<sup>12</sup>) var bætt við cfDNA sem dregið var úr blóðvökva þungaðra kvenna sem ekki urðu fyrir áhrifum (XX-fóstur). Sýni voru síðan prófuð í VeriSeq NIPT Solution (n=16 fyrir hvora þéttni). Engar truflanir á virkni prófsins komu fram við hækkuð gDNA-gildi.

Tuttugu lyf sem innihéldu hugsanlega truflandi efni (útræn) sem almennt eru notuð eða ávísað á meðgöngu voru prófuð samkvæmt EP7-A2 (Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline-2. útgáfa). Þessi 20 mögulega truflandi efni voru sameinuð í fjögur söfn, þeim var bætt í blóðvökva þungaðra kvenna sem ekki urðu fyrir áhrifum (XX-fóstur) og þau prófuð í VeriSeq NIPT Solution (N=16 fyrir hvert safn). Engar truflanir á virkni greiningarinnar komu fram þegar útrænu efnin voru til staðar.

Tafla 23 Efni sem gætu haft truflandi áhrif (útræn)

Safn 1	Safn 2	Safn 3	Safn 4
Parasetamól	Dífenhýdramín	Albúteról	Cetirizín
Acetýlcystein	Erytrómýsín	Búprópíón	Dextrómetorfan
Bísóprólól	Gúaífenesín	Koffín	L-askorbínsýra
Cítalópram	Heparín	Sertralín	Metóprólól
Deslórátadín	Lídókáín	Natríumflúoríð	Nadolól

## Greiningarmörk

Greiningarmörk (LOD, limit of detection) eru skilgreind sem hlutfall erfðaeftnis frá fóstri sem samsvarar 95% greiningarlíkum á viðkomandi ástandi, svo sem T21. Til að meta greiningarmörk VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 fyrir ýmsa algenga sjúkdóma voru gerðar rannsóknir og tölfræðilegar greiningar.

Líkurnar á því að greina sjúkdóm sem leitað er að í viðkomandi sýni sem unnið er með VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 ráðast fyrst og fremst af þremur þáttum:

- Hlutfall erfðaeftnis frá fóstri
- Dýpt raðgreiningar
- Stærð og flækjustigi viðkomandi erfðamengissvæðis.

Ef gert er ráð fyrir stöðugri raðgreiningardýpt er auðveldara að greina tiltekið frávik í sýni með hærra hlutfall erfðaeftnis frá fóstri en í sýni með lægra hlutfall erfðaeftnis frá fóstri. Aftur á móti, ef gert er ráð fyrir stöðugu hlutfalli erfðaeftnis frá fóstri, er auðveldara að greina tiltekið frávik í sýni með hærri raðgreiningardýpt en í sýni með lægri raðgreiningardýpt. Að lokum, þá er erfiðara að greina frávik á minni eða flóknari erfðamengissvæðum en frávik á stærri eða minna flóknnum erfðamengissvæðum ef gert er ráð fyrir stöðugu hlutfalli erfðaeftnis frá fóstri og stöðugri raðgreiningardýpt.

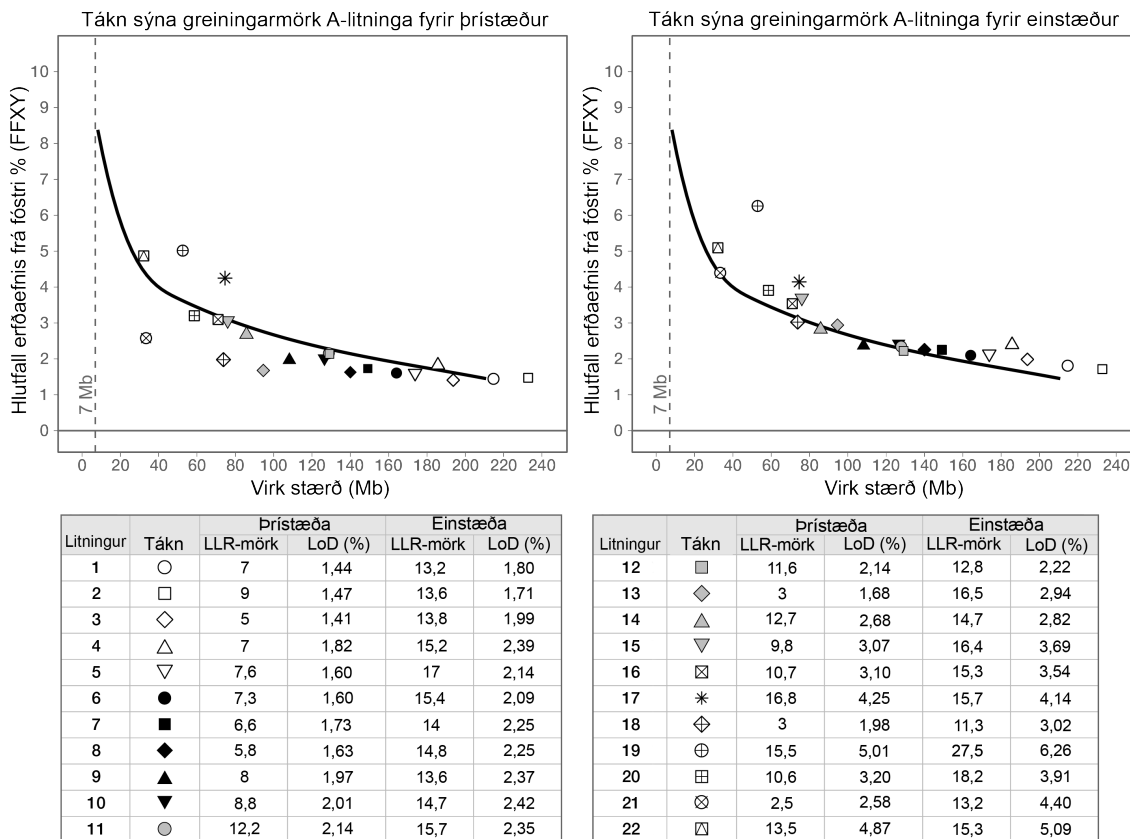
Til að ákvarða greiningarmörk (LOD) fyrir T21-greiningu voru sýni sem samanstóðu af blöndum söfnum með T21-sýnum og söfnum með sýnum sem ekki urðu fyrir áhrifum, greind. Þessum tveimur tegundum greiniefna var blandað saman yfir títrunarröð til að stofna safn með sjö stigum fyrir hlutfall erfðaefnis frá fóstri (0, 2, 3, 4, 5, 6 og 10%). Hvert stig var sett fram með samtals 10 endurtekningum.

Til að víkka enn frekar niðurstöður hnitansins yfir hlutfall erfðaefnis frá fóstri fyrir LOD-greininguna voru gögn úr þessari rannsókn aukin með gögnum sem fengust úr þynningu í tölvulíkani (e. in silico). Hermt var eftir áhrifum tilraunapynningar og -títrunar með stýrðri blöndun raðgreiningargagna. Gögnin úr þessari títrun í tölvulíkani náðu yfir safn með 14 stigum hlutfalls erfðaefnis frá fóstri (1,25; 1,50; 1,75; 2,00; 2,25; 2,50; 2,75; 3,00; 3,25; 3,50; 3,75; 4,00; 4,25 og 4,50%) með 32 endurtekningum fyrir hvert stig. Notast var við probit-greiningu á niðurstöðunum til að ákvarða LOD fyrir T21.

Óháð þessu var tölfræðilegt líkan þróað þar sem hlutfall erfðaefnis frá fóstri, raðgreiningardýpt og stærð/flækjustig erfðamengis voru notuð til að spá fyrir um greiningarlíkur á öllum frávikum í hvaða sýni sem er. Þetta líkan var búið til úr gögnum sem samsvara safni með 1.405 XY-sýnum. LOD fyrir T21, eins og þetta líkan spáði fyrir um, var ákvarðað í samræmi við mat sem byggðist á probit-greiningunni sem lýst er hér að ofan. Þetta tölfræðilíkan var notað til að meta LOD-gildi fyrir mislitnun á öllum A-litningum og fyrir úrfellingar og tvöfaldanir að hluta.

[Mynd 2](#) sjást 95% greiningarlíkur fyrir meðalsvæði miðað við stærð og greiningarmörk sjálfslitninga fyrir allar þrístæður og allar einstæður. CNV LLR-viðmiðunarmörk 15.1.

Mynd 2 95% greiningarlíkur fyrir meðalsvæði eftir stærð fyrir VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2







# Úrræðaleit

## Úrræðaleit í VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2

Bilunarhamur	Möguleg niðurstaða	Túlkun	Ráðlögð aðgerð	Athugasemdir
Ekki nægt plasmaintak	Sýni stóðs ekki gæðaeftirlit	Ekki nægt plasmarúmmál.	Taktu sýnið aftur.	Byggir á skoðun á plasmarúmmáli.
Bilun í blóðröri	Blóðið er ekki lagskipt	Sýnið var ekki sett í skilvindu.	Gakktu úr skugga um að skilvindan hafi farið í gang og að rörinu hafi verið snúið af réttu afli. Taktu sýnið aftur.	
		Óviðeigandi geymsla eða flutningur sýna (rauðkornarof í sýni).	Taktu sýnið aftur.	Frosin sýni aðskiljast ekki. Óviðeigandi flutnings- eða geymsluskilyrði geta leitt til rauðkornarofs í sýni.

Bilunarhamur	Möguleg niðurstaða	Túlkun	Ráðlögð aðgerð	Athugasemdir
Sýni stíflað eða lítið flæði	Plasmamengun	Einstök sýni geta stíflað bindiplötuna ef veruleg mengun er í plasmasýninu.	Skoðaðu sýnið. Ef plasma sem eftir er í rörinu er rautt eða mjólkurkennt skaltu hætta við sýnið og óska eftir að sýnið verði tekið aftur. Ef sýnið virðist eðlilegt skaltu prófa það aftur.	
	Yfirflæði úr sýni	Hvert rör ekki skoðað nægilega vel til að athuga hvort sýnið henti.	Ógiltu öll sýni í nálægum brunnum sem flæddi á.	Þetta gæti bent til þess að sýni hafi verið flutt eða geymd á rangan hátt fyrir vinnslu. Útilokið óhentug sýni frá vinnslu.
	Bilun í vélbúnaði	Ófullnægjandi melting efnis við útdrátt.	Prófaðu sýnið aftur. Ef vandamálið heldur áfram brunnum með önnur sýni skaltu hafa samband við tæknilega aðstoð hjá Illumina.	

Bilunarhamur	Möguleg niðurstaða	Túlkun	Ráðlögð aðgerð	Athugasemdir
Einstök sýni stóðust ekki gæðaeftirlit fyrir greiningu	Gæðaeftirlit með raðgreiningu tókst ekki	Mögulegar orsakir eru eftirfarandi: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ekki nægt genainntak</li> <li>• Misflutningur við meðhöndlun sýnis</li> <li>• Raðgreining prófefna tókst ekki</li> </ul>	Athugaðu skráningu sýnis. Athugaðu hvort fyrri sýni hafi svipaða virkni í hlutfallslega sömu stöðu á plötunni. Prófaðu sýnið aftur.	Gefur til kynna að annað hvort var sýnisinntak ófullnægjandi eða misflutning á ML STAR. Ekki nægt erfðaeftirlit getur stafað af ekki nægu frumulausu DNA í plasma eða frumubundnu DNA sem veldur ofþynningu sýnisins fyrir raðgreiningu.
	Lágt FF eða fjöldi staða sem ekki eru útilokaðir (NES)	Nægra gagna var ekki aflað til að hægt sé að gera nákvæma skýrslu.	Prófaðu aftur úr plasma.	

Bilunarhamur	Möguleg niðurstaða	Túlkun	Ráðlögð aðgerð	Athugasemdir
Gæðaeftirlit mep magngreiningu tókst ekki	Magngreiningarkeyrsla stóðst ekki. Miðgildi runu undir lágmarki	Ekki nægur afrakstur úr ferlinu.	Endurtaktu magngreiningu. Ef hún tekst ekki í annað sinn skaltu hafa samband við tæknilega aðstoð hjá Illumina.	Mæligildi á staðalkúrfunni sem standast ekki benda annað hvort til vandamála við undirbúning safnsins (þ.e. notkun etanóls sem hentar ekki fyrir sameindalíffræði) eða vandamála í magngreiningarferlinu.
	Magngreiningarkeyrsla stóðst ekki	Staðalkúrfa tókst ekki.	Endurtaktu magngreiningu. Ef hún tekst ekki í annað sinn skaltu hafa samband við tæknilega aðstoð hjá Illumina.	
Samnýting tókst ekki	Það tókst ekki að ljúka samnýtingu sýna	Greining samsafns getur ekki reiknað út rétt rúmmál samsafnsins.	Mettu aftur markþéttni samsafnsins. Keyrðu greiningu á samsafni aftur.	

## Úrræðaleit í VeriSeq NIPT Microlab STAR

Skref í ferlinu	Villukóði	Villuskilaboð	Lýsing	Lausn fyrir notanda
Runa stofnuð	EM0044	Runuauðkennið sem slegið var inn inniheldur óleyfilega stafi.	VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 les aðeins við tölur, bókstafi, undirstrik og bandstrik í öllum gagnareitum.	Gefðu rununni heiti sem inniheldur ekki sérstafi.

Skref í ferlinu	Villukóði	Villuskilaboð	Lýsing	Lausn fyrir notanda
Runa stofnuð	EM0051	Runuauðkennið er lengra en 36 stafir að lengd.	VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 takmarkar lengd runuheita við 36 stafi eða minna.	Gefðu rununni heiti sem er innan við 36 stafir.
Runa stofnuð	EM0076	Það tókst ekki að tengjast VeriSeq Onsite Server útgáfa 2	VeriSeq Onsite Server útgáfa 2 svarar ekki gagnabeiðnum frá verkflæðisstjóranum.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Gakktu úr skugga um að ML STAR sé nettengt.</li> <li>2. Gakktu úr skugga um að kveik sé á VeriSeq Onsite Server útgáfa 2.</li> <li>3. Gakktu úr skugga um að ML STAR geti tengst VeriSeq Onsite Server útgáfa 2 (með banki).</li> <li>4. Ef vandamálið leysist ekki í skrefunum á undan skaltu hafa samband við tæknilega aðstoð hjá Illumina.</li> </ol>
Runa stofnuð	EM0118	Runan tókst ekki og ekki er hægt að vinna hana frekar.	Tiltekin runa hefur nú þegar ekki tekist og ekki er hægt að vinna hana frekar.	Lotuskráin á VeriSeq Onsite Server útgáfa 2 gefur til kynna að valin runa hafi ekki tekist. Engin frekari vinnsla er leyfð. Búðu til aðra runu með þeim sýnum sem eru nauðsynleg.
Runa stofnuð	Á ekki við	Vinnslu þessarar runu er þegar lokið. Viltu safna aftur saman?	Þessi runa var unnin í samsafni. Eina leyfilega vinnslan er að safna aftur saman.	<p>Svona safna þú aftur saman.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Veldu <b>Re-Pool</b> (Safna aftur saman).</li> <li>• Hættu við aðferðina og gakktu úr skugga um að heiti rununnar sé rétt áður en þú samnýtir aftur.</li> </ul>
Einangrun plasman	WP0087	Tvö eins strikamerki lesin.	Sýni með eins strikamerki hafa verið lesin inn í kerfið.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Fylgdu kvaðningum í verkflæðisstjóranum til að sjá hvaða sýni hafa sama strikamerki.</li> <li>2. Fjarlægðu sýni með sama strikamerki og settu annað strikamerki á þau eða skiptu þeim út fyrir önnur.</li> <li>3. Settu sýnin aftur í.</li> </ol>

Skref í ferlinu	Villukóði	Villuskilaboð	Lýsing	Lausn fyrir notanda
Einangrun plasman	EP0102	Sýnin sem tilgreind voru á sýnablaðinu voru ekki sett í.	Sýni sem voru á sýnablaðinu voru ekki meðal strikamerkjanna sem voru lesin inn.	<ol style="list-style-type: none"> <li>Fylgdu kvaðningum í Workflow Manager (verkflæðisstjóranum) til að sjá hvaða sýni vantar.</li> <li>Gerðu eitt af eftirfarandi: <ul style="list-style-type: none"> <li>Bættu sýnunum sem vantar við rununa og settu sýnin aftur í.</li> <li>Hættu við aðferðina og breyttu sýnablaðinu eins og þarf. Byrjaðu aðferðina aftur.</li> </ul> </li> </ol>
Plata sett í	Á ekki við	Villa í Venus strikamerkjahlífum	Verkflæðisstjórinn framfylgir réttum tengslum á milli plötu og runu með Venus strikamerkjahlífum.	<ol style="list-style-type: none"> <li>Athugaðu staðsetningu plötunnar til að staðfesta að hún sé rétt uppsett.</li> <li>Gakktu úr skugga um að platan sem sett er í sé rétt plata fyrir þessa runu.</li> </ol>
cfDNA-útdráttur	WE0150	Það er of lítil þýstingur í lofttæmishólfinu.	Verkflæðisstjórinn heldur ekki áfram ef þrýstingsskyngjun við jafnvægi í lofttæmisínunni er < 400 Torr.	<ol style="list-style-type: none"> <li>Athugaðu hvort lofttæmisílinan hafi beyglast eða stíflast að öðru leyti.</li> <li>Opnaðu klemmurnar á úrgangslínu, leyfðu þrýstingnum að losna og lokaðu síðan klemmunum á úrgangslínunni að fullu.</li> <li>Gakktu úr skugga um að kveikt sé á lofttæmisstýringunni og dælunni.</li> <li>Athugaðu úrgangsfloškuna fyrir lofttæmi. Ef úrgangsfloaskan er meira en hálf full þarf að tæma hana.</li> <li>Ef vandamálið leysist ekki skaltu hafa samband við tæknilega aðstoð hjá Illumina.</li> </ol>

Skref í ferlinu	Villukóði	Villuskilaboð	Lýsing	Lausn fyrir notanda
cfDNA-útdráttur	WE0153	Það er of mikill þýstingur í lofttæmishólfinu.	Ef mældur lofttæmisþýstingur er of hár áður en þrýstingsstýringin hefst gæti kerfið hafa bilað.	Gakktu úr skugga um að allar lofttæmistengingar og -leiðslur séu tryggilega festar aftan á stjórnstækkinu.
cfDNA-útdráttur	WE0996	Það tókst ekki að innsigla lofttæmi.	Það þarf að lagfæra innsiglið áður en lengra er haldið.	Gakktu úr skugga um að innsiglið lofttæmisins sé lagfært áður en ýtt er á <b>OK</b> (Í lagi). 1. Gættu þess um að bindiplatan sé slétt upp við lofttæmisgreininna. Ýttu af krafti niður á bindiplötuna með hanska á hendi. 2. Hlustaðu eftir lofttæmissuðinu og fylgstu með vatnsflæðinu í gegnum bindiplötuna. 3. Opnaðu rakningaryfirlitið í verkflæðisstjóranum. Þegar raunverulegt þrýstingsgildi er orðinn að minnsta kosti 50 þrýstingseiningum lægri en þrýstingur andrúmsloftsins skaltu velja <b>OK</b> (Í lagi) til að halda áfram með cfDNA-útdrátt. 4. Ef nauðsynlegt þrýstingsgildi næst ekki innan tilskilins tíma skaltu velja <b>OK</b> (Í lagi) til að halda áfram með fyrsta skammt rofefnis. 5. Gerðu hlé á aðferðinni eftir að rofefnið hefur verið látið á bindiplötuna. Komdu bindiplötunni aftur fyrir og þrýstu kröftuglega niður á hana. 6. Ef rofefnið flæðir ekki í gegnum plötuna skaltu hafa samband við tæknilega aðstoð hjá Illumina.



Skref í ferlinu	Villukóði	Villuskilaboð	Lýsing	Lausn fyrir notanda
cfDNA-útdráttur	WM0219	Ef kveikt er á lofttæmi skaltu endurræsa dæluna handvirkt.	Lofttæmi gæti haldist í gangi eftir að hætt hefur verið við aðferð við útdrátt.	1. Ýttu á <b>Power</b> (aflhnappinn) á lofttæmisstýringunni til að slökkva á lofttæmi. 2. Bíddu í 10 sekúndur og ýttu síðan aftur á <b>Power</b> (aflhnappinn) til að kveikja á lofttæmi.
cfDNA-útdráttur	EE0477	Villa kom upp við að færa plötu. (iSWAP-villa)	Ef iSWAP-villa kemur upp (plata dettur, ekki tekst að taka hana upp o.s.frv.) biður kerfið þig um að ljúka flutningi plötunnar handvirkt.	Gakktu úr skugga um að hægt sé að endurheimta plötuna (að ekkert efni hafi hellst niður). <ul style="list-style-type: none"> <li>Ef ekki er hægt að endurheimta plötuna skaltu hætta við keyrsluna.</li> <li>Ef hægt er að endurheimta plötuna skaltu fylgja leiðbeiningunum sem birtast til að ljúka handvirkt við flutning plötunnar.</li> </ul>
cfDNA-útdráttur	EE0519	Skönnuð strikamerki stemma ekki við skráð strikamerki fyrir bindiplötuna.	Bindiplatan sem var sett í stemmir ekki við strikamerkið á plötunni sem var fjarlægð.	Gakktu úr skugga um að platan sem var sett í stemmi við skráða strikamerkið (sjá rakningarskrá fyrir vænt strikamerki).

Skref í ferlinu	Villukóði	Villuskilaboð	Lýsing	Lausn fyrir notanda
API	EA0372	Það tókst ekki að tengjast gagnþjóninum.	VeriSeq Onsite Server útgáfa 2 svarar ekki gagnabeiðnum frá verkflæðisstjóranum.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Gakktu úr skugga um að ML STAR sé nettengt.</li> <li>2. Gakktu úr skugga um að kveik sé á VeriSeq Onsite Server útgáfa 2.</li> <li>3. Gakktu úr skugga um að ML STAR geti tengst VeriSeq Onsite Server útgáfa 2 (með banki).</li> </ol>
	EA0774	Tengingarvilla. Það tókst ekki að staðfesta tenginguna við API-þjóninn.	VeriSeq Onsite Server útgáfa 2 er hætt að svara gagnabeiðnum frá verkflæðisstjóranum.	<p>Gakktu úr skugga um að:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Gakktu úr skugga um að ML STAR sé nettengt.</li> <li>2. Gakktu úr skugga um að ML STAR geti tengst VeriSeq Onsite Server útgáfa 2 (með banki).</li> <li>3. Gakktu úr skugga um að kveik sé á VeriSeq Onsite Server útgáfa 2.</li> </ol>
	EA0780	403: Ógild beiðni Þessi færsla er ekki gild.	Gögnin sem send voru brjóta gegn rökfræði verkflæðis kerfisins.	Skoðið villuupplýsingar til að fá frekari upplýsingar. Algengar orsakir eru meðal annars að inntak sé of langt eða innihaldi stafi sem ekki eru samþykktir.

# Heimildir

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

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

## Útgáfufेरill

Skjal	Dagsetning	Lýsing á breytingu
Skjal númer 1000000078751 útgáfa 09	Apríl 2024	<p>Fjarlægt</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Úrelt hlutnúmer 20030577.</li> <li>Skilyrði um hámarksrúmmál rörs fyrir fyrir skilvindu blóðsöfnunarrörs.</li> </ul> <p>Bætt við:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Nýtt hlutnúmer 20101927 fyrir VeriSeq Onsite Server útgáfa 2.</li> <li>Víddareining fyrir 10 ml blóðsöfnunarrör.</li> <li>Útskýringar á samhæfum útgáfum af SoftMax Pro.</li> <li>Skýringarorð um að aðeins megi nota samhæfaðar plastvörur til að tryggja útskiptanleika við VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>Athugasemd varðandi viðvörðun um íblöndun sýnis bætt við kaflann Túlkun niðurstaðna.</li> <li>Varúðarorð um að frysta ekki heilblóðsýni sem tekið er með Streck Cell-Free DNA BCT.</li> <li>Varúðarorð um að forðast útsetningu sýnis fyrir háum hita.</li> <li>Útskýringar á takmörkunum prófa og skilyrði fyrir endurtekningarhæfni.</li> <li>Útskýring á CNV LLR viðmiðunarmörkum samkvæmt mynd 2 í kaflanum um greiningarmörk.</li> </ul> <p>Uppfært</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Vísun í samhæfð ílát fyrir prófefni úr Roche ílát fyrir prófefni í Illumina ílát fyrir prófefni og nýju hlutnúmeri bætt við.</li> <li>Vörulistanúmer Thermo Fisher Multifuge X4 Pro-MD í 75016034.</li> <li>Varúðarorð um að ósamræmi í rummáli brunna geti valdið því að sýni standist ekki sjálfvirkt gæðaeftirlit.</li> <li>Vísun í fylgiseðla fyrir tæki.</li> </ul>
Skjal númer 1000000078751 útgáfa 08	Ágúst 2022	<p>Uppfæra hlutnúmer verkflæðisins</p> <p>Fjarlægja leiðbeiningar um að pípetta til að blanda ef safnplatan var frosin.</p>

Skjal	Dagsetning	Lýsing á breytingu
Skjal númer 1000000078751 útgáfa 07	Maí 2022	<p>Skipta takmörkunum aðgerðar niður í skýrslugerð í VeriSeq NIPT Solution útgáfa 2 og taka með fyrstu tvo punktana.</p> <p>Eftirstandandi texti í nýjum haus, Takmarkanir prófsins.</p> <p>Fjarlægt</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• VeriSeq af öllum merkimiðum prófefna.</li> <li>• Setja strikamerki plötu á VeriSeq NIPT-breytiplötu í undirbúningi fyrir undirbúning safns.</li> </ul> <p>Bætt við:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Orðið vottað við vatn án DNasa/RNasa.</li> <li>• Einn af eftirfarandi örplötulesurum, eða jafngildum, og SpectraMax M2, M3, M4, M5 og athugasemd.</li> <li>• Í kaflann um VeriSeq NIPT Microlab STAR til að útskýra hvað skal gera við atburð tengdum villumeðhöndlun.</li> <li>• Athugasemd um að skoða brunna.</li> <li>• Leiðbeiningar fyrir runur með 24 og 48 sýni í öllum köflum aðgerðarinnar.</li> <li>• Skref um hvenær á að nota fjólubláa breytinn eða jafngilt.</li> <li>• Orðalag í kaflanum um lýðfræði og einkenni meðgöngu uppfært með niðurstöðum fyrir fyrsta þriðjung meðgöngu.</li> <li>• Punktur við forskriftir fyrir djúpbrunnspötunnar sem inniheldur snúningsþol.</li> </ul> <p>Uppfært</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Orðalag um einstök runuheiti til að auka skýrleika og dæmi bætt við.</li> <li>• Tákn og snið fyrir athugasemdir, varnaðarorð og viðvaranir.</li> <li>• Undirpunktur um niðurstöðu úr prófinu.</li> <li>• Gúanidín þíósýanat í gúanidínhýdróklóríð.</li> <li>• CVS til BVS (Basic Vacuum System)</li> <li>• Orð um notkun skimunar á heildarerfðamenginu og LLR-stig.</li> <li>• Forskriftir: Forskriftir fyrir ílát fyrir prófefni, djúpbrunnspötur, plötur með 384 brunnum, plötur með 96 brunnum</li> </ul>
Skjal númer 1000000078751 útgáfa 06	Ágúst 2021	Uppfærði heimilisfang viðurkennds fulltrúa innan ESB.

Skjal	Dagsetning	Lýsing á breytingu
Skjal númer 1000000078751 útgáfa 05	Desember 2020	<p>Uppfæra hlutana um grundvallaratriði aðgerðar, viðvaranir og varúðarráðstafanir og merkingar voru með frekari útskýringum til að uppfylla kröfur í reglugerðum.</p> <p>Minniháttar uppfærslur á efni í aðgerð svo það passi við núverandi stíl og skipulag Illumina.</p> <p>Leiðrétta lýsingu á litningi 21 sem „næstminnsta A-litningi manna“ í „minnsta A-litning manna“ í hlutanum um nákvæmni í Greiningarhæfni.</p> <p>Bæta við varúðarorðum til að taka á óviðeigandi notkun geyma og hættum á blöndum sýna í köflunum Undirbúningur einangrunar plasma og Túlkun niðurstaðna.</p> <p>Bæta við nýjum hlutnúmerum fyrir netþjóna og hugbúnað vegna útgáfu nýrrar útgáfu netþjónsins og uppfæra hlutnúmer fyrir hugbúnað.</p> <p>Bætti við varnaðarorðum við upplýsingar um ferli og úrræðaleit til að taka á og koma í veg fyrir yfirflæði sýna.</p> <p>Uppfæra virk innihaldsefni í staðlinum um DNA-magngreiningu fyrir prófefni í fylgihlutakassanum til samræmis ivð öryggisblaðið.</p> <p>Uppfæra nafngiftarreglur fyrir eininguna Local Run Manager VeriSeq NIPT til samræmis við önnur skjöl.</p> <p>Bæta við útgáfuferli.</p>
Skjal númer 1000000078751 útgáfa 04	Október 2020	Smávægilegar leiðréttingar.
Skjal númer 1000000078751 útgáfa 03	September 2020	Uppfæra efnislista til að setja fram forskriftir fyrir rannsóknarbúnað ásamt þekktum samhæfum valkostum.

Skjal	Dagsetning	Lýsing á breytingu
Skjal númer 1000000078751 útgáfa 02	Febrúar 2020	<p>Uppfæra framsetningu á upplýsingum um klíniska virkni til að miðla betur muninum á grunnskimun og skimun á heildarerfðamenginu.</p> <p>Bæta við nýjum kafla Munur á virkni á milli Grunnskimunar og Skimunar á heildarerfðamenginu.</p> <p>Fjarlægja mótsagnakenndar upplýsingar um hvort viðbótarskýrslan sé valfrjáls úr kaflanum Meginreglur um ferli.</p> <p>Uppfæra nafngiftarvenju fyrir hugbúnaðinn VeriSeq NIPT Workflow Manager útgáfa 2 í öllu skjalinu til að samræma stíl.</p> <p>Uppfæra merkingar á heimilisföngum í Ástralíu og Illumina í Hollandi til að endurspeglar nýlegar breytingar.</p>
Skjal númer 1000000078751 útgáfa 01	Ágúst 2019	Fjarlægja tvítekið skref í Draga út cfDNA sem orsakaðist af villu í útgáfuhugbúnaði.
Skjal númer 1000000078751 útgáfa 00	Maí 2019	Upprunaleg útgáfa.



## Einkaleyfi og vörumerki

Þetta skjal og innihald þess eru eign Illumina, Inc. og dótturfélaga þess („Illumina“) og eru eingöngu ætluð til samningsbundinnar notkunar viðskiptavina þess í tengslum við notkun þeirrar vöru/vörum sem lýst er hér og í engum öðrum tilgangi. Þetta skjal og efni þess skal ekki notað eða dreift í neinum öðrum tilgangi og/eða á annan hátt miðlað, birt eða afritað án skriflegs samþykkis Illumina. Með þessu skjali veitir Illumina ekki leyfi samkvæmt einkaleyfi, vörumerki, höfundarrétti eða venjurétti, né öðrum sambærilegum réttindum þriðja aðila.

Leiðbeiningunum í þessu skjali verður að fylgja stranglega og á skýran hátt af hæfu og vel þjálfuðu starfsfólki til að tryggja rétta og örugga notkun vörunnar/varanna sem hér er lýst. Lesa verður og skilja allt innihald þessa skjals að fullu áður en slík vara eða vörur eru notaðar.

EF LEIÐBEININGARNAR SEM HÉR FYLGJA ERU EKKI LESNAR Í HEILD SINNI OG ÞEIM FYLGT Í EINU OG ÖLLU, GETUR ÞAÐ VALDIÐ SKEMMDUM Á VÖRU(M), MEIÐSLUM Á EINSTAKLINGUM, ÞAR Á MEÐAL NOTENDUM EÐA ÖÐRUM, OG TJÓNI Á ÖÐRUM EIGNUM. Í SLÍKUM TILVIKUM FELLUR ÖLL ÁBYRGÐ AF HÁLFU FRAMLEIÐANDA ÚR GILDI.

ILLUMINA BER EKKI ÁBYRGÐ Á NEINU TJÓNI SEM MÁ REKJA TIL ÓVIÐEIGANDI EÐA RANGRAR NOTKUNAR VÖRUNNAR/VARANNA, (ÞAR MEÐ TALINN HLUTI HENNAR/ÞEIRRA EÐA HUGBÚNAÐUR).

© 2024 Illumina, Inc. Allur réttur áskilinn.

Öll vörumerki eru eign Illumina, Inc. eða viðkomandi eigenda. Sérstakar upplýsingar um vörumerki er að finna á [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Tengiliðaupplýsingar



Illumina, Inc.  
5200 Illumina Way  
San Diego, Kalifornía 92122 Bandaríkin  
+1.800.809.ILMN (4566)  
+1.858.202.4566 (utan Norður-Ameríku)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com



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

### Ástralskur styrktaraðili

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

## Vörumerkingar

Til að fá ítarlega yfirlit yfir tákni sem birtast á umbúðum og merkingum vörunnar, sjá táknaþýringar á [support.illumina.com](http://support.illumina.com) á flípanum *Skjöl* fyrir settið þitt.

Samantekt á öryggi og virkni (SSP) er að finna á <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>, eftir að Evrópski gagnagrunnurinn um lækningatæki (Eudamed) var settur á laggirnar. Það er tengt við grunnkennimerki tækis fyrir einkvæma tækjaauðkenningu (0081627002NIPTRP).