

Packungsbeilage

FÜR DIE IN-VITRO-DIAGNOSTIK.

Verwendungszweck

VeriSeq™ NIPT Solution v2 ist ein *In-vitro*-Diagnostest und als Screeningtest für den Nachweis genomweiter fetaler genetischer Anomalien in mütterlichen peripheren Vollblutproben von schwangeren Frauen, die sich mindestens in der 10. Schwangerschaftswoche befinden, bestimmt. VeriSeq NIPT Solution v2 erkennt mithilfe der Genomsequenzierung partielle Duplikationen und Deletionen für alle Autosomen sowie den Aneuploidiestatus für alle Chromosomen. Der Test bietet eine Option für die Protokollierung von Aneuploidien der Geschlechtschromosomen (SCA, Sex Chromosome Aneuploidy). Dieses Produkt darf nicht als alleinige Grundlage für eine Diagnose oder die Entscheidung über einen Schwangerschaftsabbruch verwendet werden.

VeriSeq NIPT Solution v2 umfasst Folgendes: VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 für das VeriSeq NIPT Microlab STAR-Gerät, das VeriSeq NIPT Sample Prep Kit und VeriSeq Onsite Server v2 mit VeriSeq NIPT Assay Software v2. VeriSeq NIPT Solution v2 ist für die Verwendung mit einem Sequenzierer der nächsten Generation vorgesehen.

Zusammenfassung und Erläuterung des Assays

Fetale Chromosomenanomalien, insbesondere die Aneuploidie, bei der es sich um eine anormale Anzahl von Chromosomen handelt, sind eine häufige Ursache von Fertilitätsstörungen, angeborenen Anomalien, Entwicklungsverzögerungen und geistiger Behinderung. Aneuploidie betrifft etwa eine von 300 Lebendgeburten, weist jedoch im Zusammenhang mit Fehl- und Totgeburten deutlich höhere Raten auf.^{1, 2} Bis vor Kurzem gab es für diese Erkrankungen zwei Arten von Pränataltests: Diagnostetests oder das Screening. Diagnostetests beinhalten invasive Verfahren wie die Amniozentese oder die Chorionzottenbiopsie. Diese Testverfahren gelten als unübertroffen im Bereich der Erkennung fetaler Aneuploidie. Allerdings sind sie mit einer fetalen Verlustrate zwischen 0,11 % und 0,22 % behaftet.³ Herkömmliche, nicht invasive Multi-Marker-Screeningverfahren stellen kein Gefährdungsrisiko für die Schwangerschaft dar, sind jedoch weniger genau als diagnostische Tests. Ihre Erkennungsrate für Trisomie 21 variiert zwischen 69 % und 96 %, abhängig von dem jeweiligen Screening, dem Alter der Mutter und dem Gestationsalter zum Zeitpunkt des Tests.⁴ Wichtiger ist, dass sie falsch positive Raten von etwa 5 % aufweisen und eine bestätigende invasive Diagnostik nach sich ziehen können, mit der das Risiko von Fehlgeburten im Zusammenhang mit diesen Verfahren wieder steigt.⁴ Auch mithilfe von Ultraschall können Chromosomenanomalien festgestellt werden, allerdings bietet diese Methode noch weniger Sicherheit als die anderen Verfahren.

Mit einem hohen Grad an Genauigkeit können fetale Aneuploidie für die Chromosomen 21, 18, 13, X und Y durch nicht invasive Pränataldiagnostik (NIPT, Noninvasive Prenatal Testing) nachgewiesen werden. Dies geschieht mithilfe der Genomsequenzierung der cfDNA (cell-free DNA, zellfreie DNA), die in der 10. Schwangerschaftswoche oder später aus dem mütterlichen Plasma gewonnen wird. Eine aktuelle Meta-Analyse mehrerer klinischer Studien verzeichnet gewichtete gepoolte Nachweisraten und Spezifitäten für

Trisomie 21 und Trisomie 18 in Einlingsschwangerschaften wie folgt: Für Trisomie 21 sind es 99,7 % bzw. 99,96 % und für Trisomie 18 97,9 % bzw. 99,96 %.⁵ Eine Studie zeigt, dass der Einsatz von NIPT als vorrangiges Screeningverfahren bei allen Schwangerschaften die Zahl der bestätigenden invasiven Verfahren um 89 % verringern könnte.⁶

In Anbetracht der signifikanten Reduktion von falsch positiven Raten mit NIPT im Vergleich zum herkömmlichen Multi-Marker-Screening haben sich zahlreiche medizinische Institutionen für den Einsatz von NIPT bei verschiedenen Indikationen ausgesprochen.

Insbesondere die International Society for Prenatal Diagnosis, das American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG), die Society for Maternal Fetal Medicine (SMFM), das American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG), die Europäische Gesellschaft für Humangenetik und die American Society of Human Genetics unterstützen das Angebot von NIPT-Untersuchungen für alle schwangeren Frauen.^{7, 8, 9} Dabei werden die Beratung im Vorfeld des Tests, die Einwilligung nach erfolgter Aufklärung und diagnostische Tests zur Bestätigung eines positiven cfDNA-Screeningergebnisses empfohlen.⁴

VeriSeq NIPT Solution v2, ein nicht invasiver In-vitro-Diagnostiktest, nutzt die Genomsequenzierung von cfDNA-Fragmenten aus mütterlichen peripheren Vollblutproben von Schwangeren ab der 10. Schwangerschaftswoche. Der Test ermöglicht zwei unterschiedliche Screening-Verfahren: einfach und genomweit. Das einfache Screening liefert ausschließlich Informationen zum Aneuploidiestatus der Chromosomen 21, 18, 13, X und Y. Das genomweite Screening liefert Ergebnisse zu partiellen Duplikationen und Deletionen für alle Autosomen sowie zum Aneuploidiestatus aller Chromosomen. Beide Screeningarten bieten die Möglichkeit eines Befunds für Aneuploidien der Geschlechtschromosomen (SCA) sowohl mit als auch ohne Protokollierung des Geschlechts des Fetus. Die SCA-Protokollierung kann deaktiviert werden. Bei deaktivierter SCA-Protokollierung wird auch das Geschlecht des Fetus nicht protokolliert. Weitere Informationen zu den Optionen bei der Protokollierung des Geschlechts finden Sie im *Softwarehandbuch zu VeriSeq NIPT Solution v2 (Dokument Nr. 1000000067940)*.

Verfahrensprinzipien

VeriSeq NIPT Solution v2 ist eine automatisierte Lösung für NIPT-Labortests mit automatisierter Probenvorbereitung und Sequenzierungsdatenanalyse. Bei VeriSeq NIPT Sample Prep Kit handelt es sich um spezialisierte Reagenzien zum Einmalgebrauch, die in Verbindung mit dem VeriSeq NIPT Microlab STAR verwendet werden, um Batches mit 24, 48 oder 96 Proben für das Next-Generation Sequencing vorzubereiten. Die spezialisierte VeriSeq NIPT Assay Software v2 analysiert die Daten der Paired-End-Sequenzierung des Genoms und generiert einen Befund mit qualitativen Ergebnissen.

Der Workflow besteht aus den Verfahren Probenentnahme, Plasmaisolation, cfDNA-Extraktion, Bibliotheksvorbereitung, Bibliotheksquantifizierung, Bibliotheks-Pooling, Sequenzierung und Analyse, die im Folgenden näher beschrieben werden:

- **Probenentnahme:** 7–10 ml mütterliches peripheres Vollblut werden in einem zellfreien DNA-Blutentnahmeröhrchen (BCT, Blood Collection Tube) von Streck gesammelt, das Zellyse und genomische Kontamination verhindert und das Vollblut stabilisiert.

- **Plasmaisolation:** Innerhalb von fünf Tagen nach der Entnahme wird das Plasma aus dem mütterlichen peripheren Vollblut mithilfe von entsprechenden Zentrifugationstechniken isoliert. Das VeriSeq NIPT Microlab STAR aspiriert das Plasma und verteilt es für die nachfolgende Verarbeitung auf eine 96-Deep-Well-Platte. Falls ein erneuter Test erforderlich ist, können die Proben nach der Verarbeitung wieder verschlossen und weitere fünf Tage bei 4 °C gelagert werden (die maximale Lagerungszeit nach der Blutentnahme beträgt 10 Tage).

**VORSICHT**

Das Überschreiten der im Vorherigen genannten Lagerzeiten kann zur Folge haben, dass mehr einzelne Proben fehlschlagen.

- **cfDNA-Extraktion:** Die Reinigung der cfDNA aus dem Plasma wird durch die Adsorption an eine Bindungsplatte, das Waschen der Bindungsplatte zur Entfernung von Verunreinigungen und die Eluierung erreicht.
- **Bibliotheksvorbereitung:** Die gereinigten cfDNA-Fragmente werden einem Endreparaturprozess unterzogen, der 5'- und 3'-Überhänge in glatte Enden konvertiert. Als Nächstes wird den 3'-Enden ein Desoxyadenosin-Nukleotid hinzugefügt, um einen Einzelbasen-Überhang zu erzeugen. Anschließend werden indizierte Adapter, die einen Einzelbasen-3'-Desoxythymidin-Überhang enthalten, an die verarbeiteten cfDNA-Fragmente ligiert. Die ligierte DNA wird unter Verwendung von SPRI-Beads (Solid Phase Reversible Immobilization) gereinigt. Jede Probe in einem Satz von 24, 48 oder 96 Proben erhält einen eindeutig indizierten Adapter. Die Adapter dienen zwei Zwecken:

**VORSICHT**

Gehen Sie besonders vorsichtig vor, um eine Kreuzkontamination der Indizes zu vermeiden, die die Ergebnisse verfälschen kann.

- Indizes ermöglichen die Probenidentifikation in der anschließenden Sequenzierung.
- Indexadapter enthalten Sequenzen, die die Erfassung von Bibliotheken auf der festen Oberfläche einer Sequenzierungsfließzelle für die Clusterbildung und die anschließende Sequenzierung ermöglichen.
- **Quantifizierung:** Das Bibliotheksprodukt wird mittels eines Fluoreszenzfarbstoffs quantifiziert, wobei die Konzentration durch den Vergleich mit einer DNA-Standardkurve ermittelt wird.
- **Bibliotheks-Pooling und -Sequenzierung:** Die Probenbibliotheken werden zu Pools mit 24 oder 48 Proben zusammengefasst. Die Mengen werden so angepasst, dass Coverage-Variationen minimiert werden. Anschließend werden die Pools mit einem Next-Generation Sequencing-System sequenziert.
- VeriSeq NIPT Solution v2 enthält keine Sequenzierungsgeräte und keine Verbrauchsmaterialien für die Sequenzierung.
- **Analyse:** Die Analyse der einzelnen Proben umfasst folgende Schritte:
 - Identifikation der Bibliotheksfragmente über Indexsequenzen und Zuordnung der Paired-End-Reads zum menschlichen Referenzgenom.

- Schätzung der fetalen Fraktion der Bibliothek auf Grundlage einer Auswertung der Informationen aus der Verteilung der Längen und Genomkoordinaten der Bibliotheksfragmente.
- Unter Berücksichtigung bekannter Messabweichungen werden mithilfe eines statistischen Modells Genombereiche ermittelt, deren Art der Unter- oder Überrepräsentation in der Bibliothek einer Anomalie der geschätzten fetalen Fraktion entspricht.
- Der NIPT-Bericht enthält zusammengefasste Ergebnisse für das ausgewählte Testmenü. Es werden die möglichen Ergebnisse „ANOMALY DETECTED“ (ANOMALIE ERKANNT) oder „NO ANOMALY DETECTED“ (KEINE ANOMALIE ERKANNT) sowie eine Schätzung der fetalen Fraktion für Proben mit bestandener Qualitätssicherung aufgeführt.
- Der Zusatzbefund bietet eine genauere Bestimmung der erkannten Anomalien in Form von quantitativen Messgrößen.

Einschränkungen des Verfahrens

Einschränkungen des Assays

- Die Nachweise für Sensitivität und Spezifität des Tests gelten für Einlings- und Zwillingsschwangerschaften. Diese Anweisungen stellen keine Sensitivitäts- und Spezifitätsdaten für Drillinge oder Mehrlingsschwangerschaften bereit.
- VeriSeq NIPT Solution v2 ist nicht für den Nachweis von Polyploidien, z. B. einer Triploidie, ausgelegt.
- VeriSeq NIPT Solution v2 ist nicht für den Nachweis von balancierten chromosomalen Rearrangements ausgelegt.
- Für den Assay werden mütterliche periphere Vollblutproben von Schwangeren, die sich mindestens in der 10. Schwangerschaftswoche befinden, benötigt.
- Im Rahmen eines einfachen Screenings weist VeriSeq NIPT Solution v2 spezifische Chromosomenanomalien aus. Mit „NO ANOMALY DETECTED“ (KEINE ANOMALIE ERKANNT) ausgewiesene Ergebnisse schließen die Möglichkeit bestehender Anomalien der getesteten Chromosomen nicht aus. Ein negatives Ergebnis schließt zudem nicht die Möglichkeit aus, dass bei der Schwangerschaft andere Chromosomenanomalien, genetische Befunde oder Geburtsfehler (z. B. offene Neuralrohrdefekte) auftreten können.
- Im Rahmen eines genomweiten Screenings ausgewiesene große Deletionen und Duplikationen, die weniger als 75 % der Größe des Chromosoms betragen, können auf eine Aneuploidie des gesamten Chromosoms hindeuten.
- Bei genomweiten Screenings sind bestimmte Bereiche von der Analyse ausgeschlossen. Eine Liste dieser Ausschlussbereiche steht auf der Support-Website von Illumina zur Verfügung. Die Erkennung genomischer Anomalien erfolgt ausschließlich in nicht ausgeschlossenen Regionen.
- Der Befund zum Geschlecht des Fetus ist aufgrund von gesetzlichen Bestimmungen nicht in allen Regionen verfügbar.

- Laut Fachliteratur können bestimmte mütterliche und fetale Faktoren die Ergebnisse beim zellfreien DNA-basierten Screening verzerren. Einige dieser Faktoren werden im Folgenden aufgeführt:
 - Mutter hat vor Kurzem eine Bluttransfusion erhalten
 - Organtransplantation/Stammzellentransplantation bei der Mutter
 - Autoimmunerkrankung der Mutter
 - Neoplasien bei der Mutter (gutartig und bösartig)
 - Mosaizismus der Mutter
 - Kopienzahlvariationen bei der Mutter
 - Fetoplazentarer Mosaizismus/CPM (Confined Placental Mosaicism, begrenzter plazentarer Mosaizismus)
 - Fruchttod/verstorbener Zwilling

VeriSeq NIPT Solution v2-Berichte

- VeriSeq NIPT Solution v2 ist ein Screeningtest und ist nicht für sich genommen, sondern nur in Verbindung mit anderen klinischen Befunden und Testergebnissen zu betrachten. Das NIPT-Screening sollte nicht als alleinige Quelle für Befunde bezüglich des fetalen Zustands und für die Entscheidung über einen Schwangerschaftsabbruch verwendet werden.⁷
- VeriSeq NIPT Solution v2 weist Folgendes aus:
 - Beim einfachen Screening wird auf eine Überrepräsentation der Chromosomen 13, 18 und 21 getestet.
 - Das genomweite Screening liefert Informationen zur Unter- oder Überrepräsentation aller Autosomen, einschließlich partieller Deletionen bzw. Duplikationen ab einer Länge von 7 Mb.
 - Bei Einlingsschwangerschaften wird bei Auswahl von „Yes“ (Ja) oder „SCA“ als Option für den Geschlechtsbefund auf folgende Anomalien der Geschlechtschromosomen getestet: XO, XXX, XXY und XYY.
 - Bei Einlingsschwangerschaften wird bei Auswahl von „Yes“ (Ja) als Option für den Geschlechtsbefund das Geschlecht des Fetus protokolliert.
 - Bei Zwillingsschwangerschaften wird das Vorhandensein eines Y-Chromosoms überprüft.

Produktkomponenten

VeriSeq NIPT Solution v2 umfasst folgende Probenvorbereitungen:

- VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (24 samples) (Artikel-Nr. 20025895)
- VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (48 samples) (Artikel-Nr. 15066801)
- VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (96 samples) (Artikel-Nr. 15066802)

VeriSeq NIPT Solution v2 umfasst folgende Software-Komponenten:

- VeriSeq NIPT Assay Software v2 (Artikel-Nr. 20047024), auf dem VeriSeq Onsite Server v2 bereits vorinstalliert
 - VeriSeq Onsite Server v2 (Artikel-Nr. 20028403, 20047000, 20101927) oder vorhandener VeriSeq Onsite Server (Artikel-Nr. 15076164 oder 20016240) mit Aktualisierung auf v2
- VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 (Artikel-Nr. 20044988), auf dem VeriSeq NIPT Microlab STAR bereits vorinstalliert
 - VeriSeq NIPT Microlab STAR (Artikel-Nr. – Hamilton Company Reno: 95475-01 (115 V) und 95475-02 (230 V), Hamilton Company Bonaduz: 806288)
- Local Run Manager VeriSeq NIPT module (Artikel-Nr. 20044989)

Reagenzien

Bereitgestellte Reagenzien

Illumina stellt folgende Reagenzien bereit: VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (24 samples) (Artikel-Nr. 20025895), VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (48 samples) (Artikel-Nr. 15066801) und VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (96 samples) (Artikel-Nr. 15066802). Das VeriSeq NIPT Sample Prep Kit ist für die Verwendung mit dem VeriSeq NIPT Microlab STAR (ML STAR) (Artikel-Nr. 95475-01, 95475-02 oder 806288) der Hamilton Company konfiguriert.

VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, Extraction Box

Tabelle 1 VeriSeq NIPT Extraction Box (24) und (48), Artikel-Nr. 20025869 und 15066803

Name des Reagenz auf dem Etikett	Anzahl der Behälter im Kit	Erläuterung	Lagerung
Lysis Buffer	1	Guanidinhydrochlorid in gepufferter wässriger Lösung	15 °C bis 30 °C
Wash Buffer I	1	Guanidinhydrochlorid und 2-Propanol in gepufferter wässriger Lösung	15 °C bis 30 °C
Wash Buffer II	1	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen	15 °C bis 30 °C
Elution Buffer	1	Gepufferte wässrige Lösung	15 °C bis 30 °C
Proteinase Buffer	1	Glycerol in gepufferter wässriger Lösung	15 °C bis 30 °C
Proteinase K	3	Lyophilisierte Proteinase K	15 °C bis 30 °C

Tabelle 2 VeriSeq NIPT Extraction Box (96), Artikel-Nr. 15066807

Name des Reagenz auf dem Etikett	Anzahl der Behälter im Kit	Erläuterung	Lagerung
Lysis Buffer	1	Guanidinhydrochlorid in gepufferter wässriger Lösung	15 °C bis 30 °C
Wash Buffer I	1	Guanidinhydrochlorid und 2-Propanol in gepufferter wässriger Lösung	15 °C bis 30 °C
Wash Buffer II	2	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen	15 °C bis 30 °C
Elution Buffer	1	Gepufferte wässrige Lösung	15 °C bis 30 °C
Proteinase Buffer	1	Glycerol in gepufferter wässriger Lösung	15 °C bis 30 °C
Proteinase K	4	Lyophilisierte Proteinase K	15 °C bis 30 °C

VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, Library Prep Box

Tabelle 3 VeriSeq NIPT Library Prep Box (24) und (48), Artikel-Nr. 20026030 und 15066809

Name des Reagenz auf dem Etikett	Anzahl der Behälter im Kit	Erläuterung	Lagerung
End Repair Mix	1	DNA-Polymerase und dNTPs in gepufferter wässriger Lösung	-25 °C bis -15 °C
A-Tailing Mix	1	DNA-Polymerase und dATP in gepufferter wässriger Lösung	-25 °C bis -15 °C
Ligation Mix	1	DNA-Ligase in gepufferter wässriger Lösung	-25 °C bis -15 °C
Hybridization Buffer	1	Gepufferte wässrige Lösung	-25 °C bis -15 °C
NIPT DNA Adapter Plate	1	Oligonukleotide in gepufferter wässriger Lösung	-25 °C bis -15 °C

Tabelle 4 VeriSeq NIPT Library Prep Box (96), Artikel-Nr. 15066810

Name des Reagenz auf dem Etikett	Anzahl der Behälter im Kit	Erläuterung	Lagerung
End Repair Mix	1	DNA-Polymerase und dNTPs in gepufferter wässriger Lösung	-25 °C bis -15 °C
A-Tailing Mix	2	DNA-Polymerase und dATP in gepufferter wässriger Lösung	-25 °C bis -15 °C
Ligation Mix	2	DNA-Ligase in gepufferter wässriger Lösung	-25 °C bis -15 °C
Hybridization Buffer	1	Gepufferte wässrige Lösung	-25 °C bis -15 °C
NIPT DNA Adapter Plate	1	Oligonukleotide in gepufferter wässriger Lösung	-25 °C bis -15 °C

VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, Accessory Box

Tabelle 5 VeriSeq NIPT Accessory Box, Artikel-Nr. 15066811

Name des Reagenz auf dem Etikett	Anzahl der Behälter im Kit	Erläuterung	Lagerung
DNA Binding Plate	1	Mikroplatte aus Propylen mit modifizierter Silikonmembran	2 °C bis 8 °C
Resuspension Buffer	1	Gepufferte wässrige Lösung	2 °C bis 8 °C
Sample Purification Beads	1	Festphasige paramagnetische Beads in gepufferter wässriger Lösung	2 °C bis 8 °C
DNA Quantification Reagent	1	DNA-interkalierender Farbstoff in DMSO	2 °C bis 8 °C
DNA Quantification Standard	1	dsDNA-Standard, unspezifische DNA und Natriumazid in gepufferter wässriger Lösung	2 °C bis 8 °C

VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, Workflow Tubes and Labels

Tabelle 6 Workflow Tubes and Labels, Artikel-Nr. 15071543

Artikelname auf dem Etikett	Anzahl der Artikel im Kit	Lagerung
Label (LBL)–Plate Barcode	9	15 °C bis 30 °C
Label (LBL)–Deep-well Plate Barcode	12	15 °C bis 30 °C
Tube (TB)–Empty Pooling Tube	5	15 °C bis 30 °C

Nicht bereitgestellte Reagenzien

Erforderliche, jedoch nicht bereitgestellte Reagenzien

- Sequenzierungsreagenzien und Verbrauchsmaterialien für das NGS-System
- Zertifiziertes DNase-/RNase-freies Wasser, in Molekularbiologie-Qualität
- Ethanol, 100 % (200 Proof), in Molekularbiologie-Qualität

HINWEIS Ethanol in geringerer als für die Molekularbiologie geeigneter Qualität kann die Performance des Assays beeinträchtigen.

Optionale, nicht bereitgestellte Reagenzien

- DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung) für NTC-Proben (No Template Control, Negativkontrolle)

Lagerung und Handhabung

1. Die Raumtemperatur ist mit 15 °C bis 30 °C definiert.
2. Alle Reagenzien sind für den einmaligen Gebrauch bestimmt. Nachdem die Reagenzien für den Einsatz vorbereitet wurden, sollten sie umgehend verwendet werden.
3. Wenn die Verpackung oder der Inhalt einer der Komponenten von VeriSeq NIPT Solution beschädigt oder beeinträchtigt ist, wenden Sie sich bitte an den Kundenservice von Illumina.
4. Die Reagenzien sind bis zu dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil, wenn sie wie angegeben gelagert werden. Die Lagerungsbedingungen finden Sie in der Spalte „Lagerung“ der Tabellen im Abschnitt [Reagenzien](#). Verwenden Sie keine abgelaufenen Reagenzien.
5. Änderungen an der physischen Struktur der bereitgestellten Reagenzien können auf eine Schädigung der Materialien hindeuten. Verwenden Sie die Reagenzien nicht, wenn Änderungen an der physischen Struktur auftreten (z. B. offensichtliche Veränderungen der Reagenzienfarbe oder Eintrübung mit offenkundiger Keimkontamination).

6. Beachten Sie die folgenden Best Practices beim Umgang mit Sample Purification Beads:
 - Frieren Sie Beads niemals ein.
 - Die Beads sollten Raumtemperatur haben, bevor sie verwendet werden.
 - Mischen Sie die Beads unmittelbar vor der Verwendung mit dem Vortexmischer, bis sie gut suspendiert sind und die Farbe homogen erscheint.
7. In Lysis Buffer, Wash Buffer I, Wash Buffer II, Elution Buffer und Proteinase Buffer können sich sichtbare Partikel oder Kristalle bilden. Mischen Sie diese vor der Verwendung kräftig mit dem Vortexmischer und stellen Sie anschließend visuell sicher, dass keine Ausfällungen vorhanden sind.
8. Frieren Sie Vollblut nach der Entnahme niemals ein.
9. Sequenzieren Sie Bibliotheken so bald wie möglich nach dem Pooling. Pool-Bibliotheken sind bei einer Lagerung zwischen -25 °C und -15 °C bis zu sieben Tage lang stabil. Bei einer Lagerung für den genannten Zeitraum und unter den genannten Bedingungen ist keine zusätzliche Denaturierung erforderlich.

Geräte und Materialien

Erforderliche, jedoch nicht bereitgestellte Geräte und Materialien

Erforderliche, jedoch nicht bereitgestellte Ausstattung

Ausstattung	Anbieter
Next-Generation Sequencing(NGS)-System, das Folgendes bietet: <ul style="list-style-type: none"> • Paired-End-Sequenzierung von 2 x 36 bp • Kompatibel mit Doppel-Index-Adapttern des VeriSeq NIPT Sample Prep Kit • Automatische Generierung von BCL-Dateien • Zweikanal-Chemie • 400 Millionen Paired-End-Reads pro Lauf • Kompatibel mit VeriSeq NIPT Assay Software v2 oder dem NextSeq 550Dx Sequencing System 	Gerätelieferant oder Illumina, Artikel-Nr. 20005715
Gefrierschrank, -25 °C bis -15 °C	Allgemeiner Laborlieferant
Mikrozentrifuge	Allgemeiner Laborlieferant
Pipettierhilfe	Allgemeiner Laborlieferant
Kühlschrank, 2 °C bis 8 °C	Allgemeiner Laborlieferant
Einkanalpipetten, 20 µl	Allgemeiner Laborlieferant

Ausstattung	Anbieter
Einkanalpipetten, 200 µl	Allgemeiner Laborlieferant
Einkanalpipetten, 1.000 µl	Allgemeiner Laborlieferant
Vortexer	Allgemeiner Laborlieferant
Zentrifugen- und Rotoreinheit für Blutentnahmeröhrchen	
Vergleichbar:	Allgemeiner Laborlieferant
<ul style="list-style-type: none"> • Kühlzentrifuge, geeignet für 1.600 × g, mit Option zum Deaktivieren der Bremsfunktion • Ausschwingrotor mit Bechern • Bechereinsätze mit einer Mindestdiefe von 76 mm • Einsatzadapter geeignet für Blutentnahmeröhrchen von 16 x 100 mm 	
Empfohlen:	
<ul style="list-style-type: none"> • Allegra X12R Series Centrifuge, 1.600 g • Allegra Centrifuge GH-3.8 Rotor mit Bechern • Allegra Centrifuge Bucket Covers, 2er-Set • Allegra Centrifuge Adapter Assembly, 16 mm, 4er-Set 	Beckman Coulter, Artikel-Nr. 392304 (120 V oder 230 V)
	Beckman Coulter, Artikel-Nr. 369704
	Beckman Coulter, Artikel-Nr. 392805
	Beckman Coulter, Artikel-Nr. 359150
Zentrifugen- und Rotoreinheit für Mikroplatten	
Vergleichbar:	Allgemeiner Laborlieferant
<ul style="list-style-type: none"> • Zentrifuge, geeignet für 5.600 × g • Schwingrotor für Platten mit 96-Well-Plattenträgern, Mindestdiefe 76,5 mm • Multifuge X4 Pro-MD 120 V TX-1000BT • Sorvall Legend XTR Centrifuge 	Thermo Fisher Scientific, Nr. 75016034 Thermo Fisher Scientific, Katalog-Nr. 75004521 (120 V) oder Katalog-Nr. 75004520 (230 V)

Ausstattung	Anbieter
<ul style="list-style-type: none"> HIGHPlate 6000 Microplate Rotor Rotor high plate 6000 Stützplatte für Mikroplatten <ul style="list-style-type: none"> Empfohlen: <ul style="list-style-type: none"> MicroAmp 96-Well Support Base 96-Well PCR Plate Carrier 	Thermo Fisher Scientific, Katalog-Nr. 75003606 Thermo Scientific VWR, Katalog-Nr. 97040-244 Thermo Fisher Scientific, Katalog-Nr. 4379590 Thermo Fisher Scientific, Katalog-Nr. AB-0563/1000
Eine der folgenden oder ein gleichwertiger Mikroplatten-Reader (Fluorometer) mit SoftMax Pro v6.2.2–7.1.2: <ul style="list-style-type: none"> Gemini XPS SpectraMax M2, M3, M4 und M5. <ul style="list-style-type: none"> Der violette Einsatz ist für die Verwendung des Mikroplatten-Readers im Workflow erforderlich. 	Molecular Devices, Artikel-Nr. XPS Molecular Devices, Artikel-Nr. M2, M3, M4 und M5
SpectraMax High-Speed USB, Serial Adapter	Molecular Devices, Artikel-Nr. 9000-0938
Thermocycler mit den folgenden Spezifikationen: <ul style="list-style-type: none"> Beheizbarer Deckel Temperaturbereich: 4 °C bis 98 °C Temperaturgenauigkeit: ± 2 °C Mindestanstiegsrate: 2 °C pro Sekunde Kompatibel mit Twin.tec PCR Plate, 96-Well, mit Vollrahmen 	Allgemeiner Laborlieferant
VeriSeq NIPT Microlab STAR	Hamilton, Artikel-Nr. 95475-01 (115 V), Artikel-Nr. 95475-02 (230 V) oder Artikel-Nr. 806288 (für Hamilton Company Bonaduz)
VeriSeq Onsite Server v2 oder ein aktualisierter VeriSeq Onsite Server	illumina, Artikel-Nr. 20028403, 20047000 (v2) oder 20101927 oder 15076164 bzw. 20016240 (aktualisiert)
Bei Verwendung eines NextSeq 550Dx Sequencing System: <ul style="list-style-type: none"> NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5, 75 cycles 	illumina, Artikel-Nr. 20028870

Optionale, nicht bereitgestellte Ausstattung

Ausstattung	Anbieter
Pluggo Decapper System	LGP Consulting, Artikel-Nr. 4600 4450

Ausstattung	Anbieter
SpectraMax SpectraTest FL1-Platte zur Validierung der Fluoreszenz	Molecular Devices, Artikel-Nr. 0200-5060
Röhrchen-Revolver/-Rotator, 15-ml-Röhrchen, 40 U/min, 100–240 V	Thermo Scientific, Katalog-Nr. 88881001 (USA) oder Katalog-Nr. 88881002 (EU)

Erforderliche, jedoch nicht bereitgestellte Materialien

Verbrauchsmaterial	Anbieter
Leitfähige unsterile 1.000- μ l-Filterspitzen	Hamilton, Artikel-Nr. 235905
Leitfähige unsterile 300- μ l-Filterspitzen	Hamilton, Artikel-Nr. 235903
Leitfähige unsterile 50- μ l-Filterspitzen	Hamilton, Artikel-Nr. 235948
<p>Deep-Well-Behälter mit den folgenden Spezifikationen:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mikroplattenformat SLAS 1–2004 mit 96 Wells mit pyramidenförmigem oder konischem Boden und einer Mindestkapazität von 240 ml. • Polypropylen mit möglichst geringer DNA-Bindung für alle Oberflächen mit Probenkontakt. • Interne Abmessungen (Flüssigkeitsstand), die mit den automatischen Aspirations- und Abgabeschritten von VeriSeq NIPT Microlab STAR kompatibel sind. • Höhenabmessungen, die mit den automatischen Bewegungen von VeriSeq NIPT Microlab STAR kompatibel sind. 	<p>Allgemeiner Laborlieferant</p> <p>Kompatible Behälter:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Corning Axygen, Produkt-Nr. RES-SW96-HP-SI • Agilent, Produkt-Nr. 201246-100
<p>Reagenzreservoir mit den folgenden Spezifikationen:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Reservoir, das ohne übermäßige Kraftanwendung sicher im Träger des VeriSeq NIPT Microlab STAR sitzt und einen konischen Boden sowie eine Mindestkapazität von 20 ml aufweist. • RNase-/DNase-freies Polypropylen. • Behälter, deren Volumen so bemessen ist, dass die Pegel der Assay-Reagenzien (Flüssigkeitsstand) mit den automatischen Aspirations- und Abgabeschritten von VeriSeq NIPT Microlab STAR kompatibel sind. • Höhenabmessungen, die mit den automatischen Bewegungen von VeriSeq NIPT Microlab STAR kompatibel sind. 	<p>Kompatible Reservoirs:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Illumina Reagent Tub, Artikel-Nr. 20095418

Verbrauchsmaterial	Anbieter
<p>Deep-Well-Platten mit den folgenden Spezifikationen:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mikroplattenformat SLAS 1–2004, 3–2004 oder 4–2004 mit 96 Wells mit pyramidenförmigem oder konischem Boden und einer Well-Mindestkapazität von 2 ml. • Lichtdurchlässiges Polypropylen mit möglichst geringer DNA-Bindung für alle Oberflächen mit Probenkontakt. • Well-Abmessungen, bei denen sich ein Flüssigkeitsstand ergibt, der für die automatischen Aspirations- und Abgabeschritte von VeriSeq NIPT Microlab STAR geeignet ist. • Plattenschürze, bei der sich Plattenbarcodes sicher in der gewünschten Position auf einer ebenen Oberfläche platzieren lassen. • Mindestens bis zu einer Belastung von 5.600 × g verwindungssteifer Rahmen. • Plattenhöhen, die mit den automatischen Bewegungen von VeriSeq NIPT Microlab STAR kompatibel sind. 	<p>Allgemeiner Laborlieferant</p> <p>Kompatible Platten:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, Artikel-Nr. 0030505301 • Eppendorf, Artikel-Nr. 30502302 • USA Scientific, Artikel-Nr. 1896-2000
<p>384-Well-Platte mit den folgenden Spezifikationen:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mikroplatte mit 384 Wells, optimiert für geringe Volumen, Well-Mindestkapazität von 50 µl. • Schwarzes lichtundurchlässiges Polystyrol mit geringer DNA-Bindung für alle Oberflächen mit Probenkontakt. • Well-Abmessungen, bei denen sich Flüssigkeitsstände ergeben, die mit den automatischen Aspirations- und Abgabeschritten von VeriSeq NIPT Microlab STAR kompatibel sind. • Plattenhöhen, die mit den automatischen Bewegungen von VeriSeq NIPT Microlab STAR kompatibel sind. • Plattenschürze, bei der sich Plattenbarcodes sicher in der gewünschten Position auf einer ebenen Oberfläche platzieren lassen. 	<p>Allgemeiner Laborlieferant</p> <p>Kompatible Platten:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Corning, Produkt-Nr. 3820

Verbrauchsmaterial	Anbieter
<p>96-Well-Platte mit den folgenden Spezifikationen:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mikroplatte mit verwindungsstifem Rahmen mit einer Mindestbelastbarkeit von 5.600 × g sowie 96 durchsichtigen Wells mit konischen Böden, erhabenen Rändern und einer Well-Mindestkapazität von 150 µl. • RNase-/DNase-freies Polypropylen mit geringer DNA-Bindung für alle Oberflächen mit Probenkontakt. • Well-Abmessungen, bei denen sich Flüssigkeitsstände ergeben, die mit den automatischen Aspirations- und Abgabeschritten von VeriSeq NIPT Microlab STAR kompatibel sind. • Plattenhöhen, die mit den automatischen Bewegungen von VeriSeq NIPT Microlab STAR kompatibel sind. <p>HINWEIS: Kompatible Kunststoffwaren mit unterschiedlichen Artikelnummern, z. B. kompatible 96-Well-Platten verschiedener Hersteller, sind möglicherweise nicht direkt austauschbar, ohne dass eine teilespezifische Kalibrierung des VeriSeq NIPT Microlab STAR-Systems durch Service- und Support-Mitarbeiter von Illumina erfolgt. Wenden Sie sich bezüglich eines Wechsels von Kunststoffwaren an das Supportteam von Illumina.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Plattenschürze, bei der sich Plattenbarcodes sicher in der gewünschten Position auf einer ebenen Oberfläche platzieren lassen. • Kompatibel mit Thermocyclern zur Denaturierung. 	<p>Allgemeiner Laborlieferant</p> <p>Kompatible Platten:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, Artikel-Nr. 0030129512 • Eppendorf, Artikel-Nr. 30129580 • Eppendorf, Artikel-Nr. 30129598 • Eppendorf, Artikel-Nr. 30129660 • Eppendorf, Artikel-Nr. 30129679 • Bio-Rad, Artikel-Nr. HSP9601
<p>Eine der folgenden Verschlussfolien:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Microseal 'F' Foil • Verschlussfolien 	<p>Bio-Rad, Katalog-Nr. MSF1001 Beckman Coulter, Artikel-Nr. 538619</p>
<p>Cell-Free DNA BCT CE</p>	<p>Streck, Katalog-Nr. 218997</p>
<p>Verschlusskappen</p>	<p>Sarstedt, Bestell-Nr. 65.802</p>
<p>2-ml-Röhrchen mit Schraubverschluss</p>	<p>Allgemeiner Laborlieferant</p>
<p>20-µl-Filterspitzen für 20-µl-Pipettierer</p>	<p>Allgemeiner Laborlieferant</p>
<p>200-µl-Filterspitzen für 200-µl-Pipettierer</p>	<p>Allgemeiner Laborlieferant</p>
<p>1.000-µl-Filterspitzen für 1.000-µl-Pipettierer</p>	<p>Allgemeiner Laborlieferant</p>

Verbrauchsmaterial	Anbieter
Vergleichbar: <ul style="list-style-type: none"> Alkoholisches Schnelldesinfektionsspray Desinfizierende Reinigungsmittellösung Empfohlen: <ul style="list-style-type: none"> Deionisiertes Wasser und 70%iges Ethanol 	Allgemeiner Laborlieferant

Optionale, nicht bereitgestellte Materialien

Verbrauchsmaterial	Anbieter
DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung) für NTC-Proben (No Template Control, Negativkontrolle)	Allgemeiner Laborlieferant
Röhrchen mit Schraubverschluss, 10 ml (nur für Kontrollproben)	Sarstedt, Bestell-Nr. 60.551
Röhrchen mit Schraubverschluss, 50 ml	Allgemeiner Laborlieferant
Serologische 25-ml-Pipetten	Allgemeiner Laborlieferant
Serologische 10-ml-Pipetten	Allgemeiner Laborlieferant

Erfassen, Transportieren und Lagern von Proben



VORSICHT

Behandeln Sie alle Proben wie potenzielle Infektionserreger.

- Vollblutproben mit 7–10 ml müssen in zellfreien DNA-Blutentnahmeröhrchen von Streck (Streck Cell-Free DNA BCT) gesammelt werden. Frieren Sie die Proben nicht ein.
- Der Transport von Vollblut muss allen geltenden gesetzlichen Bestimmungen für den Transport von Infektionserregern entsprechen. Es wird Expresslieferung/-transport empfohlen.
- Lagern Sie die Proben während des Transports bei 4 °C bis 30 °C. Lagern Sie die Proben nach Empfang bis zur Verwendung bei 2 °C bis 8 °C. Die Zeitspanne zwischen Blutentnahme und erster Plasmaisolierung darf nicht länger als fünf Tage betragen.
- Falls ein erneuter Test erforderlich ist, können die Proben nach der Verarbeitung wieder verschlossen und weitere fünf Tage bei 4 °C gelagert werden (die maximale Lagerungszeit nach der Blutentnahme beträgt 10 Tage).



VORSICHT

Erhöhte Temperaturen oberhalb der oben genannten Bereiche können sich negativ auf die Fehlerrate einzelner Proben und/oder die Performance der Proben auswirken.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Dieser Assay enthält Proteinase K. Personen können sich durch Inhalation, orale Aufnahme oder durch den Kontakt mit der Haut oder den Augen verletzen. Die Verwendung muss in einem gut belüfteten Bereich stattfinden. Es ist Schutzkleidung zu tragen. Das Einatmen von Staub muss vermieden werden. Alle Behälter und nicht verwendeten Inhalte müssen gemäß den geltenden Sicherheitsvorschriften entsorgt werden.
- Dieser Assay enthält Guanidiniumchlorid. Personen können sich durch Inhalation, orale Aufnahme oder durch den Kontakt mit der Haut oder den Augen verletzen. Die Verwendung muss in einem gut belüfteten Bereich stattfinden. Es ist Schutzkleidung zu tragen. Alle Behälter und nicht verwendeten Inhalte müssen gemäß den vor Ort geltenden Sicherheitsvorschriften entsorgt werden.
- Dieser Assay enthält 2-Propanol, eine brennbare Chemikalie. Er muss von Hitze und offenen Flammen ferngehalten werden. Personen können sich durch Inhalation, orale Aufnahme oder durch den Kontakt mit der Haut oder den Augen verletzen. Die Verwendung muss in einem gut belüfteten Bereich stattfinden. Es ist Schutzkleidung zu tragen. Alle Behälter und nicht verwendeten Inhalte müssen gemäß den vor Ort geltenden Sicherheitsvorschriften entsorgt werden.
- Dieser Assay enthält Dimethylsulfoxid, eine korrosive und entflammbare Flüssigkeit. Personen können sich durch Inhalation, orale Aufnahme oder durch den Kontakt mit der Haut oder den Augen verletzen. Die Verwendung muss in einem gut belüfteten Bereich stattfinden. Es ist Schutzkleidung zu tragen. Alle Behälter und nicht verwendeten Inhalte müssen gemäß den vor Ort geltenden Sicherheitsvorschriften entsorgt werden.
- Um die Bildung von schädlichen Gasen zu verhindern, entsorgen Sie die Abfälle der cfDNA-Extraktion (enthalten Guanidinhydrochlorid) nicht zusammen mit Abfällen, die Bleiche (Natriumhypochlorit) enthalten.
- Behandeln Sie alle Proben so, als enthielten sie potenzielle Infektionserreger.
- Wenden Sie die routinemäßigen Vorsichtsmaßnahmen für das Labor an. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Essen, trinken oder rauchen Sie nicht in ausgewiesenen Arbeitsbereichen. Tragen Sie beim Umgang mit Proben und Assay-Reagenzien Einweghandschuhe und einen Laborkittel. Waschen Sie sich nach dem Umgang mit Proben und Assay-Reagenzien gründlich die Hände.
- Verwenden Sie Assay-Komponenten nicht mehr nach ihrem auf dem Etikett der Zubehör-Box angegebenen Verfallsdatum. Tauschen Sie Assay-Komponenten aus unterschiedlichen Assay-Chargen nicht gegeneinander aus. Die Assay-Charge ist auf dem Etikett der Zubehör-Box angegeben. Lagern Sie die Assay-Komponenten bei den angegebenen Temperaturen.
- Um den Abbau von Proben oder Reagenzien zu verhindern, stellen Sie sicher, dass alle Natriumhypochloritdämpfe der Reinigungslösung vollständig verflüchtigt sind, bevor Sie mit dem Protokoll beginnen.
- Wenn die beschriebenen Verfahren nicht eingehalten werden, kann dies zu fehlerhaften Ergebnissen oder einer wesentlichen Minderung der Probenqualität führen.
- Melden Sie schwerwiegende Vorkommnisse in Zusammenhang mit diesem Gerät unmittelbar an Illumina und die zuständigen Behörden des Mitgliedslandes, in dem sich Anwender und Patient befinden.

- Umwelt-, gesundheits- und sicherheitsbezogene Informationen finden Sie in den Sicherheitsdatenblättern (SDS, Safety Data Sheets) unter support.illumina.com/sds.html.

Verfahrenshinweise

Vermeiden einer Kontamination

- Verwenden Sie neue Spitzen und frische Labor-Verbrauchsmaterialien.
- Verwenden Sie aerosolresistente Spitzen, um eine Übertragung und Kreuzkontaminierung zwischen den Proben zu verhindern.
- Lassen Sie aufgrund des Kontaminationspotenzials äußerste Vorsicht walten, um sicherzustellen, dass der Well-Inhalt vollständig im Well verbleibt. Passen Sie auf, dass der Inhalt nicht verspritzt wird. Zentrifugieren Sie die Proben nach jedem Vortexmischer-Schritt.
- Befolgen Sie beim Umgang mit Blut und Blutderivaten die geltenden Verordnungen zur guten Laborpraxis und Hygiene.
- Verwenden Sie während der Bibliotheksvorbereitung keine aerosolhaltigen Bleichmittelsprays. Minimale Kontaminationen mit Bleichmittel können zu einem Fehlschlagen des Assays führen.
- Legen Sie Platten beim Entfernen der Verschlussfolie auf eine feste, ebene Fläche und halten Sie die Platten gut fest. Entfernen Sie die Verschlussfolie langsam und achten Sie darauf, dass die Verschlussfolie nicht die freiliegenden Wells berührt. Berühren Sie die freiliegenden Wells nicht und achten Sie darauf, dass die Inhalte nicht kontaminiert werden. Kreuzkontaminierung zwischen den Wells führt zu fehlerhaften Ergebnissen.

Reinigen des Decks von VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Bevor Sie das Deck verwenden, prüfen Sie, ob es sauber ist. Führen Sie mindestens einmal pro Woche die wöchentliche Wartung gemäß den Reinigungsanweisungen durch.
- Entfernen Sie alle entnehmbaren Träger, reinigen Sie diese mit einem alkoholischen Schnelldesinfektionsspray (deionisiertes Wasser und 70%iges Ethanol) und lassen Sie sie trocknen. Legen Sie stark verschmutzte Träger anschließend in ein Bad aus desinfizierender Reinigungsmittellösung, spülen Sie sie danach mit einem alkoholischen Desinfektionsmittel und lassen Sie sie trocknen.
- Öffnen Sie die Frontabdeckung und wischen Sie das Deck mit einem mit deionisiertem Wasser und 70%igem Ethanol getränkten Tuch ab. Prüfen Sie insbesondere die Gleitblöcke auf etwaige Verschmutzungen.
- Entfernen Sie das Basic Vacuum System(BVS)-Manifold und reinigen Sie das Manifold, die Dichtung und die Innenkammern des BVS mit einem Tuch. Reinigen Sie die Dichtung nicht mit Ethanol, andernfalls kann das Material spröde werden.
- Entsorgen Sie den Spitzen-Abfall des CORE 96-head und des unabhängigen Kanals.

- Entfernen Sie die Spitzenauswurfplatte der Spitzenabfallstation für die unabhängigen Kanäle und reinigen Sie sie wie folgt: Sprühen Sie deionisiertes Wasser und 70%iges Ethanol direkt auf die Oberfläche und wischen Sie sie ab. Streifen Sie einen neuen Kunststoffbeutel über den Rahmen und befestigen Sie diesen wieder. Setzen Sie die saubere Spitzenauswurfplatte wieder ein.
- Sprühen Sie deionisiertes Wasser und 70%iges Ethanol direkt auf die Oberfläche des Abfallbehälters des CORE 96-head und reiben und wischen Sie sie ab.
 - Wenn sich Ablagerungen von Spitzenabfall nur schwer entfernen lassen, tränken Sie ein Tuch mit DNase- und RNase-freiem Wasser und entfernen Sie damit die Ablagerungen. Entsorgen Sie das Tuch vorschriftsmäßig. Führen Sie anschließend die Sterilisierung mit dem alkoholischen Desinfektionsmittel durch.
- Befeuchten Sie ein fusselfreies Tuch oder Wattestäbchen mit 70%igem Ethanol. Tupfen Sie das Laserscanner-Fenster des Barcodescanners ab. Reinigen Sie mit demselben Tuch oder Wattestäbchen jeden Well des Adapters der CPAC-Platte. Wenn Sie ein Tuch verwenden, drücken Sie dieses mit der Rückseite eines Stifts in jeden Well des Adapters, um die Innenseiten der Wells ordnungsgemäß zu säubern.
- Reinigen Sie die unabhängigen Kanäle:
 - Reinigen Sie auf den unabhängigen Kanälen die Spitzenauswurfhülse (äußerer Teil der Pipettierkanäle) mit einem fusselfreien, mit deionisiertem Wasser und 70%igem Ethanol getränkten Tuch. (Siehe *Hamilton Microlab STAR Reference Guide (Referenzhandbuch zu Hamilton Microlab STAR)*, Nr. 15070074.)
 - Reinigen Sie die Anlaufscheibe und die O-Ringe des Pipettierkopfs (äußerer Teil der Pipettierkanäle) mit einem fusselfreien, mit deionisiertem Wasser und 70%igem Ethanol getränkten Tuch.
- Reinigen Sie den CORE 96-head:
 - Säubern Sie mit demselben fusselfreien, mit deionisiertem Wasser und 70%igem Ethanol getränkten Tuch das Gehäuse des CORE 96-head und den Boden der Anlaufscheiben.
 - Ziehen Sie dasselbe Tuch oder einen mit deionisiertem Wasser und 70%igem Ethanol getränkten Tuchstreifen um die Seiten der Pipettierkanäle des CORE 96-head, um die O-Ringe zu säubern. Führen Sie dies für jeden Pipettierkanal auf dem CORE 96-head durch.
- Sprühen Sie die Front- und Seitenabdeckung mit deionisiertem Wasser und 70%igem Ethanol ein und wischen Sie sie trocken.
- Reinigen Sie das Autoload-Schutzband mit einem mit deionisiertem Wasser und 70%igem Ethanol getränkten Tuch und reiben Sie es vorsichtig ohne Druck ab.
- Lassen Sie Deck und Komponenten vollständig trocknen und setzen Sie dann die Träger ein.

HINWEIS Eine unsachgemäße Reinigung und Wartung des ML STAR-Geräts kann zu einer Kreuzkontaminierung und der Beeinträchtigung der Assay-Performance führen.

Qualitätssicherung

Es können Kontrollproben mit bekannten Performancemerkmale bewertet werden, um Unterschiede in der Verarbeitung und den technischen Verfahren im Labor zu erkennen.

Das Ausführen einer Kontrollprobe oder einer Negativkontrolle (NTC, no template control) reduziert die Gesamtzahl der unbekannt mütterlichen Proben, die mit jeder Probenvorbereitung verarbeitet werden können.

Ein Batch mit 24 oder 48 Proben darf nicht mehr als zwei NTC-Proben enthalten, ein Batch mit 96 Proben darf nicht mehr als vier NTC-Proben enthalten.

Gebrauchsanweisung

Tipps und Techniken

Fahren Sie umgehend mit dem nächsten Schritt fort, außer wenn im Protokoll ein sicherer Haltepunkt angegeben ist.

Versehen von Platten mit Barcodes

- Barcodes für Vollschrzenplatten beginnen mit „PL“.
- Barcodes für Deep-Well-Platten beginnen mit „DW“.
- Bringen Sie die Barcodes bei Vollschrzenplatten und Deep-Well-Platten neben Spalte 12 an.
- Laden Sie die Platten so, dass der Barcode nach rechts zeigt, um das automatisierte Scannen zu ermöglichen.

Anbringen und Entfernen von Verschlussfolie auf der Platte

- Gehen Sie besonders vorsichtig vor, um Kreuzkontaminierung zu vermeiden. Auf der Unterseite der Verschlussfolie darf keine Flüssigkeit sichtbar sein.
 - Stellen Sie sicher, dass die freiliegende Unterseite der Verschlussfolie nicht mit freiliegenden Wells in Berührung kommt.
 - Berühren Sie freiliegende Wells nicht.
- Verschließen Sie die 96-Well-Platte stets vor den folgenden Schritten im Protokoll:
 - Zentrifugierschritte
 - Thermocycler-Schritte
- Legen Sie die Verschlussfolie auf die Platte und versiegeln Sie diese. Stellen Sie sicher, dass der Druck auf die gesamte Platte ausgeübt wird und die Versiegelung der einzelnen Wells dicht ist.
- Gehen Sie folgendermaßen vor, bevor Sie die Verschlussfolie von Platten entfernen:
 - Zentrifugieren Sie die 96-Well-Platte für 20 Sekunden bei 1.000 × g.

- Legen Sie die Platte auf eine ebene Oberfläche und entfernen Sie dann langsam die Verschlussfolie.

VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Führen Sie vor der Nutzung entsprechend den Anweisungen des Herstellers die erforderliche Wartung durch und dokumentieren Sie dies.
- Überwachen Sie das ML STAR-Gerät während der automatisierten Schritte. Achten Sie auf die Eingabeaufforderungen und die Anweisungen für den Bediener, die auf der Benutzeroberfläche der VeriSeq NIPT Workflow Manager v2-Software angezeigt werden.
- Halten Sie die Frontabdeckung während des Betriebs geschlossen.
- Halten Sie das Deck während des Betriebs völlig frei.
- Wenn während der Fehlerbehebung die Schaltfläche **Exclude** (Ausschließen) angezeigt wird, dürfen Sie diese Option unter keinen Umständen wählen. Wenn die Methode nach der Fehlerbehebung nicht fortgesetzt werden kann und nur begrenzte Optionen für die Fehlerbehebung zur Verfügung stehen, brechen Sie den Lauf ab.
- Wenn Sie von VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 während der Durchführung von Plattenvakuumschritten dazu aufgefordert werden, unterstützen Sie manuell die Bildung einer Dichtung zwischen der Platte und dem Vakuummanifold.
- Lassen Sie die Spitzen aus dem Adapter automatisch vom System entsorgen. Entfernen Sie Spitzen nur dann manuell, wenn Sie von der Software dazu aufgefordert werden.
- Entfernen Sie verbrauchte Reagenzien und verwendete Verbrauchsmaterialien, wenn Sie durch den Workflow Manager dazu aufgefordert werden.
- Leeren Sie täglich die Abfallflaschen des Vakuumsystems. Die erste Ballonflasche sollte niemals mehr als zur Hälfte gefüllt sein. Ein Überlaufen der Abfallflasche des Vakuumsystems kann zu Schäden an der Vakuumpumpe und zur Verminderung des vom System aufgebauten Vakuums führen.
- Laden Sie bei Batches mit 24, 48 und 96 Proben ein volles Rack mit einzeln abgezählten 8-Kanal-Spitzen, bevor Sie die Methode starten.

Verarbeitung von Proben

Verfahren

1. Führen Sie für jede Teilprobe die folgenden Schritte durch:
 - a. Zentrifugieren Sie die mit einem Barcode versehenen Proben 10 Minuten lang bei $1.600 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ mit ausgeschalteter Bremse.
 - b. Entnehmen Sie die Probenröhrchen, sobald die Zentrifuge vollkommen zum Stillstand gekommen ist. Beginnen Sie innerhalb von 15 Minuten nach der Zentrifugation mit der Plasmaisolation. Wiederholen Sie die Zentrifugation, falls mehr als 15 Minuten verstrichen sind.
2. Kontrollieren Sie jedes Röhrchen auf die Eignung der Probe. Stellen Sie hierbei sicher, dass
 - das Probenvolumen den Erwartungen entspricht,

- nach der Zentrifugation eine klare Trennung zwischen der Erythrozytenschicht und der Plasmaschicht der Proben zu erkennen ist,
- mindestens 1,5 ml Plasma oberhalb des Buffy-Coats vorhanden sind,
- die Probe nicht übermäßig hämolysiert ist (Plasma ist nicht tiefrot),
- die Probe nicht lipämisch ist (Plasma ohne weiße Trübung und nicht milchig-undurchsichtig) und
- keine Anzeichen von Gerinnung in der Probe vorhanden sind.



VORSICHT

Unsachgemäß gelagerte oder gehandhabte Proben sind u. U. ungeeignet. Die Verarbeitung ungeeigneter Proben im Workflow kann dazu führen, dass diese während der Extraktionen die Bindungsplatte verstopfen, sodass Probenmaterial in die umliegenden Wells überläuft.

3. Nehmen Sie die Deckel der Röhrchen ab und laden Sie diese in die Röhrchenträger. Laden Sie alle Proben und alle Plasma-Kontrollen für den Batch.



VORSICHT

Wählen Sie während der Fehlerbehebung die Option „Exclude“ (Ausschließen) nicht aus, wenn diese verfügbar ist. Wenn die Methode nach der Fehlerbehebung nicht fortgesetzt werden kann und nur begrenzte Optionen für die Fehlerbehebung zur Verfügung stehen, brechen Sie den Lauf ab.

Isolieren von Plasma

Vorbereitung

1. Beschriften Sie eine Deep-Well-Platte mit „Vorläufiges Plasma“ und versehen Sie sie mit einem Barcode.
2. Beschriften Sie eine Deep-Well-Platte mit „Endgültiges Plasma“ und versehen Sie sie mit einem Barcode.
3. Laden Sie bei Batches mit 24, 48 und 96 Proben ein volles Rack mit einzeln gezählten 8-Kanal-Spitzen, bevor Sie die Methode starten.



VORSICHT

Stellen Sie sicher, dass für die Platten „Vorläufiges Plasma“ und „Endgültiges Plasma“ der richtige Plattentyp verwendet wird. Die Verwendung eines Deep-Well-Behälters anstelle einer Deep-Well-Platte hat eine Vermischung der Proben und damit möglicherweise falsche Ergebnisse zur Folge.

Verfahren

1. Öffnen Sie den AppLauncher und wählen Sie anschließend **VeriSeq NIPT Method** (VeriSeq NIPT-Methode).
2. Geben Sie eine eindeutige Batch-ID sowie den Benutzernamen ein und wählen Sie dann **OK**.
Die Batch-ID kann ≤ 26 Zeichen enthalten. Sie können Zahlen, Buchstaben, Unterstriche (_) oder Bindestriche (-) verwenden. Beispiel: 2025-10-16_Batch3.

Bei der Batch-ID wird nicht zwischen Groß- und Kleinschreibung unterschieden. Nur nach Groß- und Kleinschreibung zu unterscheidende Batch-IDs gelten nicht als eindeutig.

Batchnamen müssen eindeutig sein und dürfen sich nicht nur durch unterschiedliche Groß-/Kleinschreibung unterscheiden. Beispielsweise sind die Batchnamen Batch01 und batch01 nicht eindeutig. Selbiges gilt für Proben-IDs.

3. Wählen Sie **New Batch** (Neuer Batch).
4. Wählen Sie nach der Initiierung **OK**, um mit der Plasmatisolation zu beginnen.
5. Wählen Sie die Batchgröße aus und wählen Sie anschließend **OK**.
6. Wählen Sie die Anzahl der Negativkontrollen (NTCs, No Template Controls) aus und wählen Sie anschließend **OK**.
NTC-Positionen werden stets zuletzt ausgewählt. Wenn sich beispielsweise in einem Lauf mit 24 Proben zwei NTCs befinden, befinden sich diese auf den Positionen 23 und 24.
7. Führen Sie einen der folgenden Schritte durch:
 - Um ein vorhandenes Probenblatt zu laden, wählen Sie das dem Batch zugeordnete Probenblatt und anschließend **OK**.
 - Um fortzufahren, ohne ein Probenblatt auszuwählen, wählen Sie **No Sample Sheet** (Kein Probenblatt).Informationen zum Erstellen eines Probenblatts finden Sie im *Softwarehandbuch zu VeriSeq NIPT Solution v2 (Dokument-Nr. 1000000067940)*.

HINWEIS Der Probentyp „Singleton“ (Einling) oder „Twins“ (Zwillinge), muss bei jeder Probe fehlerfrei protokolliert werden, um eine ordnungsgemäße Datenanalyse zu gewährleisten. Wenn Sie die Option **No Sample Sheet** (Kein Probenblatt) wählen, müssen Sie in den Workflow Manager Service Tools Standardwerte für die Proben festlegen. Weitere Informationen finden Sie im *Softwarehandbuch zu VeriSeq NIPT Solution v2 (Dokument-Nr. 1000000067940)*.

8. Vergewissern Sie sich, dass alle Barcodes angebracht wurden, und laden Sie die Proben, Spitzen und Platten (mit dem Barcode nach rechts) auf den Träger.
9. Wählen Sie nach jeder Aufforderung zum Laden **OK**.

Probenbatchgröße	Träger- typ	Schiene	Element	Position
24, 48, 96	Spitze	7–12	1.000-µl-Spitzen	5
			1.000-µl-Spitzen (nur für Batchgröße 96)	4, 5
	Röhrchen	15	Vorbereitete Blutprobenröhrchen 1–24 (für alle Batchgrößen)	1–24
	Röhrchen	16	Vorbereitete Blutprobenröhrchen 25–48 (nur für Batchgrößen 48 und 96)	25–48
	Röhrchen	17	Vorbereitete Blutprobenröhrchen 49–72 (nur für Batchgröße 96)	49–72
	Röhrchen	18	Vorbereitete Blutprobenröhrchen 73–96 (nur für Batchgröße 96)	73–96
	Multiflex	19–24	Leere Deep-Well-Platte „Endgültiges Plasma“, barcodiert	4
	Multiflex	19–24	Leere Deep-Well-Platte „Vorläufiges Plasma“, barcodiert	5
Reagenz	47	[Optional] Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) für NTC-Proben (No Template Control, Negativkontrolle)	5	

10. Stellen Sie sicher, dass die Träger, Laborausstattung und Reagenzien korrekt geladen sind.
11. Wählen Sie auf dem Bildschirm „Pre-Spin Deck Verification“ (Deck-Prüfung vor Zentrifugation) **OK**.
12. Überwachen Sie das ML STAR-Gerät während der automatisierten Schritte.
13. Wenn Sie durch den Workflow Manager entsprechend informiert werden, stellen Sie sicher, dass das Lade-Deck des ML STAR-Geräts frei von Hindernissen ist, damit das ML STAR-Gerät die Träger entladen kann.
14. Wählen Sie **Unload** (Entladen), um das Deck zu entladen.
15. Entfernen Sie die Deep-Well-Platte „Vorläufiges Plasma“ vom Träger wie folgt.
 - a. Prüfen Sie die Wells der Platte auf ein einheitliches Volumen (keine Pipettenfehler). Das Volumen sollte 1.000 µl betragen.
 - b. Verzeichnen Sie nach Abschluss der Plasmaisolation alle Abweichungen.
 - c. Versiegeln Sie die Platte, laden Sie diese mit Ausgleichsmaterial und zentrifugieren Sie sie 10 Minuten lang bei 5.600 × g mit ausgeschalteter Bremse oder Bremse auf der niedrigsten Einstellung.
16. Wählen Sie **Yes** (Ja), um mit der finalen Plasmavorbereitung fortzufahren.

17. Entfernen Sie die Plattenversiegelung und platzieren Sie die Platte erneut auf den Träger.

Probenbatchgröße	Träger- typ	Schiene	Element	Position
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Deep-Well-Platte „Vorläufiges Plasma“	5

18. Aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Intermediate Plasma plate has been spun** (Platte „Vorläufiges Plasma“ wurde zentrifugiert) und wählen Sie **OK**.

19. Überwachen Sie das ML STAR-Gerät während der automatisierten Schritte.

20. Wenn Sie durch den Workflow Manager entsprechend informiert werden, stellen Sie sicher, dass das Lade-Deck des ML STAR-Geräts frei von Hindernissen ist, damit das ML STAR-Gerät die Träger entladen kann.

21. Wählen Sie **Unload** (Entladen), um das Deck zu entladen.

22. Leeren Sie die Träger und das Deck, wenn Sie vom Workflow Manager dazu aufgefordert werden.

23. Entfernen Sie die Deep-Well-Platte „Endgültiges Plasma“.

24. Kontrollieren Sie die Platte auf folgende Fehler:

- uneinheitliche Volumen in den einzelnen Wells. Das Volumen sollte 900 µl betragen.
- sichtbare Zellpellets.
- übermäßige Hämolyse.

Wenn anormale Zellpellets sichtbar sind oder Sie eine übermäßige Hämolyse feststellen, machen Sie die betroffene Probe am Ende der Plasmaisolierung ungültig oder verwenden Sie den Batch Manager. Weitere Informationen zum Batch Manager finden Sie im *Softwarehandbuch zu VeriSeq NIPT Solution v2* (Dokument-Nr. 1000000067940).

25. Wenn Sie vom Workflow Manager dazu aufgefordert werden, wählen Sie **OK**.

26. Geben Sie Anmerkungen zu den betroffenen Wells ein und wählen Sie anschließend **OK**.

27. Führen Sie einen der folgenden Schritte durch.

- Um mit der cfDNA-Extraktion fortzufahren, wählen Sie **Yes** (Ja).
- Wählen Sie zum Anhalten **Exit** (Beenden).

SICHERER HALTEPUNKT

Wenn Sie den Vorgang stoppen, versiegeln Sie die Platte „Endgültiges Plasma“ und lagern Sie sie bis zu 7 Tage lang bei 2 °C bis 8 °C.

Extraktion der cfDNA

Vorbereitung

1. Inspizieren Sie die Extraktions- und die Zubehör-Box visuell, um sicherzustellen, dass das Kit nicht abgelaufen ist.

2. Bereiten Sie die folgenden Reagenzien vor: Beschriften Sie die Behälterreservoirs und die Deep-Well-Behälter mit den Namen der Reagenzien.

Reagenz	Lagerung	Anweisungen
Deep-Well-Platte „Endgültiges Plasma“	2 °C bis 8 °C	Wenn die Platte zuvor gelagert wurde, legen Sie sie 30 Minuten beiseite, um sie auf Raumtemperatur zu bringen. Zentrifugieren Sie 20 Sekunden lang bei 1.000 × g. Entfernen Sie die Verschlussfolie der Deep-Well-Platte „Endgültiges Plasma“, bevor Sie sie verwenden.

3. Geben Sie langsam 3,75 ml Proteinase Buffer in jedes Reagenzienfläschchen mit Proteinase K.
- Bereiten Sie drei Fläschchen für 24 und 48 Proben vor.
 - Bereiten Sie vier Fläschchen für 96 Proben vor.
4. Verschließen Sie die Proteinase-K-Fläschchen und mischen Sie mit dem Vortexmischer, bis das Reagenz resuspendiert ist.



VORSICHT

Vermeiden Sie unbedingt eine Verunreinigung des Gummipfropfens. Fremde Substanzen auf dem Gummipfropfen können zukünftige Proben kontaminieren.

5. Poolen Sie die vorbereitete Proteinase K aus allen Fläschchen in einem Reagenzreservoir und beschriften Sie dieses mit Proteinase K.
6. Geben Sie 100 ml 100%iges Ethanol in jede Wash Buffer II-Reagenzienflasche.
- Bereiten Sie eine Flasche für 24 und 48 Proben vor.
 - Bereiten Sie zwei Flaschen für 96 Proben vor.
7. Invertieren Sie die Wash Buffer II-Flaschen zum Mischen.
8. Markieren Sie die Kästchen auf den Wash Buffer II-Flaschen.
9. Beschriften Sie eine neue Vollschränplatte mit „Intermediate“ (Intermediat) und versehen Sie sie mit einem Platten-Barcode.
10. Beschriften Sie eine neue Vollschränplatte mit „cfDNA Elution“ (cfDNA-Elution) und versehen Sie sie mit einem Platten-Barcode.
11. Beschriften Sie eine neue Deep-Well-Platte mit „Extraction Intermediate“ (Extraktions-Intermediat) und versehen Sie sie mit einem Platten-Barcode.
12. Versehen Sie die DNA Binding-Platte mit einem Platten-Barcode.
13. Verschließen Sie bei Batches mit 24 und 48 Proben nicht verwendete Wells mit Verschlussfolie.
14. Bereiten Sie eine 70%ige Ethanol-Reinigungslösung (70 % Ethanol, 30 % DNase-/RNase-freies Wasser) für die Reinigung des Vakuumsystems vor.

15. Bereiten Sie das Vakuumsystem wie folgt vor.
 - a. Entfernen Sie das Vakuummanifold und reinigen Sie es mit 70%igem Ethanol.
Reinigen Sie die Dichtung nicht mit Ethanol, andernfalls kann das Material spröde werden.
 - b. Leeren Sie den Abfallbehälter des Vakuumsystems.
 - c. Vergewissern Sie sich, dass das ML STAR-Vakuumsystem eingeschaltet ist.

Verfahren

1. Wählen Sie **OK**, um die cfDNA-Extraktion zu starten.
2. Falls **VeriSeq NIPT Method** (VeriSeq NIPT-Methode) noch nicht geöffnet ist:
 - a. Öffnen Sie den AppLauncher und wählen Sie anschließend **VeriSeq NIPT Method** (VeriSeq NIPT-Methode).
 - b. Geben Sie die Batch-ID sowie den Benutzernamen ein und wählen Sie dann **OK**.
3. Laden Sie Pipettenspitzen wie folgt auf die Spitzenträger und wählen Sie anschließend **OK**.



VORSICHT

Fügen Sie ein volles Rack mit 8-Kanal-Spitzen hinzu, bevor Sie die Methode für Batches mit 24, 48 und 96 Proben starten.

Probenbatchgröße	Trägertyp	Schiene	Element	Position
24	Spitze	1–6	1.000- μ l-Spitzen	1
		7–12	300- μ l-Spitzen	1
48	Spitze	1–6	1.000- μ l-Spitzen	1, 2
		7–12	300- μ l-Spitzen	1
96	Spitze	1–6	1.000- μ l-Spitzen	1, 2, 3, 4
		7–12	300- μ l-Spitzen	1

4. Laden Sie abgezählte Spitzen wie folgt auf die Spitzenträger.

Probenbatchgröße	Trägertyp	Schiene	Element	Position
24, 48, 96	Spitze	49–54	1.000- μ l-Spitzen	1
			300- μ l-Spitzen	2
			50- μ l-Spitzen	3

5. Geben Sie die Position der ersten und letzten Spitze für jedes Spitzen-Rack ein und wählen Sie anschließend **OK**.

6. Scannen Sie die Barcodes der Extraktions-Box.
7. Geben Sie den Benutzernamen oder die Initialen der Person ein, die die Reagenzien vorbereitet hat, und wählen Sie anschließend **OK**.
8. Scannen Sie die Barcodes der Zubehör-Box.
9. Geben Sie den Benutzernamen oder die Initialen der Person ein, die die Reagenzien vorbereitet hat, und wählen Sie anschließend **OK**.
10. Vergewissern Sie sich, dass die Barcodes angebracht sind.
11. Entfernen Sie ggf. die Verschlussfolie der Deep-Well-Platte „Endgültiges Plasma“, bevor Sie sie verwenden.
12. Laden Sie die Platten (mit dem Barcode nach rechts) wie folgt auf den Plattenträger und wählen Sie anschließend **OK**.

Probenbatchgröße	Trägertyp	Schiene	Element	Position
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Neue Vollschürzenplatte „Intermediate“ (Intermediat), mit Barcode	1
			Neue Vollschürzenplatte „cfDNA Elution“ (cfDNA-Elution), mit Barcode	2
			Neue Deep-Well-Platte „Extraction Intermediate“ (Extraktions-Intermediat), mit Barcode	4
			Deep-Well-Platte „Final Plasma“ (Endgültiges Plasma), mit Barcode	5

13. Vergewissern Sie sich, dass die DNA Binding-Platte mit einem Barcode versehen ist, und wählen Sie anschließend **OK**.
14. Schneiden Sie bei Batches mit Teilplatten eine Versiegelung zurecht und bringen Sie diese über den nicht verwendeten Wells (Spalten 4–12 für Batches mit 24 Proben und Spalten 7–12 für Batches mit 48 Proben) an.
15. Legen Sie die DNA Binding-Platte so auf das Vakuummanifold, dass sich der Barcode auf der rechten Seite befindet.
16. Führen Sie eine Sichtprüfung der Wells auf mögliche Verstopfungen durch, bevor Sie die Binding-Platte auf das BVS-Manifold setzen.
Diese können den Fluss der Reagenzien unter Vakuum behindern.
17. Verschließen Sie bei Batches mit 24 oder 48 Proben nicht verwendete Wells mit Verschlussfolie. Aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (Sind die Spalten der DNA Binding-Platte versiegelt?) und wählen Sie anschließend **OK**.

18. Laden Sie die Reagenzreservoirs wie folgt auf den Reagenzenträger und wählen Sie anschließend **OK**.

Probenbatchgröße	Trägertyp	Schiene	Element	Position
24, 48	Reagenz	47	16 ml Elution Buffer	1
			11 ml Proteinase K	2
96	Reagenz	47	16 ml Elution Buffer	1
			15 ml Proteinase K	2

19. Geben Sie die angegebenen Reagenzien in die Deep-Well-Behälter und laden Sie dann die Behälter wie folgt auf die Deep-Well-Träger.

20. Wählen Sie **OK**.

Probenbatchgröße	Trägertyp	Schiene	Element	Position
24, 48	Deep-Well	39–44	125 ml Wash Buffer II	1
			125 ml Wash Buffer I	2
			60 ml Ethanol, 100 %	3
			100 ml Lysis Buffer	4
			60 ml DNase-/RNase-freies Wasser	5
96	Deep-Well	39–44	200 ml Wash Buffer II	1
			125 ml Wash Buffer I	2
			100 ml Ethanol, 100 %	3
			100 ml Lysis Buffer	4
			100 ml DNase-/RNase-freies Wasser	5

21. Warten Sie, bis die automatisierte Prüfung des Reagenzienvolumens abgeschlossen ist.

22. Stellen Sie sicher, dass der Abfallbehälter des Vakuumsystems leer ist (zur Hälfte gefüllt empfohlen), und wählen Sie anschließend **OK**.

23. Stellen Sie sicher, dass Träger, Laborausstattung und Reagenzien ordnungsgemäß platziert sind, und wählen Sie anschließend auf dem Bildschirm „Extraction Deck Verification“ (Extraktions-Deck-Prüfung) **OK**.

24. Überwachen Sie das ML STAR-Gerät während der automatisierten Schritte.



VORSICHT

Bei vom System nicht erkannten Probenüberläufen müssen Sie alle betroffenen Proben manuell ungültig machen, bevor umliegende Wells verunreinigt werden.

25. Entfernen Sie nach dem abschließenden Vakuumschritt die DNA Binding-Platte und reinigen Sie die untere Oberfläche mit 70%igem Ethanol.

26. Versiegeln Sie die offenen Wells auf der DNA Binding-Platte und platzieren Sie anschließend die DNA Binding-Platte auf der leeren Deep-Well-Platte „Endgültiges Plasma“.
27. Zentrifugieren Sie die Einheit aus DNA Binding- und „Endgültiges Plasma“-Platte 10 Minuten lang bei $5.600 \times g$ mit eingeschalteter Bremse.
28. Wählen Sie **OK**.
29. Reinigen Sie während der Zentrifugation der DNA Binding-Platte das Vakuumsystem:
 - a. Entfernen Sie das Vakuummanifold und wählen Sie anschließend **OK**.
 - b. Warten Sie, bis die automatisierte Abfallentsorgung abgeschlossen ist.
 - c. Reinigen Sie das Vakuummanifold und das Innere des Vakuumsystems mit 70%igem Ethanol und setzen Sie dann das Vakuummanifold ein.
 - d. Aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Manifold is on Vacuum** (Manifold unter Vakuum), um den Transfer der Elution-Platte in das Vakuummanifold einzuleiten, und wählen Sie anschließend **OK**.
30. Entfernen Sie nach dem Zentrifugieren die Verschlussfolie von den Wells mit Proben auf der DNA Binding-Platte.
31. Platzieren Sie die DNA Binding-Platte auf der cfDNA Elution-Platte, die sich auf dem Vakuummanifold befindet.
32. Laden Sie die DNA Binding-Platte so, dass der Barcode sich auf der rechten Seite befindet, und wählen Sie anschließend **OK**.
33. Überwachen Sie das ML STAR-Gerät während der automatisierten Schritte.
34. Aktivieren Sie nach dem Inkubationsschritt das Kontrollkästchen **Plates are assembled as indicated** (Platten sind wie angegeben zusammengefügt). Bestätigen Sie, dass sich die Einheit aus DNA Binding- und cfDNA Elution-Platte auf der Stützplatte befindet (wenn für die Zentrifuge erforderlich).
35. Versiegeln Sie die offenen Wells auf der DNA Binding-Platte.
36. Führen Sie zwei Minuten lang eine Zentrifugation mit $5.600 \times g$ bei aktivierter Bremse durch und wählen Sie anschließend **OK**.
37. Kontrollieren Sie die Wells der cfDNA Elution-Platte per Sichtprüfung auf ein einheitliches Volumen. Das Volumen sollte ca. $55 \mu\text{l}$ betragen.
38. Versiegeln Sie die cfDNA Elution-Platte und legen Sie sie für die Bibliotheksvorbereitung beiseite.
39. Wenn Sie durch den Workflow Manager entsprechend informiert werden, stellen Sie sicher, dass das Lade-Deck des ML STAR-Geräts frei von Hindernissen ist, damit das ML STAR-Gerät die Träger entladen kann.
40. Wählen Sie **Unload** (Entladen), um das Deck zu entladen.
41. Entladen Sie alle Träger, reinigen Sie das ML STAR-Deck und wählen Sie anschließend **OK**.
42. Geben Sie Anmerkungen zu den betroffenen Wells ein und wählen Sie anschließend **OK**.
43. Führen Sie einen der folgenden Schritte durch:
 - Wählen Sie **Yes** (Ja), um mit dem Vorbereiten der Bibliotheken fortzufahren.
 - Wählen Sie zum Anhalten **Exit** (Beenden).

SICHERER HALTEPUNKT

Wenn Sie den Vorgang stoppen, versiegeln Sie die cfDNA Elution Plate und lagern Sie sie bis zu 7 Tage lang bei -25 °C bis -15 °C.

Vorbereiten der Bibliotheken

Vorbereitung

1. Kontrollieren Sie die Bibliotheksvorbereitungs- und die Zubehör-Box, um sicherzustellen, dass das Kit nicht abgelaufen ist.
2. Bereiten Sie die folgenden Reagenzien vor: Beschriften Sie die Behälterreservoirs und die Deep-Well-Behälter mit den Namen der Reagenzien.

Reagenz	Lagerung	Anweisungen
A-Tailing Mix	-25 °C bis -15 °C	Lassen Sie das Reagenz bei Raumtemperatur auftauen. Mischen Sie mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
cfDNA Elution Plate	-25 °C bis -15 °C	Wenn die Platte gelagert wurde, stellen Sie sicher, dass sie nicht länger als 7 Tage gelagert wurde, und lassen Sie sie bei Raumtemperatur auftauen. Mischen Sie 1 Minute lang mit dem Vortexmischer bei 1.500 U/min. Zentrifugieren Sie 20 Sekunden lang bei 1.000 × g.
End Repair Mix	-25 °C bis -15 °C	Lassen Sie das Reagenz bei Raumtemperatur auftauen. Mischen Sie mit dem Vortexmischer.
Hybridization Buffer	-25 °C bis -15 °C	Lassen Sie das Reagenz bei Raumtemperatur auftauen. Mischen Sie mit dem Vortexmischer. Lagern Sie das Reagenz nach Gebrauch.
Ligation Mix	-25 °C bis -15 °C	Lassen Sie das Reagenz bei Raumtemperatur auftauen. Mischen Sie mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
NIPT DNA Adapter Plate	-25 °C bis -15 °C	Lassen Sie das Reagenz bei Raumtemperatur auftauen. Mischen Sie mit dem Vortexmischer. Zentrifugieren Sie 20 Sekunden lang bei 1.000 × g.
Resuspension Buffer	2 °C bis 8 °C	Mischen Sie mit dem Vortexmischer. Lagern Sie das Reagenz nach Gebrauch.
Sample Purification Beads	2 °C bis 8 °C	Legen Sie die Beads 30 Minuten beiseite, um sie auf Raumtemperatur zu bringen. Mischen Sie vor der Verwendung kräftig mit dem Vortexmischer. Mischen Sie mit dem Vortexmischer oder durch Inversion, bis alle Beads suspendiert sind und die Mischung homogen ist.

**VORSICHT**

Gehen Sie beim Öffnen der NIPT DNA Adapter Plate besonders vorsichtig vor, um eine Aerosol-Kreuzkontaminierung zwischen den Wells zu verhindern, die die Ergebnisse verfälschen kann.

3. Wenn die cfDNA Elution Plate gefroren gelagert wurde, bereiten Sie sie wie folgt vor.
 - a. Lassen Sie das Reagenz bei Raumtemperatur auftauen.
 - b. Mischen Sie 1 Minute lang mit dem Vortexmischer bei 1.500 U/min.
 - c. Zentrifugieren Sie 20 Sekunden lang bei 1.000 × g.
4. Beschriften Sie eine neue Vollschränzenplatte mit „Bibliotheken“ und versehen Sie sie mit einem Platten-Barcode.
5. Bereiten Sie 80%iges Ethanol aus reinem Ethanol vor. Mischen Sie 40 ml 100%iges Ethanol und 10 ml DNase-/RNase-freies Wasser. Invertieren Sie sie zum Mischen.
6. Vergewissern Sie sich, dass die ML STAR-Thermalkontrolle eingeschaltet ist.

Verdünnen von Enzymen

1. Geben Sie A-Tailing Mix und Resuspension Buffer in ein Röhrchen mit Schraubverschluss. Mischen Sie mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.

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

2. Geben Sie Ligation Mix und Resuspension Buffer in ein Röhrchen mit Schraubverschluss. Mischen Sie mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.

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

Verfahren

1. Wählen Sie **OK**, um die Bibliotheksvorbereitung zu starten. Falls **VeriSeq NIPT Method** (VeriSeq NIPT-Methode) noch nicht geöffnet ist:
 - a. Öffnen Sie den AppLauncher und wählen Sie **VeriSeq NIPT Method** (VeriSeq NIPT-Methode).
 - b. Geben Sie die Batch-ID sowie den Benutzernamen ein und wählen Sie dann **OK**.
2. Stellen Sie sicher, dass folgende Verbrauchsmaterialien so vorbereitet werden, wie im Bildschirm „Reagent Preparation“ (Reagenzienvorbereitung) angegeben:
 - A-Tailing Mix, Ligation Mix und 80%iges Ethanol
 - Sample Purification Beads, End Repair Mix und NIPT DNA Adapter Plate
3. Aktivieren Sie die Kontrollkästchen und wählen Sie anschließend **OK**.

4. Scannen Sie die Barcodes der Bibliotheksvorbereitungs-Box.
5. Geben Sie den Benutzernamen oder die Initialen der Person ein, die die Reagenzien vorbereitet hat, und wählen Sie anschließend **OK**.
6. Scannen Sie die Barcodes der Zubehör-Box.
7. Geben Sie den Benutzernamen oder die Initialen der Person ein, die die Reagenzien vorbereitet hat, und wählen Sie anschließend **OK**.
8. Laden Sie Spitzen wie folgt auf die Spitzenträger und wählen Sie anschließend für jeden Träger **OK**.

Probenbatchgröße	Trägertyp	Schiene	Element	Position
24	Spitze	1–6	50- μ l-Spitzen	1
		7–12	300- μ l-Spitzen	1, 2
48	Spitze	1–6	50- μ l-Spitzen	1, 2
		7–12	300- μ l-Spitzen	1, 2, 3, 4
96	Spitze	1–6	50- μ l-Spitzen	1, 2, 3, 4
		7–12	300- μ l-Spitzen	1, 2, 3, 4, 5

9. Wenn Sie das Protokoll nach dem cfDNA-Extraktionsverfahren gestoppt haben, laden Sie abgezählte Spitzen wie folgt auf die Spitzenträger.

Probenbatchgröße	Trägertyp	Schiene	Element	Position
24, 48, 96	Spitze	49–54	1.000- μ l-Spitzen	1
			300- μ l-Spitzen	2
			50- μ l-Spitzen	3

10. Geben Sie für jedes Spitzen-Rack die Position der ersten Spitze ein und wählen Sie anschließend **OK**.
11. Bestätigen Sie, dass Barcodes angebracht wurden, laden Sie die Platten (mit dem Barcode nach rechts) wie folgt auf den Plattenträger und wählen Sie anschließend **OK**.

Probenbatchgröße	Trägertyp	Schiene	Element	Position
24, 48, 96	Multiflex	19–24	cfDNA Elution Plate, mit Barcode	1
			NIPT DNA Adapter Plate, mit Barcode	2
			Neue 96-Well-Vollschürzenplatte, Bibliotheken, mit Barcode	3
			Neue 96-Well-Vollschürzenplatten	4, 5

12. Laden Sie den Deep-Well-Träger wie folgt und wählen Sie anschließend **OK**.

Probenbatchgröße	Trägertyp	Schiene	Element	Position
24, 48, 96	Deep-Well	39–44	50 ml 80%iges Ethanol in einem Deep-Well-Behälter	1
			Neue 96-Well-Vollschürzenplatten	2, 3, 4, 5

13. Laden Sie die Reagenzreservoirs wie folgt auf den Reagenzienträger und wählen Sie anschließend **OK**.

Probenbatchgröße	Trägertyp	Schiene	Element	Position
24, 48, 96	Reagenz	47	2,5 ml End Repair Mix	1
			Vorbereiteter A-Tailing Mix (Gesamtvolumen)	2
			Vorbereiteter Ligation Mix (Gesamtvolumen)	3
			10 ml Sample Purification Beads	4
			12 ml Hybridization Buffer	5

14. Bewahren Sie den Rest der 12 ml Hybridization Buffer (HT1) in dem Behälter für das Pooling auf.

15. Stellen Sie sicher, dass die Träger, Laborausstattung und Reagenzien wie angegeben geladen wurden, und wählen Sie anschließend auf dem Bildschirm „Library Deck Verification“ (Bibliotheken-Deck-Prüfung) **OK**.

16. Warten Sie, bis die automatisierte Prüfung des Reagenzienvolumens abgeschlossen ist.

17. Überwachen Sie das ML STAR-Gerät während der automatisierten Schritte.

18. Wenn Sie durch den Workflow Manager entsprechend informiert werden, stellen Sie sicher, dass das Lade-Deck des ML STAR-Geräts frei von Hindernissen ist, damit das ML STAR-Gerät die Träger entladen kann.

19. Wählen Sie **Unload** (Entladen), um das Deck zu entladen.

20. Prüfen Sie die Wells der Platte „Bibliotheken“ auf ein einheitliches Volumen.



VORSICHT

Wenn die Wells uneinheitlich gefüllt sind, bestehen die Proben die automatische Qualitätssicherung u. U. nicht.

21. Wenn Sie die Platte „Bibliotheken“ lagern möchten, versiegeln Sie sie und halten Sie sie bereit.

22. Entladen Sie die Träger, reinigen Sie das Deck und wählen Sie anschließend **OK**.

23. Geben Sie Anmerkungen zu den betroffenen Wells ein und wählen Sie anschließend **OK**.

24. Führen Sie einen der folgenden Schritte durch:

- Wählen Sie **Yes** (Ja), um mit dem Quantifizieren der Bibliotheken fortzufahren.
- Wählen Sie zum Anhalten **Exit** (Beenden).

SICHERER HALTEPUNKT

Wenn Sie den Vorgang stoppen, versiegeln Sie die Platte „Bibliotheken“, bevor Sie sie lagern. Die Platte „Bibliotheken“ ist bis zu sieben Tage stabil, wenn sie bei -25 °C bis -15 °C gelagert wird.

Quantifizieren der Bibliotheken**Vorbereitung**

1. Bereiten Sie die folgenden Reagenzien vor:

Reagenz	Lagerung	Anweisungen
DNA Quantification Reagent	2 °C bis 8 °C	Schützen Sie das Reagenz vor Licht. Lassen Sie das Reagenz 30–150 Minuten lang bei Raumtemperatur auftauen. (Es wird empfohlen, das Reagenz zu Beginn der Bibliotheksvorbereitung zu entnehmen.) Mischen Sie mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
DNA Quantification Standard	2 °C bis 8 °C	Mischen Sie mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie anschließend kurz.
Resuspension Buffer	2 °C bis 8 °C	Mischen Sie mit dem Vortexmischer.

2. Wenn die Platte „Bibliotheken“ gefroren gelagert wurde, bereiten Sie sie wie folgt vor.
 - a. Stellen Sie sicher, dass die Platte nicht länger als 7 Tage gelagert wurde, und lassen Sie sie bei Raumtemperatur auftauen.
 - b. Mischen Sie mit dem Vortexmischer.
 - c. Zentrifugieren Sie 1 Minute lang bei 1.000 × g.
3. Schalten Sie den Fluorometer 10 Minuten vor Gebrauch ein.
4. Versehen Sie eine neue 384-Well-Platte mit einem Barcode.
5. Versehen Sie eine neue Vollschürzenplatte mit einem Barcode.

Verfahren

1. Wählen Sie **OK**, um die Quantifizierung zu starten.
2. Falls VeriSeq NIPT Method (VeriSeq NIPT-Methode) noch nicht geöffnet ist:
 - a. Öffnen Sie den AppLauncher und wählen Sie **VeriSeq NIPT Method** (VeriSeq NIPT-Methode).
 - b. Geben Sie die Batch-ID sowie den Benutzernamen ein und wählen Sie dann **OK**.
3. Scannen Sie die Barcodes der Zubehör-Box.
4. Geben Sie den Benutzernamen oder die Initialen der Person ein, die die Reagenzien vorbereitet hat, und wählen Sie anschließend **OK**.

5. Laden Sie Pipettenspitzen wie folgt auf den Spitzenträger und wählen Sie anschließend **OK**.

Probenbatchgröße	Träger- typ	Schiene	Element	Position
24, 48	Spitze	1–6	300-µl-Spitzen-Rack	1
			50-µl-Spitzen-Rack	2
96	Spitze	1–6	300-µl-Spitzen-Rack	1
			50-µl-Spitzen-Rack	2, 3

6. Vergewissern Sie sich, dass die Barcodes angebracht sind.
 7. Entfernen Sie ggf. die Verschlussfolie der Platte „Bibliotheken“.
 8. Laden Sie die Platten (mit dem Barcode nach rechts) wie folgt auf den Multiflex-Träger und wählen Sie anschließend **OK**.

Probenbatchgröße	Träger- typ	Schiene	Element	Position
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Neue Vollschrürzenplatten, mit Barcode	1
			Neue 384-Well-Platte, mit Barcode	2
			Platte „Bibliotheken“, mit Barcode	3
			Neue 96-Well-Vollschrürzenplatten	4, 5

9. Laden Sie die Reagenzröhrchen ohne Deckel wie folgt in den Röhrchenträger und wählen Sie anschließend **OK**.

Probenbatchgröße	Träger- typ	Schiene	Element	Position
24, 48, 96	Röhrchen	46	DNA Quantification Standard	1
			DNA Quantification Reagent	2

10. Laden Sie die Reagenzreservoirs wie folgt auf den Reagenzenträger und wählen Sie anschließend **OK**.

Probenbatchgröße	Träger- typ	Schiene	Element	Position
24, 48, 96	Reagenz	47	Neues Reagenzreservoir (leer)	1
			16 ml Resuspension Buffer	2

11. Wenn Sie das Protokoll nach der Bibliotheksvorbereitung gestoppt haben, laden Sie abgezählte Spitzen wie folgt auf den Spitzenträger.

Probenbatchgröße	Träger- typ	Schiene	Element	Position
24, 48, 96	Spitze	49–54	1.000-µl-Spitzen	1
			300-µl-Spitzen	2
			50-µl-Spitzen	3

12. Geben Sie die Position der ersten und letzten Spitze für jedes Spitzen-Rack ein und wählen Sie anschließend **OK**.
13. Stellen Sie sicher, dass Träger, Laborausstattung und Reagenzien wie angegeben geladen sind, und wählen Sie anschließend im Bildschirm „Quant Deck Verification“ (Quant-Deck-Prüfung) **OK**.
14. Warten Sie, bis die automatisierte Prüfung des Reagenzienvolumens abgeschlossen ist.
15. Überwachen Sie das ML STAR-Gerät während der automatisierten Schritte.
16. Wenn Sie durch den Workflow Manager entsprechend informiert werden, stellen Sie sicher, dass das Lade-Deck des ML STAR-Geräts frei von Hindernissen ist, damit das ML STAR-Gerät die Träger entladen kann.
17. Wählen Sie **Unload** (Entladen), um das Deck zu entladen.
18. Entladen Sie die Platte „Bibliotheken“.
- Prüfen Sie die Wells der Platte auf ein einheitliches Volumen.
 - Versiegeln Sie die Platte „Bibliotheken“ und lagern Sie sie bei Raumtemperatur, bis die Analyse der fluorometrischen Daten abgeschlossen ist.
19. Entladen Sie die verbleibenden 96-Well-Platten und prüfen Sie die Wells auf ein einheitliches Volumen. Grobe Fehler bei den Volumina können auf ein Problem bei den Pipettierschritten hindeuten.
20. Entladen Sie die 384-Well-Platte und prüfen Sie, ob die entsprechenden Wells Flüssigkeit enthalten.
21. Versiegeln Sie die Platte mit Verschlussfolie.
22. Zentrifugieren Sie 20 Sekunden lang bei 1.000 × g.
23. Führen Sie die Inkubation 10 Minuten lang bei Raumtemperatur und geschützt vor Licht durch.
24. Entladen Sie alle Träger.
25. Reinigen Sie das ML STAR-Deck und wählen Sie anschließend **OK**.



VORSICHT

Entsorgen Sie die Quantifizierungsreagenzien erst, wenn die Datenerfassung abgeschlossen ist. Wenn eine erneute Quantifizierung erforderlich ist, benötigen Sie die Reagenzien.

26. Entfernen Sie nach der Inkubation die Verschlussfolie und laden Sie die 384-Well-Platte auf den Mikroplatten-Reader. Achten Sie darauf, dass Sie die violette Adapterplatte (Artikel-Nr.: 0310-4336) von Molecular Devices oder eine gleichwertige Platte verwenden (falls für das verwendete Gerät zutreffend).
- Stellen Sie sicher, dass sich A1 während des Ladevorgangs in der oberen linken Ecke befindet.

27. Wählen Sie die VeriSeq NIPT-Vorlage per Doppelklick in SoftMax Pro.
28. Wählen Sie auf der Registerkarte „Home“ (Start) die Option **New Experiment** (Neues Experiment).
29. Wählen Sie **Read** (Lesen).
30. Exportieren Sie die Daten wie folgt im XML-Format.
 - a. Klicken Sie mit der rechten Maustaste auf **Plate** (Platte) und wählen Sie anschließend **Rename** (Umbenennen).
 - b. Scannen Sie den Barcode auf der Quantifizierungsplatte und wählen Sie anschließend **OK**.
 - c. Wählen Sie in der oberen linken Ecke des Bildschirms das Plattensymbol und wählen Sie im Menü **Export** (Exportieren).
 - d. Aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Expt name** (Namen exportieren), wählen Sie als Format für die Platte die Option für Rohdaten sowie das XML-Format für die Datenausgabe aus und wählen Sie anschließend **OK**.
 - e. Legen Sie den Pfad und den Namen für die Ausgabedatei fest und wählen Sie anschließend **Save** (Speichern).

Der Hamilton-Computer muss über Zugriff auf den Speicherort der Datei verfügen. Der Pfad und der Dateiname dürfen keine Leerzeichen enthalten.

Analyse

1. Geben Sie im Bildschirm „Scanner Information“ (Scanner-Informationen) auf dem ML STAR-Gerät die Fluorometer-ID ein.
2. Geben Sie Anmerkungen zu dem Fluorometer-Lauf ein und wählen Sie anschließend **OK**.
3. Navigieren Sie zu der *.xml-Quantifizierungsdatei, die die fluorometrischen Daten enthält, und wählen Sie anschließend **OK**.
4. Überprüfen Sie die Analyseergebnisse für die Standardkurve und die Probenkonzentration und wählen Sie anschließend **OK**.
5. Wenn Sie die Platte erneut scannen müssen, wählen Sie **Rescan** (Erneut scannen).

Die Proben sind lichtempfindlich und müssen zeitnah verarbeitet werden. Falls nötig, führen Sie das erneute Scannen sofort durch.
6. Geben Sie Anmerkungen zu den betroffenen Wells ein und wählen Sie anschließend **OK**.
7. Beurteilen Sie die Ergebnisse und fahren Sie wie folgt fort.
 - Wenn die Ergebnisse den Spezifikationen entsprechen, fahren Sie mit [Zusammenfassen der Bibliotheken in einem Pool auf Seite 40](#) (Bibliotheken poolen) fort. Spezifikationen finden Sie in der Tabelle mit den Metriken und Grenzwerten der Qualitätssicherung für die Quantifizierung im *Softwarehandbuch zu VeriSeq NIPT Solution v2 (Dokument-Nr. 1000000067940)*.
 - Wenn die Ergebnisse nicht den Spezifikationen entsprechen, bricht das System die Methode ab. Wiederholen Sie das Quantifizierungsverfahren, beginnend mit [Vorbereitung auf Seite 36](#).
8. Führen Sie einen der folgenden Schritte durch:
 - Wählen Sie **Yes** (Ja), um mit [Zusammenfassen der Bibliotheken in einem Pool auf Seite 40](#) fortzufahren.

- Wählen Sie zum Anhalten **Exit** (Beenden).

SICHERER HALTEPUNKT

Wenn Sie den Vorgang stoppen, versiegeln Sie die Platte „Bibliotheken“, bevor Sie sie lagern. Die Platte „Bibliotheken“ ist für insgesamt 7 Tage stabil, wenn sie bei -25 °C bis -15 °C gelagert wird.

Zusammenfassen der Bibliotheken in einem Pool

Vorbereitung

1. Bereiten Sie die folgenden Reagenzien vor:

Reagenz	Lagerung	Anweisungen
Hybridization Buffer	-25 °C bis -15 °C	Lassen Sie das Reagenz bei Raumtemperatur auftauen. Mischen Sie mit dem Vortexmischer. Lagern Sie das Reagenz nach Gebrauch.

2. Wenn die Platte „Bibliotheken“ gefroren gelagert wurde, bereiten Sie sie wie folgt vor.
 - a. Stellen Sie sicher, dass die Platte nicht länger als 7 Tage gelagert wurde, und lassen Sie sie bei Raumtemperatur auftauen.
 - b. Mischen Sie 1 Minute lang mit dem Vortexmischer bei 1.500 U/min.
 - c. Zentrifugieren Sie 20 Sekunden lang bei 1.000 × g.
 - d. Pipettieren Sie zum Mischen.
3. Beschriften Sie ein leeres Pool-Röhrchen mit „Pool A“. Bei 96 Proben beschriften Sie ein zweites leeres Pool-Röhrchen mit „Pool B“.
4. Stellen Sie das folgende Denaturierungsprogramm auf einem Thermocycler mit beheizbarem Deckel ein.
 - a. Wählen Sie die Option zum Vorheizen des Deckels und stellen Sie 102 °C ein.
 - b. Legen Sie ein Reaktionsvolumen von 50 µl fest.
 - c. Legen Sie die Anstiegsrate auf den Höchstwert (≥ 2 °C pro Sekunde) fest.
 - d. Inkubieren Sie 10 Minuten lang bei 96 °C und anschließend 5 Sekunden lang bei 4 °C.
 - e. Halten Sie die Temperatur konstant bei 4 °C.

Verfahren

1. Platzieren Sie die Platte „Bibliotheken“ auf dem vorprogrammierten Thermocycler und starten Sie das Denaturierungsprogramm.
Denaturieren Sie die Platte „Bibliotheken“ erst, nachdem die Quantifizierung die Qualitätsprüfung bestanden hat, da abhängig vom Ergebnis eine erneute Quantifizierung erforderlich werden kann.
2. Zentrifugieren Sie die Platte „Bibliotheken“ 20 Sekunden lang bei 1.000 × g.
3. Wählen Sie **OK**, um das Zusammenfassen der Bibliotheken in einem Pool zu starten.
4. Falls VeriSeq NIPT Method (VeriSeq NIPT-Methode) noch nicht geöffnet ist:

- a. Öffnen Sie den AppLauncher und wählen Sie **VeriSeq NIPT Method** (VeriSeq NIPT-Methode).
 - b. Geben Sie die Batch-ID sowie den Benutzernamen ein und wählen Sie dann **OK**.
5. Wählen Sie die Pool-Konzentration und anschließend **OK**.
Die Ziel-Clusterdichte beträgt 220–260 K/mm².

HINWEIS Die Pooling-Konzentrationen und/oder Pooling-Volumina müssen bei Batches mit 24 Proben u. U. erhöht werden, um ähnliche Clusterdichten wie bei Batches mit 48/96 Proben zu erzielen.

6. Führen Sie einen der folgenden Schritte durch, wenn Sie vom Workflow Manager dazu aufgefordert werden:
- Um ein Probenblatt zu laden, wählen Sie das dem Batch zugeordnete Probenblatt aus und wählen Sie anschließend **Load** (Laden).
 - Um die Systemstandardwerte für die restlichen Probentypen, den Geschlechtsbericht oder die Screeningart zu verwenden, wählen Sie für jede Einstellung **Use Default** (Standardwerte verwenden). Informationen zum Erstellen eines Probenblatts finden Sie im *Softwarehandbuch zu VeriSeq NIPT Solution v2* (Dokument-Nr. 1000000067940).
7. Wählen Sie **Start** (Starten), um den Timer für die Denaturierungsplatte zu starten.
8. Laden Sie die Spitzen wie folgt auf die Spitzenträger.

Probenbatchgröße	Träger- typ	Schiene	Element	Position
24, 48, 96	Spitze	7–12	50-µl-Filterspitzen	1

9. Laden Sie die Platte „Denaturierte Bibliothek“ (mit dem Barcode nach rechts) wie folgt auf den Multiflex-Träger und wählen Sie anschließend **OK**.

Probenbatchgröße	Träger- typ	Schiene	Element	Position
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Denaturiere Bibliotheksplatte (barcodiert)	1

10. Laden Sie die Pooling-Röhrchen wie folgt auf den Röhrchenträger und wählen Sie anschließend **OK**.

Probenbatchgröße	Träger- typ	Schiene	Element	Position
24, 48	Röhrchen	46	Neues 2-ml-Röhrchen, Pool A	1
96	Röhrchen	46	Neues 2-ml-Röhrchen, Pool A	1
			Neues 2-ml-Röhrchen, Pool B	2

11. Laden Sie die Reagenzreservoirs wie folgt auf den Reagenzenträger und wählen Sie anschließend **OK**.

Probenbatchgröße	Träger- typ	Schiene	Element	Position
24, 48, 96	Reagenz	47	3 ml Hybridization Buffer	1

12. Laden Sie die Spitzen wie folgt auf die Spitzenträger.

Probenbatchgröße	Träger- typ	Schiene	Element	Position
24, 48, 96	Spitze	49–54	1.000-µl-Filterspitzen	1
			300-µl-Filterspitzen	2
			50-µl-Filterspitzen	3

13. Geben Sie die Position der ersten und letzten Spitze für jedes Spitzenträger-Rack ein und wählen Sie anschließend **OK**.
14. Stellen Sie sicher, dass die Träger, Laborausstattung und Reagenzien wie angegeben geladen sind.
15. Wählen Sie auf dem Bildschirm „Pooling Deck Verification“ (Pooling-Deck-Prüfung) **OK**.
16. Überwachen Sie das ML STAR-Gerät während der automatisierten Schritte.
17. Geben Sie Anmerkungen zu den betroffenen Wells ein und wählen Sie anschließend **OK**.
18. Wenn Sie durch den Workflow Manager entsprechend informiert werden, stellen Sie sicher, dass das Lade-Deck des ML STAR-Geräts frei von Hindernissen ist, damit das ML STAR-Gerät die Träger entladen kann.
19. Wählen Sie **Unload** (Entladen), um das Deck zu entladen.
20. Entladen Sie den Röhrenträger.
21. Verschließen Sie jedes Pool-Röhrchen. Mischen Sie die Röhrchen mit dem Vortexmischer und zentrifugieren Sie sie danach kurz.
22. Wählen Sie **OK**.
23. Sequenzieren Sie Bibliotheken so bald wie möglich nach dem Pooling. Sie können die Platte „Bibliotheken“ versiegeln und bis zu sieben Tage lang bei -25 °C bis -15 °C lagern, um ein erneutes Pooling durchzuführen.

SICHERER HALTEPUNKT

Wenn Sie den Vorgang stoppen, verschließen Sie die Pooling-Röhrchen und lagern Sie sie bis zu 7 Tage lang bei -25 °C bis -15 °C.

Vorbereiten von Bibliotheken-Pools für die Sequenzierung

Vorbereitung

1. Bereiten Sie die folgenden Reagenzien vor:

Reagenz	Lagerung	Anweisungen
Pool-Röhrchen	-25 °C bis -15 °C	Falls die Platte zuvor gelagert wurde, lassen Sie sie bei Raumtemperatur auftauen. Mischen Sie kurz mit dem Vortexmischer. Zentrifugieren Sie kurz.

2. Bereiten Sie das Next-Generation Sequencing-System vor, indem Sie die folgenden Felder im Local Run Manager VeriSeq NIPT Module ausfüllen:
 - a. Run Name (Laufname)
 - b. **[Optional]** Run Description (Laufbeschreibung)
 - c. Pool Barcode (Pool-Barcode)



VORSICHT

Der in das Local Run Manager-Modul eingegebene Pool-Barcode muss dem im Workflow Manager eingegebenen Pool-Barcode entsprechen. Fehlerhafte Laufkonfigurationen werden von der Analysesoftware abgelehnt und machen eine Resequenzierung erforderlich.

Weitere Informationen zur Verwendung des Local Run Manager VeriSeq NIPT Module finden Sie im *Softwarehandbuch zu VeriSeq NIPT Solution v2 (Dokument-Nr. 1000000067940)*.

Verfahren

1. Geben Sie die folgenden Volumen in die Reagenzienkartusche und mischen Sie mithilfe einer Pipette.
 - Hybridization Buffer (900 µl)
 - Pool A (450 µl)
2. Fahren Sie mit der Sequenzierung fort, wie im Referenzhandbuch Ihres Next-Generation Sequencing-Geräts erläutert. Angaben zum NextSeq 550Dx finden Sie im *Referenzhandbuch zum NextSeq 550Dx Instrument (Dokument-Nr. 1000000009513)* (oder in der zugehörigen, auf der Support-Seite von Illumina unter www.support.illumina.com aufgeführten Packungsbeilage).
3. Bestätigen Sie die korrekte Konfiguration des Laufs, wenn Sie dazu aufgefordert werden.
4. Führen Sie dieses Verfahren ggf. auch für Pool B durch.
 - Um den gewünschten Bereich der Clusterdichte zu gewährleisten, kann für die Bibliotheksplatte mithilfe des Hamilton und einer anderen Pooling-Konzentration ein erneutes Pooling durchgeführt werden. Durch das erneute Pooling wird der ursprüngliche Pool ungültig.
 - Sie können auch das Pooling-Verhältnis für HT1 (450 µl + 900 µl) ändern, um den gewünschten Clusterdichtenbereich zu gewährleisten.

Next-Generation Sequencing

VeriSeq NIPT Solution v2 kann zusammen mit einem NGS-System (Next-Generation Sequencing, Sequenzierung der nächsten Generation) mit folgenden Spezifikationen verwendet werden:

- Für 2 x 36 Paired-End-Reads geeignet
- Mit Index-Adaptoren im VeriSeq NIPT Sample Prep Kit kompatibel
- Zweikanal-Chemie
- Automatische Erstellung von BCL(*.bcl)-Dateien (Rohdaten des Sequenzierungsgeräts)
- 400 Millionen Paired-End-Reads pro Lauf
- Kompatibel mit VeriSeq NIPT Assay Software v2

Das NextSeq 550Dx ist mit VeriSeq NIPT Solution v2 kompatibel.

Analyse der Sequenzierungsdaten

Nach dem Abschluss der Sequenzierung werden die Sequenzierungsdaten automatisch zur Analyse und Berichterstellung an die VeriSeq NIPT Assay Software v2 gesendet. Der Bericht enthält Klassifizierungen für jede Probe im Batch sowie eine Bewertung aller Qualitätssicherungskennzahlen des Laufs. Für einen 48-Proben-Batch dauert der Analysevorgang vom Sequenzierungsabschluss bis zur Ausgabe der Endergebnisse etwa 4 Stunden. Detaillierte Informationen zur Datenanalyse und zur Ausgabedatei finden Sie im *Softwarehandbuch zu VeriSeq NIPT Solution v2 (Dokument-Nr. 1000000067940)*.

Interpretation der Ergebnisse

Der Algorithmus von VeriSeq NIPT Solution v2 wendet ein komplexes statistisches Modell an, in dem verschiedene Informationstypen aus der Sammlung von Bibliotheksfragmenten mit Paired-End-Sequenzierung kombiniert werden. Mithilfe dieses Modells werden Genombereiche ermittelt, die in der Bibliothek jeder Probe unter- oder überrepräsentiert sind. Entscheidend ist, dass dieses Modell berücksichtigt, ob das Ausmaß der Unter- oder Überrepräsentierung quantitativ konsistent mit einem aneuploiden Ereignis im fetalen Genom in der Größenordnung fetaler Fraktion ist, die für die Bibliothek geschätzt wurde.

Bei allen Chromosomen werden die Paired-End-Sequenzierungsdaten gegen das Referenzgenom (HG19) aligniert. Eindeutige, nicht doppelt vorhandene alignierte Reads werden in 100-kb-Bereichen zusammengefasst. Die entsprechenden Bereichsanzahlen werden nach GC-Verzerrung und gemäß der zuvor festgelegten regionspezifischen genomischen Coverage bereinigt. Mit diesen normalisierten Bereichsanzahlen werden für jedes Autosom durch Vergleich der Coverage-Regionen, die Aneuploidien aufweisen können, mit den restlichen Autosomen Statistikwerte abgeleitet. Unter Berücksichtigung dieser Coverage-basierten Werte und der geschätzten fetalen Fraktion wird für jede Probe ein Log-Likelihood-Quotient (LLR, Log Likelihood Ratio) berechnet. Der LLR ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine Probe mit der beobachteten Coverage und fetalen Fraktion betroffen ist, gegenüber der Wahrscheinlichkeit, dass eine Probe mit derselben beobachteten Coverage nicht betroffen ist. Bei der Berechnung dieser Relation wird auch die geschätzte Unsicherheit der fetalen Fraktion berücksichtigt. Für nachfolgende Berechnungen wird der natürliche Logarithmus des Quotienten verwendet. Die Assay Software bewertet den LLR für jedes Zielchromosom und jede Probe, um Aneuploidien zu ermitteln.

Während der Batcherstellung müssen Sie den Probenotyp (Einling oder Zwilling), den Screeningtyp (einfach oder genomweit) und die Einstellung für den gewünschten Geschlechtschromosomenbefund (Ja, Nein oder SCA) für alle Proben festlegen. Gemeinsam bestimmen diese Optionen, welche Informationen für die einzelnen Proben im Befund aufgeführt werden.

Über die Art des Screenings wird für alle Proben festgelegt, welche autosomalen Anomalien protokolliert werden. Während eines einfachen Screenings werden nur Trisomieereignisse protokolliert, die die Chromosomen 13, 18 und 21 vollständig betreffen. Während eines genomweiten Screenings werden vollständige oder partielle Deletionen oder Duplikationen für alle autosomalen Chromosomen protokolliert. Die Länge der kleinsten protokollierbaren partiellen Chromosomendeletion oder -duplikation beträgt 7 Mb.

Bei Einlingsproben können Sie die Protokollierung des Geschlechtschromosoms deaktivieren. Sie können außerdem die Protokollierung des Geschlechts der euploiden Proben im Bericht für Aneuploidien der Geschlechtschromosomen aktivieren bzw. deaktivieren.

Bei aktivierter Protokollierung des Geschlechtschromosoms für Zwillingsproben wird nur das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein eines Y-Chromosoms in der Bibliothek protokolliert. Aneuploidien der Geschlechtschromosomen können in der Befunderstellung für Zwillingsproben nicht berücksichtigt werden.

HINWEIS Wenn alle Proben in einem Batch das gleiche Geschlecht aufweisen, erhält der Benutzer eine Fehlermeldung (E-Mail/Webbenutzeroberfläche) über die Vermischung/Verunreinigung der Proben. Der Batch wird ungültig gemacht und es wird kein Befund erstellt. (Verfügbar für die Serversoftware VeriSeq NIPT Solution v2 ab v2.2.)

Das Ergebnis „ANOMALY DETECTED“ (ANOMALIE ERKANNT) deutet darauf hin, dass während des Probenscreenings mindestens eine Anomalie festgestellt wurde, die der Auswahl für Screeningart und Protokollierung des Geschlechtschromosoms entspricht. Bei festgestellter Anomalie enthält der Befund eine Beschreibung der Anomalie in zytogenetischer Schreibweise.

Die VeriSeq NIPT Assay Software v2 verwendet bei der Sequenzierung generierte Statistikwerte, um für jede Probe die geschätzte fetale Fraktion (FFE, Fetal Fraction Estimation) anzugeben. Die FFE ist der geschätzte Bestandteil fetaler cfDNA, der vom Assay zurückgewonnen wurde. Sie wird für jede Probe als gerundeter Prozentsatz ausgewiesen. Die durchschnittliche Standardabweichung dieser Schätzung in allen Proben beträgt 1,3 %. Die FFE wird nicht verwendet, um Proben bei der Befunderstellung auszuschließen.

Zur Durchführung von Calls für die Chromosomenendarstellung nutzt die VeriSeq NIPT Assay Software v2 den individualisierten Zuverlässigkeitstest zur fetalen Aneuploidie (iFACT, individualized Fetal Aneuploidy Confidence Test). Dabei handelt es sich um einen dynamischen Schwellenwert, der anzeigt, ob das System angesichts der geschätzten fetalen Fraktion für jede Probe eine ausreichende Sequenzierungs-Coverage generiert hat. Negative Calls werden nur im Befund aufgeführt, wenn die Probe den iFACT-Schwellenwert einhält. Wenn eine Probe diesen Schwellenwert nicht erreicht, zeigt die Bewertung der Qualitätssicherung „FAILED iFACT“ (iFACT fehlgeschlagen) an und das System generiert kein Ergebnis.

Neben dem iFACT-Wert wertet die VeriSeq NIPT Assay Software v2 während der Analyse weitere Qualitätssicherungskennzahlen aus. Zu diesen Kennzahlen gehören die Bewertung der Coverage-Einheitlichkeit auf Referenzgenombereichen und die Verteilung der cfDNA-Fragmentlängen. Die Bewertung der Qualitätssicherung (QS) zeigt entweder ein QS-Flag oder eine QS-Fehlermeldung für alle Kennzahlen an, die

außerhalb des zulässigen Bereichs liegen. Tritt ein durch die Qualitätssicherung festgestellter Fehler auf, generiert das System kein Ergebnis für die Probe. Wenn eine Probe die Qualitätssicherung nicht besteht, kann die Probe erneut verarbeitet werden, sofern das Plasmavolumen im Blutentnahmeröhrchen ausreicht.

VeriSeq NIPT Solution v2 erstellt Daten für den Abschlussbefund. Es wird kein Abschlussbefund für den Patienten erstellt. Zusammenstellung und Inhalt des Befunds für den behandelnden Arzt liegen in der Verantwortung des Kunden. Illumina übernimmt keine Verantwortung für die Genauigkeit der Formulierungen im endgültigen Befund für den Kunden.



VORSICHT

Prüfen Sie die geschätzte fetale Fraktion für alle Proben. Ist die geschätzte fetale Fraktion für alle Proben eines Laufs ähnlich, haben sich die Proben u. U. vermischt und die Ergebnisse sind beeinträchtigt. Wenden Sie sich bezüglich Unterstützung bei der Fehlerbehebung an den technischen Support von Illumina.

Performancemerkmale

Die folgenden, in den Abschnitten „Klinische Performance“ und „Analyseperformance“ erläuterten Daten wurden mit den Protokollen und Materialien generiert, die in der Gebrauchsanweisung beschrieben sind. Das Ausgangsmaterial war Plasma. Alle Sequenzierungsdaten für diesen Bereich wurden mit einem NextSeq 500/550-Sequenziersystem oder einem NextSeq 550Dx-Sequenziersystem mit folgenden Konfigurationen erstellt:

	NextSeq 500/550	NextSeq 550Dx
Geräteeigene Software	NextSeq Control Software 4.0	NextSeq Operating Software 1.3
Version des Reagenzien-Kits	NextSeq 500/550 High Output v2.5 (75 cycle) Reagent Kit	NextSeq 550Dx High Output v2.5 (75 cycle) Reagent Kit
Sequenzierungsmethode	2 x 36 Paired-End-Sequenzierungslauf im Hochleistungs-Modus	2 x 36 Paired-End-Sequenzierungslauf im Hochleistungs-Modus

Klinische Studie

Die klinische Genauigkeit von VeriSeq NIPT Solution v2 wurde anhand einer Auswertung der Plasmaproben von Frauen mit Einlings- und Zwillingsschwangerschaften nachgewiesen. Das Material stammte aus anonymisierten Plasmaproben, die aus peripherem Vollblut gewonnen wurden. Im Rahmen der Studie wurden 45.000 Proben ausgewertet. Im Vorfeld der Studie wurden die Proben auf fetale chromosomale Aneuploidien sowie partielle Deletionen und Duplikationen von mindestens 7 Mb Länge getestet. Für die Tests im Rahmen der Studie wurden alle Proben aus Schwangerschaften mit betroffenen Feten sowie eine Teilmenge aufeinanderfolgender Proben aus Schwangerschaften mit nicht betroffenen Feten zugelassen, sofern klinische Ergebnisse verfügbar waren

und die Kriterien für Proben erfüllt wurden. Der Testanalysesatz umfasste insgesamt 2.335 Proben. Innerhalb des Satzes stammten 2.328 Proben aus Einlingsschwangerschaften und sieben Proben aus Zwillingschwangerschaften.

Von diesen Proben bestanden 28 (1,2 %, 28 von 2.335) bei der Analyse aller Sequenzierungsdaten die Assay-Qualitätssicherung nicht im ersten Durchgang:

- 27 iFACT-Fehler (eine Probe mit XO, 26 nicht betroffene Proben)
- Ein Fehler wegen außerhalb des erwarteten Bereichs liegender Daten

Demografische Gruppen und Schwangerschaftsmerkmale

Alter der Mutter, Gestationsalter und Trimester der Schwangerschaft werden in [Tabelle 7](#) für die Proben, einschließlich der bekannten Mosaikproben, im genomweiten Screening zusammengefasst. Ein Großteil (98 %) der getesteten Proben stammt aus dem ersten Schwangerschaftstrimester.

Die demografischen Gruppen wurden zwischen den Kohorten des einfachen und genomweiten Screenings verglichen und wiesen keine statistischen Unterschiede auf. Die demografischen Gruppen und Schwangerschaftsmerkmale ähnelten sich unabhängig davon, ob bekannte Mosaikproben ein- oder ausgeschlossen wurden.

Tabelle 7 Demografische Gruppen und Schwangerschaftsmerkmale

Zusammenfassende Statistik	Genomweit (mit bekannten Mosaiken)
Anzahl der Proben	2.307*
Alter der Mutter in Jahren	
Mittel	35,08
Standardabweichung	4,04
Median	34,95
25. Perzentil, 75. Perzentil	32,31, 37,79
Minimum, Maximum	20,22, 53,02
Gestationsalter zum Zeitpunkt der Blutentnahme in Wochen	
Mittel	10,93
Standardabweichung	1,20
Median	10,57
25. Perzentil, 75. Perzentil	10,29, 11,14
Minimum, Maximum	10,00, 27,86
Schwangerschaftstrimester – n (%)	
< Erstes (< 14 Wochen)	2.252 (98 %)
Zweites	54 (2 %)
Drittes (≥ 27 Wochen)	1 (0 %)

* Die endgültigen Proben enthielten sieben Zwillinge.

Klinische Performance

Die Ergebnisse von VeriSeq NIPT Solution v2 wurden mit den Ergebnissen des klinischen Referenzstandards verglichen. Beim Nachweis fetaler chromosomaler Aneuploidie sowie partieller Deletionen und Duplikationen von mindestens 7 Mb Länge stimmten die Ergebnisse aller untersuchten Proben mit dem klinischen Referenzstandard überein. Die Übereinstimmung der in dieser Studie untersuchten Proben mit dem klinischen Referenzstandard wurde mittels Chromosomenanalyse oder der Untersuchung von Neugeborenen im Rahmen eines NGS-basierten NIPT-Negativscreenings überprüft. Die klinischen Referenzdaten wurden von entsprechend geschulten Mitarbeitern unter Einhaltung der Bestimmungen des Geldgebers zur medizinischen Dokumentation klassifiziert und codiert.

Verfahren zur Chromosomenanalyse waren Karyotypisierung, FISH-Test (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) und CMA (Chromosomen-Microarray für die vergleichende genomische Hybridisierung). Für die Chromosomenanalyse wurden peripheres Blut bzw. Speichel von Neugeborenen oder Säuglingen, Proben aus Empfängnisprodukten, Amniozyten, Chorionzotten, Plazentagewebe oder nach der Geburt entnommenes Nabelschnurblut verwendet.

Als Mosaizismus wird das Vorhandensein von zwei oder mehr Zelllinien mit unterschiedlicher chromosomaler Zusammensetzung im Körper einer Person bezeichnet. Die verschiedenen Zelllinien stammen von derselben befruchteten Eizelle. Die Art und Ausprägung des Mosaizismus hängt davon ab, zu welchem Zeitpunkt in der Embryonal- und Fetalentwicklung Mosaikzellen entstehen. Unterschiedliche Arten von Mosaiken können in der pränatalen Diagnostik abhängig von der Verteilung normaler bzw. anormaler Zelllinien über den Zytotrophoblasten, das Mesenchym oder den Fetus nachgewiesen werden.¹⁰ Obwohl Mosaikzellen bei allen chromosomalen Anomalien auftreten, ist die Prävalenz von Mosaiken bei seltenen Trisomien höher als bei den Trisomien der Chromosomen 21, 18 und 13 (T21, T18 und T13).¹¹ Da diese Art von Screening in diesem Assay der Feststellung von seltenen autosomalen Aneuploidien (RAAs, Rare Autosomal Aneuploidies) dient, wurden bei der Performancebeurteilung Mosaikfälle in die genomweite Analyse einbezogen.

Performance des einfachen Screenings

Das einfache Screening deckt die Anomalien T21, T18 und T13 ab. Die Analyse umfasste insgesamt 2.243 Einlings- und Zwillingsproben. Für alle sieben Zwillingsschwangerschaften wurde T21 korrekt festgestellt. Sie werden in der folgenden Tabelle nicht aufgeführt.

Tabelle 8 Sensitivität und Spezifität von VeriSeq NIPT Solution v2 beim Erkennen von Trisomie 21, 18 und 13 im Rahmen eines einfachen Screenings für Einlingsschwangerschaften (ohne bekannte Mosaik)

	T21	T18	T13
Sensitivität	> 99,9 % (130/130)	> 99,9 % (41/41)	> 99,9 % (26/26)
Zweiseitiges 95%-KI	97,1 %, 100 %	91,4 %, 100 %	87,1 %, 100 %
Spezifität	99,90 % (1982/1984)	99,90 % (1995/1997)	99,90 % (2000/2002)
Zweiseitiges 95%-KI	99,63 %, 99,97 %	99,64 %, 99,97 %	99,64 %, 99,97 %

Die in [Tabelle 8](#) dargestellte Assay-Performance beim einfachen Screening wird unter Ausschluss einer Untermenge von 64 Proben mit RAAs, autosomalen partiellen Deletionen bzw. Duplikationen oder bekannten Mosaiken berechnet. Diese 64 Proben enthielten acht 21- und drei 18-Mosaik-Trisomien. Fünf dieser 11 Proben wurden als von der mit der VeriSeq NIPT Assay Software v2 erfassten Anomalie betroffen eingestuft.

Performance des genomweiten Screenings

Beim genomweiten Screening umfassen die Anomalien Trisomien, Monosomien und partielle Deletionen oder Duplikationen ab 7 Mb. Die Proben für das genomweite Screening umfassten 36 Proben mit bekannten Mosaiken. Insgesamt wurden 2.307 Einlings- und Zwillingsproben getestet. Für alle sieben

Zwillingsschwangerschaften wurde eine Anomalie von Chromosom 21 korrekt festgestellt. Sie werden in den folgenden Tabellen nicht aufgeführt.

Performance des genomweiten Screenings für beliebige Anomalien

Tabelle 9 Sensitivität und Spezifität von VeriSeq NIPT Solution v2 bei der Erkennung beliebiger Anomalien bei genomweiten Screenings (mit bekannten Mosaiken)

	Sensitivität	Spezifität
Schätzwert % (n/N)	95,5 % (318/333)	99,34 % (1.954/1.967)
Zweiseitiges 95-%-KI	92,7 %, 97,3 %	98,87 %, 99,61 %

Performance des genomweiten Screenings bei seltener autosomaler Aneuploidie

Tabelle 10 Sensitivität und Spezifität von VeriSeq NIPT Solution v2 bei seltener autosomaler Aneuploidie (RAA, Rare Autosomal Aneuploidy) bei genomweiten Screenings (mit bekannten Mosaiken)

	Sensitivität	Spezifität
Schätzwert % (n/N)	96,4 % (27/28)	99,80 % (2.001/2.005)
Zweiseitiges 95-%-KI	82,3 %, 99,4 %	99,49 %, 99,92 %

Performance des genomweiten Screenings für partielle Deletionen und Duplikationen

Tabelle 11 Sensitivität und Spezifität von VeriSeq NIPT Solution v2 bei der Erkennung partieller Deletionen und Duplikationen ab 7 Mb bei genomweiten Screenings (mit bekannten Mosaiken)

	Sensitivität	Spezifität
Schätzwert % (n/N)	74,1 % (20/27)	99,80 % (2.000/2.004)
Zweiseitiges 95-%-KI	55,3 %, 86,8 %	99,49 %, 99,92 %

Performanceunterschiede zwischen einfachem und genomweitem Screening

Das Scoring-Verfahren für häufige Trisomien und Geschlechtschromosomen-Aneuploidien ist beim einfachen und beim genomweiten Screening gleich. Das einfache Screening wendet den Algorithmus nur auf T21, T18 und T13 an. Das genomweite Screening dehnt dieses Verfahren jedoch auf die Bestimmung aller Trisomien und RAAs sowie partieller Duplikationen und Deletionen aus.

Es bestehen zwei wichtige Unterschiede bei den Performanceberichten für das einfache und das genomweite Screening. Zum einen wurden beim genomweiten Screening Proben mit bekannten Mosaiken für häufige Trisomien und RAAs sowie für partielle Deletionen und Duplikationen in die Performance-Metriken aufgenommen. Zum anderen kann im Bericht zum genomweiten Screening auf Wunsch die Bestimmung von partiellen Duplikationen bzw. Deletionen anstelle der Bestimmung einer vollständigen Trisomie aufgeführt werden. Das Vorhandensein einer vollständigen Trisomie zusätzlich zu einer partiellen Duplikation bzw. Deletion lässt sich am LLR-Score im ergänzenden Bericht ablesen.

Aufnahme von Mosaiken in das genomweite Screening

Mosaik gelten als Einschränkungen für diesen Assay. Vorhandene Mosaik beeinträchtigen das fetale Signal einer Anomalie, wodurch dieses schwieriger zu bestimmen ist, ohne die Gesamtspezifität des Assays zu beeinträchtigen. Da Mosaik jedoch von höherer Relevanz für die erweiterten Inhalte sind, wurden Proben mit Mosaik in das genomweite Screening aufgenommen.

Von den 64 Proben, die im genomweiten Screening, jedoch nicht im einfachen Screening enthalten sind, weisen nach dem klinischen Referenzstandard 36 Proben Mosaik auf. Bei diesen 36 Proben entsprachen 23 Calls dem klinischen Referenzstandard.

Nachweis bei partiellen Deletionen oder Duplikationen im Vergleich zum Nachweis bei einer Aneuploidie des gesamten Chromosoms

VeriSeq NIPT Solution v2 bietet Menüoptionen für einfaches und genomweites Screening. Im Rahmen des einfachen Screenings wird nur dann „ANOMALY DETECTED“ (ANOMALIE ERKANNT) als Ergebnis angezeigt, wenn eine vollständige Aneuploidie der Chromosomen 21, 18 oder 13 nachgewiesen wird und alle Metriken der Qualitätssicherung erfüllt sind. Während des genomweiten Screenings erkennt das System Aneuploidie bei allen Autosomen sowie Ereignisse partieller Deletion und Duplikation von mindestens 7 Mb.

Im Rahmen des genomweiten Screenings werden in Fällen, in denen sowohl ein ganzes Chromosom als auch ein CNV-Ereignis innerhalb desselben Chromosoms den LLR-Schwellenwert überschreiten, Ereignisse partieller Deletion oder Duplikation gegenüber Calls des gesamten Chromosoms bevorzugt protokolliert, wenn der Umfang der partiellen Deletion oder Duplikation höchstens 75 % des Chromosoms, für das das Ereignis nachgewiesen wurde, beträgt. Wenn der nachgewiesene Bereich partieller Deletion und Duplikation größer ist als 75 % der Chromosomengröße, wird das Ereignis als vollständige Trisomie oder Monosomie des gesamten Chromosoms protokolliert, wenn gleichzeitig auch der LLR-Schwellenwert für das gesamte Chromosom überschritten wird. Daher können ausreichend große Deletionen und Duplikationen, die max. 75 % des Chromosoms betreffen, auf eine Aneuploidie des gesamten Chromosoms hindeuten.

Bei allen Proben wird der LLR-Score für die gesamte Chromosom-Klassifizierung im Zusatzbericht aufgeführt. Vor einer Interpretation des Ergebnisses muss der LLR-Score hinsichtlich des in [Abbildung 2](#) angegebenen Schwellenwerts überprüft werden. Beispielsweise finden Sie in [Tabelle 12](#) ein Beispiel für einen CNV-Call, bei dem die LLR-Scores auf Chromosomenebene den Schwellenwert überschreiten und so weitere Hinweise auf eine Aneuploidie des gesamten Chromosoms liefern.

Die klinische Studie umfasste zwei Proben aus Einlingsschwangerschaften mit ausreichend großen Duplikationen (eine Duplikation des Chromosoms 21 und eine des Chromosoms 18), die weniger als 75 % der relativen Größe des Chromosoms ausmachten (siehe [Tabelle 12](#)). Beide Ereignisse wurden im Bericht als partielle Duplikationen und nicht als vollständige Trisomie dieses Chromosoms aufgeführt. Die LLR-Scores für diese Ereignisse lagen über dem Schwellenwert und entsprachen dem Ergebnis einer vollständigen Trisomie. Bei einer partiellen Duplikation oder einem Call für eine vollständige Trisomie kann nachfolgend bei positiven NIPT-Calls der Bestätigungstest über Pränataldiagnostik erfolgen.

Tabelle 12 Beispiele für im genomweiten Screening erkannte große Duplikationsereignisse

	Klinische Erkenntnisse	Systemausgabe, genomweit	Größe der Anomalie (Mb)	% des Chromosoms	LLR-Scores
Probe 1	Trisomie 21, Einling	Partielle Duplikation auf 21	22,50	48,9	19,43
Probe 2	Trisomie 18, Einling	Partielle Duplikation auf 18	47,00	60,2	12,99

Weitere Informationen zu Metriken der Qualitätssicherung zur Protokollierung von Aneuploidieergebnissen finden Sie im *Softwarehandbuch zu VeriSeq NIPT Solution v2 (Dokument-Nr. 1000000067940)*.

Geschlechtschromosomen

Die Ergebnisse von VeriSeq NIPT Solution v2 zu den Geschlechtschromosomen wurden mit den Ergebnissen des klinischen Referenzstandards verglichen. Die folgende Tabelle enthält eine Zusammenfassung dieses Vergleichs. Es wurde die Übereinstimmung in Prozent für jedes Geschlechtschromosom in jedem Ergebnis des klinischen Referenzstandards ermittelt. Die prozentuale Übereinstimmung wurde wie folgt berechnet: die Anzahl der Proben, bei denen der Geschlechtschromosomen-Call von VeriSeq NIPT Solution v2 der Klassifizierung des klinischen Referenzstandards entsprach, geteilt durch die Gesamtzahl der Proben mit derselben Klassifizierung wie der klinische Referenzstandard.

Tabelle 13 Übereinstimmung in Prozent bei der Klassifizierung des Geschlechts des Fetus*

Geschlechtsklassifizierung des Fetus	Phänotyp aus der physischen Untersuchung des Neugeborenen	Zytogenetische Ergebnisse										
		Erkannt	Karyotyp	Weiblich	Männlich	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY	Sonstige**
Keine Anomalie erkannt	XX		997	0	21	0	2	0	0	0	0	0
Keine Anomalie erkannt	XY		0	966	0	15	0	0	0	0	0	1
Anomalie erkannt	XO		0	0	0	0	19	0	0	1	0	0
Anomalie erkannt	XXX		0	0	0	0	0	17	0	0	1	0
Anomalie erkannt	XXY		0	0	0	0	0	0	23	0	1	0

Geschlechts- klassifizierung des Fetus	Phänotyp aus der physischen Untersuchung des Neugeborenen	Zytogenetische Ergebnisse										
		Erkannt	Karyotyp	Weiblich	Männlich	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY	Son- stige**
Anomalie erkannt	XYY	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0
Summe		997	966	21	15	21	17	23	12	2	1	
Übereinstim- mung in Prozent		100	100	100	100	90,5	100	100	91,7	Nicht zutref- fend	Nicht zutref- fend	

* Fünf Zwillingsschwangerschaften wurden korrekt als „Chromosom Y vorhanden“ klassifiziert. Zwei Schwangerschaften wurden korrekt als „Chromosom Y nicht vorhanden“ klassifiziert.

** Weitere zytogenetische Ergebnisse lauteten XXXXX und XXYY.

Positiver und negativer Vorhersagewert von VeriSeq NIPT Solution v2

Der positive Vorhersagewert (PPV, Positive Predictive Value) und der negative Vorhersagewert (NPV, Negative Predictive Value) des Tests liefern Informationen zu dessen Eignung, klinische Entscheidungen basierend auf der Testsensitivität und -spezifität sowie der Vortestwahrscheinlichkeit, dass ein Fetus von einer Trisomie betroffen ist (Prävalenz), zu unterstützen. Da der PPV und der NPV von der Prävalenz abhängen und die Prävalenz für diese Aneuploidien über verschiedene Probandenpopulationen hinweg variieren kann, wurden der PPV und der NPV für einen plausiblen Prävalenzbereich auf Grundlage der Sensitivität und der Spezifität berechnet, die beim grundlegenden Screening (ohne bekannte Mosaik) der klinischen Genauigkeitsstudie beobachtet wurden. Als Grundlage für [Tabelle 17](#) dient das genomweite Screening (mit bekannten Mosaiken).

Tabelle 14 Trisomie-21-Prävalenz, PPV und NPV des einfachen Screenings (ohne bekannte Mosaik)

Prävalenz (%)	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

Tabelle 15 Trisomie-18-Prävalenz, PPV und NPV des einfachen Screenings (ohne bekannte Mosaike)

Prävalenz (%)	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

Tabelle 16 Trisomie-13-Prävalenz, PPV und NPV des einfachen Screenings (ohne bekannte Mosaike)

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

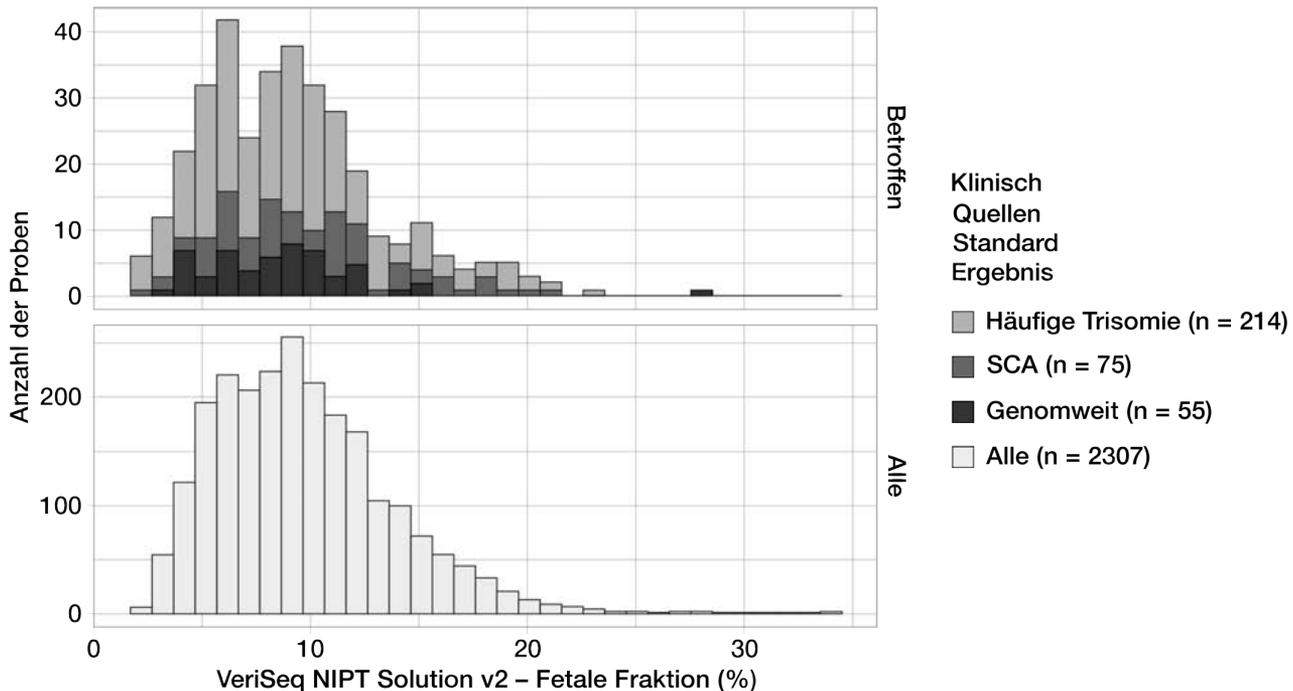
Tabelle 17 Beliebige Anomalieprävalenz, PPV und NPV des genomweiten Screenings (mit bekannten Mosaiken)

Prävalenz (%)	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

Verteilung der fetalen Fraktion

Die Verteilung der Schätzwerte für die fetale Fraktion (FF) von VeriSeq NIPT Solution v2 des genomweiten Screenings mit Mosaiken sind in [Abbildung 1](#) unter „Klinischer Referenzstandard“ aufgeführt.

Abbildung 1 Verteilung der fetalen Fraktion



Fünf Proben wiesen Anomalien in mehreren Kategorien auf.
 „Häufige Trisomie“ umfasst Proben mit Trisomie 21, 18 und/oder 13.
 „Genomweit“ umfasst Proben mit RAA oder partiellen Deletionen und/oder Duplikationen.

Die FF-Schätzwerte lagen in einem Bereich von 2 % bis 34 % mit einem Median von 9 % und einem Interquartilsabstand von 6 % bis 12 %. Der Median des FF-Schätzwerts für häufige vom genomweiten Screening erkannte Trisomien und Ereignisse liegt bei 8 % und für SCAs bei 9 %. Der Bereich der FF-Schätzwerte war für alle Ergebnisse einheitlich. Für die Verteilung der fetalen Fraktion häufiger Trisomien, SCAs und Ereignisse, die im genomweiten Screening erkannt wurden, oder aller Proben der genomweiten Analyse lag keine offensichtliche Verschiebung vor.

Performance bei Zwillingschwangerschaften

Schätzung der Performance für Trisomie 13, 18 und 21 sowie für das Y-Chromosom bei Zwillingschwangerschaften

Aufgrund der niedrigen Prävalenz von Trisomie 21, 18 und 13 bei Zwillingschwangerschaften stand für die klinische Untersuchung nur eine geringe Anzahl an Zwillingsproben zur Verfügung. Für die Schätzung der Performance von VeriSeq NIPT Solution v2 bei Zwillingschwangerschaften wurden auf Grundlage von Beobachtungen aus klinischen Proben *In-silico*-Modelle für die Simulation von Populationen von Zwillingschwangerschaften verwendet. Diese Simulation entsprach der vorgesehenen Verwendung der Population. Die Verteilung der fetalen Fraktion wurde aus ca. 4.500 Zwillingsproben ermittelt und mit der Verteilung von ca. 120.000 Einlingsproben verglichen. Die Verteilung der fetalen Fraktion in Abhängigkeit vom Aneuploidie-Status wurde aus putativen Einlings-Calls ermittelt (1.044 x Trisomie 21, 307 x Trisomie 18 und

192 x Trisomie 13). Die Kombination der beiden Verteilungen ließ Rückschlüsse auf den Nachweis von Aneuploidien bei Zwillingen zu. Es wurden Paare zweieiiger und eineiiger Zwillinge simuliert. Anhand eines gewichteten Durchschnitts für deren Prävalenz in der vorgesehenen Anwendungspopulation (2:1 [zweieiig:eineiig]) wurde die Sensitivität bestimmt. Für die Spezifität wurden Paare von nicht betroffenen Zwillingen simuliert.

Die Fraktion der einzelnen von Trisomie betroffenen simulierten Proben (also die „betroffene Fraktion“) wurde bei jeder Probenkategorie anders berechnet:

- Bei eineiigen Zwillingen wurde die betroffene Fraktion jeder Probe auf 1,0 festgelegt, da in diesem Fall die Trisomie beide Zwillinge betrifft.
- Bei zweieiigen Zwillingen wurde davon ausgegangen, dass nur ein Zwilling betroffen ist (nur in extrem seltenen Fällen sind beide zweieiigen Zwillinge betroffen). Die Werte der betroffenen Fraktion wurden mithilfe der Verteilung von Verhältnissen bei fetalen Fraktionen simuliert, die aus klinischen Proben von geschlechtsdiskordanten Zwillingen bekannt ist. Gewählt wurde ein konservativer Ansatz mit der Annahme, dass der betroffene Zwilling stets die niedrigste fetale Fraktion der beiden Zwillinge aufweist. Es wurde ein Korrekturfaktor für fetale Fraktionen angewendet, die im Durchschnitt bei Trisomie-13- und Trisomie-18-Schwangerschaften seltener auftreten.
- Bei nicht betroffenen Zwillingen wurde die betroffene Fraktion der einzelnen Proben auf null festgelegt.

Bei von Trisomie 18 oder 13 betroffenen Zwillingen war die fetale Fraktion, die der betroffenen Fraktion der Probe entspricht, verringert. Diese Verringerung verlief proportional zur durchschnittlichen Verringerung bei fetalen Fraktionen, die in klinischen Daten für Einlinge mit Trisomie 18 oder 13 im Vergleich zu euploiden Einlingen beobachtet wurde.

Sowohl die gesamte fetale Fraktion als auch die betroffene Fraktion der einzelnen simulierten Proben wurden dann zur Berechnung eines Aneuploidie-Scores mithilfe des VeriSeq NIPT Solution v2-Standardalgorithmus herangezogen. Die Sensitivität wurde berechnet, indem ermittelt wurde, wie oft die Aneuploidie-Scores für die simulierten betroffenen Zwillinge über dem entsprechenden Aneuploidie-Cutoff lagen. Entsprechend wurde die Spezifität berechnet, indem ermittelt wurde, wie oft die Aneuploidie-Scores für die simulierten nicht betroffenen Zwillinge unter dem entsprechenden Aneuploidie-Cutoff lagen ([Tabelle 18](#)). Konfidenzintervalle von 95 % wurden anhand der Zahl der klinischen Proben von Zwillingen geschätzt, die entweder als von der relevanten Trisomie betroffen oder als nicht betroffen klassifiziert wurden.

Für die Schätzung der Sensitivität für Y-Chromosomen in Zwillingenproben wurden Sätze mit XY/XY- und XX/XY-Zwillingen simuliert. Es wurde ein gewichteter Durchschnitt zugrunde gelegt, der ihre Häufigkeit in der Population für die vorgesehene Verwendung darstellt (1 XY/XY: 1 XX/XY). Für die Schätzung der Y-Chromosom-Spezifität bei Zwillingen wurde ein Satz mit XX/XX-Zwillingen simuliert. Die allgemeinen Werte für fetale Fraktionen wurden gemäß der bekannten Verteilung der fetalen Fraktion in klinischen Zwillingenstudien simuliert.

Für XY/XY- und XX/XY-Zwillinge wurden entsprechende Y-Chromosom-Scores auf Grundlage der bekannten Beziehung zwischen den Scores für fetale Fraktionen und Y-Chromosomen in klinischen Einlingsproben, die als männlich klassifiziert waren, geschätzt. Nur für XX/XY-Zwillinge wurden die Werte der betroffenen (d. h. männlichen) fetalen Fraktion mithilfe der bei Zwillingen aus derselben Schwangerschaft beobachteten Verteilung von Verhältnissen bei fetalen Fraktionen simuliert, die aus klinischen Proben von

geschlechtsdiskordanten Zwillingen bekannt ist. Es wurde ein konservativerer Ansatz gewählt, bei dem die betroffene Fraktion so gewählt wurde, dass sie dem kleineren Zwilling entsprach. Für jede simulierte XX/XY-Probe wurde der Score für das Y-Chromosom mit der betroffenen Fraktion multipliziert.

Für XX/XX-Zwillinge wurden Y-Chromosom-Scores von den Scores bezogen, die in klinischen, als weiblich klassifizierten Einlingsproben beobachtet wurden. Anschließend wurde mit dem Standardalgorithmus von VeriSeq NIPT Solution v2 anhand des Y-Chromosom-Scores und der allgemeinen fetalen Fraktion jede simulierte Probe nach Vorhandensein oder Nichtvorhandensein des Y-Chromosoms klassifiziert.

Die Sensitivität wurde berechnet, indem die Trefferquote bei der Feststellung des Vorhandenseins des Y-Chromosoms in den simulierten XY/XY- oder XX/XY-Zwillingen bestimmt wurde. Die Spezifität wurde berechnet, indem die Trefferquote bei der Bestimmung des Nichtvorhandenseins des Y-Chromosoms in den simulierten XX/XX-Zwillingen bestimmt wurde. Konfidenzintervalle von 95 % wurden anhand der Zahl der klinischen Proben von Zwillingen in der ursprünglichen Datenbasis geschätzt, die entweder als „Chromosom Y vorhanden“ oder als „Chromosom Y nicht vorhanden“ klassifiziert wurden.

Tabelle 18 Schätzungen für Trisomie 21, 18 und 13 in simulierter Population von Zwillingsschwangerschaften

	Trisomie 21	Trisomie 18	Trisomie 13	Y vorhanden
Sensitivität	96,4 %	95,7 %	93,6 %	> 99,9 %
Zweiseitiges 95-%-KI	(86,4 %, 98,9 %)	(68,3 %, 99,4 %)	(64,1 %, 98,9 %)	(99,9 %, > 99,9 %)
Spezifität	99,9 %	> 99,9 %	> 99,9 %	> 99,9 %
Zweiseitiges 95-%-KI	(99,8 %, > 99,9 %)	(99,9 %, > 99,9 %)	(99,9 %, > 99,9 %)	(99,7 %, > 99,9 %)

In [Tabelle 18](#) werden Punktschätzungen und geschätzte 95-%-Konfidenzintervalle für die Sensitivität und Spezifität von VeriSeq NIPT Solution v2 zur Erkennung von Trisomie 21, 18 und 13 und dem Vorhandensein des Y-Chromosoms in einer simulierten Population von Zwillingsschwangerschaften in Übereinstimmung mit der Population für die vorgesehene Verwendung aufgeführt. Die Konfidenzintervalle wurden geschätzt anhand der Zahl der klinischen Proben von Zwillingen mit bestandener Qualitätssicherung, die als entweder von der relevanten Trisomie betroffen oder nicht betroffen klassifiziert wurden. Bei der Berechnung der Sensitivität wurde davon ausgegangen, dass zwei Drittel der betroffenen Zwillingsschwangerschaften zweieiig sind und ein Zwilling betroffen ist, während ein Drittel der betroffenen Zwillingsschwangerschaften eineiig ist und beide Zwillinge betroffen sind.

Die in [Tabelle 18](#) aufgeführten Schätzungen beziehen sich nur auf Zwillingsschwangerschaften. Aufgrund noch niedrigerer Prävalenz waren die Daten für Mehrlingsschwangerschaften (Drillinge oder mehr) nicht ausreichend, um geeignete statistische Modelle zu erstellen, anhand derer die Genauigkeit der Erkennung von Aneuploidien geschätzt werden konnte.

Analyseperformance

Präzision

Für die Beurteilung und Quantifizierung der Genauigkeit der Assays wurden mithilfe der Analysepipeline-Software VeriSeq NIPT Solution v2 Daten aus zwei früheren Untersuchungen der VeriSeq NIPT Solution erneut analysiert:

- aus einer Untersuchung zur Reproduzierbarkeit an mehreren Standorten mit drei Läufen, die von drei Bedienern an drei Standorten mit einem einzigen Satz an Reagenzien durchgeführt wurden (neun Läufe insgesamt) sowie
- einer Untersuchung zur Präzision innerhalb eines Labors mit 12 Läufen an einem Standort mit zwei ML STAR-Geräten, zwei Sequenziersystemen und drei Sätzen an Sequenzierungsreagenzien.

Ziel der Präzisionsstudie war die Ermittlung der Präzision des Assays hinsichtlich Trisomie 21 (T21) und Chromosom Y sowie die Bestimmung der Varianz zwischen unterschiedlichen Geräten, Bibliotheksvorbereitungskits und Sequenzierungsreagenzienchargen. Im Rahmen der Studien wurde ausschließlich die Reproduzierbarkeit unter den im Vorherigen beschriebenen Bedingungen untersucht.

Es wurde ein Pool mit einer 5%igen fetalen Fraktion von T21 erstellt, indem die aus dem mütterlichem Plasma von schwangeren Frauen (mit einem Fetus mit T21) isolierte cfDNA mit der cfDNA aus dem Plasma von nicht schwangeren Frauen kombiniert wurde. Weiterhin wurde ein Pool mit 10%iger fetaler Fraktion mit cfDNA von Frauen mit männlichem Fetus (XY) erstellt. Bei jeder Untersuchung enthielt das Probenpanel für jeden Lauf vier Replikate des Probenpools mit einer 5%igen fetalen Fraktion von T21 und 20 Replikate des Pools mit 10%iger fetaler Fraktion mit cfDNA von Frauen mit männlichem Fetus. Die Tests für die beiden Studien wurden mit insgesamt 21 Läufen in 10 Tagen durchgeführt.

Aufgrund der Repräsentativität klinischer Bedingungen und der Komplexität der Anomalieerkennung wurden für die Auswertung T21 und das Vorhandensein des Y-Chromosoms ausgewählt. Als kleinstes Autosom wirkt sich das Chromosom 21 mit seiner Größe direkt auf die Sensitivität der T21-Erkennung aus, insbesondere bei niedrigen Werten für die fetale Fraktion, wie sie in dieser Untersuchung verwendet wurden. Das Vorkommen des Y-Chromosoms in mütterlichem Plasma ist ausschließlich fetalen Ursprungs und so für den Assay einfacher zu erkennen.

Die beobachtete mittlere und Standardabweichung für den LLR-Score von Chromosom 21 und die normierten Chromosomenwerte des Y-Chromosoms zeigten, dass die Standardabweichung bei Replikaten die größte Quelle für Abweichungen darstellt. Abweichungen zwischen Orten, Geräten und Reagenzienchargen erhöhten die Varianz unwesentlich, wie am Unterschied zwischen „Gesamt-Standardabweichung“ und „Standardabweichung für Replikate“ in [Tabelle 19](#) und [Tabelle 20](#) zu erkennen.

Tabelle 19 Zusammenfassung der Standardabweichung bei der Sequenzierungsreaktion an mehreren Standorten (Reproduzierbarkeit)

Reaktion	N	Mittel	Standardabweichung für Replikate	Gesamt-Standardabweichung für Reproduzierbarkeit*
LLR-Score für Chromosom 21	36	34,43	11,36	11,36
Normierte Chromosomenwerte für Chromosom Y	180	190,56	7,96	10,20

* Der Gesamtwert umfasst Abweichungen aufgrund von Standort, Bediener, Lauf, Tag und Replikat.

Tabelle 20 Zusammenfassung zur Präzision der Sequenzierungsreaktion innerhalb des Labors

Reaktion	N	Mittel	Standardabweichung für Replikate	Gesamt-Standardabweichung innerhalb des Labors*
LLR-Score für Chromosom 21	48	36,01	9,07	10,25
Normierte Chromosomenwerte für Chromosom Y	240	198,68	7,63	7,82

* Der Gesamtwert umfasst Abweichungen aufgrund von Sequenzierungsgerät, Reagenziensatz, Bediener, Lauf, Tag und Replikat.

Im Rahmen einer weiteren Untersuchung wurde die Sequenzierungspräzision (Gesamt-Standardabweichung) von VeriSeq NIPT Solution v2 bei Verwendung einer Fließzelle der Version 2.0 mit der Präzision bei Verwendung einer Fließzelle der Version 2.5 verglichen. Die Untersuchung umfasste zwei Fließzellentypen (v2.0 und v2.5), Sequenzierungskits aus drei Chargen, vier Gerätesysteme sowie zwei Sequenzierungsläufe pro Kombination (Durchführung von insgesamt 48 Läufen an einem Standort). Es wurde ein Sequenzierungspool aus manuell vorbereiteten cfDNA-Platten erstellt. Bei jeder Untersuchung enthielt das Probenpanel vier Replikate des Probenpools mit einer 5%igen fetalen Fraktion von T21 und 20 Replikate des Pools mit 10%iger fetaler Fraktion mit cfDNA von Frauen mit männlichem Fetus (XY). Die in [Tabelle 21](#) dargestellten Ergebnisse der Untersuchung stützen die Annahme, dass bei Verwendung von v2.0- bzw. v2.5-Fließzellen die gleiche Sequenzierungspräzision gewährleistet ist.

Tabelle 21 Zusammenfassung der Präzision der Sequenzierungsreaktion bei einer v2.0-Fließzelle im Vergleich zu einer v2.5-Fließzelle

Reaktion	Anzahl der Beobachtungen pro Version	Gesamt-Standardabweichung bei v2.0*	Gesamt-Standardabweichung bei v2.5*	Statistisches Ergebnis**
LLR-Score für Chromosom 21	96	9,56	8,44	Statistisch äquivalent (p-Wert = 0,25)
Normierte Chromosomenwerte für Chromosom Y	480	7,74	7,38	Statistisch äquivalent (p-Wert = 0,38)

* Der Gesamtwert umfasst Abweichungen aufgrund von Sequenzierungsgerät, Reagenziencharge, Lauf, Tag und Replikat.

** Die Werte basieren auf einem F-Test auf Varianzgleichheit (quadrierte Standardabweichungen).

Kreuzkontaminierung

Die Kreuzkontaminierung wurde im Probenvorbereitungs-Workflow von VeriSeq NIPT Solution beurteilt. Plasmapools von nicht schwangeren Frauen (XX) und erwachsenen Männern (XY) wurden für den Test im Schachbrettmuster auf vier 96-Well-Platten verteilt. N = 48, jeweils für weibliche und männliche Proben pro Platte, für insgesamt 192 weibliche und 192 männliche Proben. Keine der weiblichen Proben wies eine statistisch höhere Y-Chromosom-Coverage als der geschätzte Wert auf, was belegt, dass keine Kreuzkontaminierung mit den männlichen Proben in derselben Platte erfolgte. In VeriSeq NIPT Solution wurde keine nachweisbare Kreuzkontaminierung beobachtet.

Potenziell störende Substanzen

Die Einschätzung der Auswirkungen potenziell störender Substanzen erfolgte für VeriSeq NIPT Solution durch die Bewertung der Performance des Assays unter Einwirkung dieser Substanzen.

Pools mit mütterlichem Plasma aus Schwangerschaften mit nicht betroffenen weiblichen Feten (XX) wurden mit jeweils Albumin, Bilirubin, Hämoglobin und Triglyceriden (körpereigen) versetzt. Diese wurden für jede fragliche Substanz (jeweils n = 16) mit zwei Konzentrationen getestet. Es wurde keine Beeinträchtigung der Assay-Performance beobachtet.

Tabelle 22 Potenziell störende Substanzen (körpereigen)

Testsubstanz	Niedrige Testkonzentration (mg/ml)	Hohe Testkonzentration (mg/ml)
Albumin	35	50
Bilirubin	0,01	0,15

Testsubstanz	Niedrige Testkonzentration (mg/ml)	Hohe Testkonzentration (mg/ml)
Hämoglobin	100	200
Triglycerid	1,5	5

Im Plasma natürlich vorkommende mütterliche genomische DNA (gDNA) ist ebenfalls ein potenzielles Risiko für die Beeinträchtigung der Assay-Performance, da sie ggf. zusammen mit der fetalen cfDNA extrahiert wird. Genomische DNA wurde in Konzentrationen von 1,6, 3,3 und 4,9 ng pro Probe (entspricht einer, zwei und drei Standardabweichungen über der mittleren erwarteten gDNA-Konzentration nach 7 Tagen Vollblut-Lagerung¹²) zu cfDNA hinzugefügt, die aus mütterlichem Plasma von nicht betroffenen weiblichen (XX-Fetus) Schwangerschaften extrahiert wurde. Die Proben wurden dann mit VeriSeq NIPT Solution (n = 16 für jede Konzentration) getestet. Es wurde keine Beeinträchtigung der Assay-Performance bei erhöhten Konzentrationen von gDNA festgestellt.

20 arzneimittelbasierte, potenziell störende und häufig während der Schwangerschaft verschriebene Substanzen (körperfremd) wurden gemäß EP7-A2: Interference Testing in Clinical Chemistry, Approved Guideline – Second Edition (Prüfung auf Störsubstanzen in der klinischen Chemie, genehmigte Leitlinie, zweite Ausgabe) getestet. Die 20 potenziellen Störsubstanzen wurden in vier Pools kombiniert, mit mütterlichem Plasma von nicht betroffenen weiblichen (XX-Fetus) Schwangerschaften versetzt und mit VeriSeq NIPT Solution (N = 16 je Pool) getestet. Es wurde keine Beeinträchtigung der Assay-Performance bei Vorhandensein dieser körperfremden Substanzen beobachtet.

Tabelle 23 Potenziell störende Substanzen (körperfremd)

Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 4
Acetaminophen	Diphenhydramin	Salbutamol	Cetirizin
Acetylcystein	Erythromycin	Bupropion	Dextromethorphan
Bisoprolol	Guaifenesin	Koffein	Ascorbinsäure
Citalopram	Heparin	Sertralin	Metoprolol
Desloratadin	Lidocain	Natriumfluorid	Nadolol

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze wird als die Häufigkeit fetaler Fraktion definiert, die der 95%igen Nachweiswahrscheinlichkeit eines Untersuchungsgegenstands, z. B. T21, entspricht. Für die Einschätzung der Nachweisgrenze von VeriSeq NIPT Solution v2 bei verschiedenen häufigen Untersuchungsgegenständen wurden Untersuchungen und statistische Analysen durchgeführt.

Die Nachweiswahrscheinlichkeit eines Untersuchungsgegenstands in einer von VeriSeq NIPT Solution v2 verarbeiteten betroffenen Probe hängt hauptsächlich von drei Faktoren ab:

- Fetale Fraktion
- Sequenzierungstiefe
- Größe und Komplexität der zu untersuchenden Genombereiche

Eine konstante Sequenzierungstiefe vorausgesetzt, lässt sich in einer Probe mit einem höheren Prozentsatz fetaler Fraktion eine gegebene Abweichung einfacher erkennen als in einer Probe mit geringerem Prozentsatz fetaler Fraktion. Umgekehrt gilt: Eine konstante fetale Fraktion vorausgesetzt, lässt sich in einer Probe mit einer größeren Sequenzierungstiefe eine gegebene Abweichung einfacher erkennen als in einer Probe mit geringerer Sequenzierungstiefe. Außerdem sind Abweichungen in kleineren oder komplexeren Genombereichen schwieriger zu erkennen als in größeren oder weniger komplexen Bereichen, sofern die fetale Fraktion und die Sequenzierungstiefe konstant sind.

Für die Bestimmung der Nachweisgrenze bei der T21-Erkennung wurden Mischproben aus gepoolten T21-Proben und gepoolten, nicht betroffenen Proben analysiert. Die beiden Analyttypen wurden in einer Titrationsserie gemischt, sodass ein Satz mit sieben Prozentsätzen fetaler Fraktion (0 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 % und 10 %) erstellt wurde. Jeder Prozentsatz wurde durch insgesamt 10 Replikate repräsentiert.

Die Auflösung des Kennfelds der fetalen Fraktion wurde für die Analyse der Nachweisgrenze weiter erhöht, indem die Daten dieser Untersuchung mit Daten einer In-silico-Verdünnung erweitert wurden. Die Effekte von experimenteller Verdünnung und Titration wurden durch eine kontrollierte Mischung der Sequenzierungsdaten simuliert. Die Daten aus dieser In-silico-Titration deckten einen Satz mit 14 Prozentsätzen fetaler Fraktion ab (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 % und 4,50 %) und umfassten für jeden Prozentsatz 32 Replikate. Mit den Ergebnisdaten wurde eine Probit-Analyse durchgeführt, um so die Nachweisgrenze für T21 zu bestimmen.

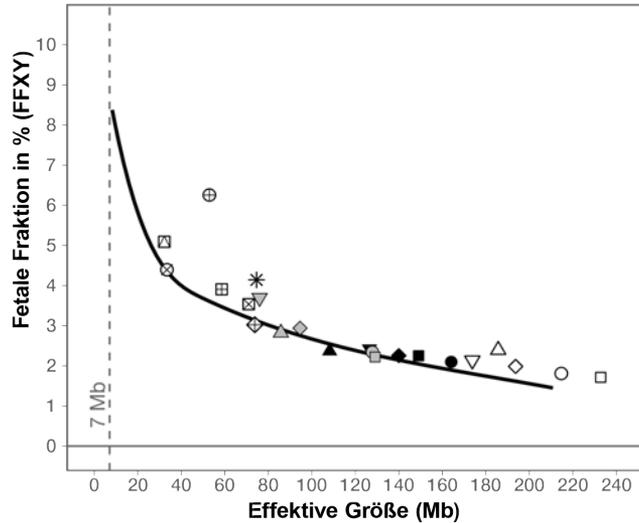
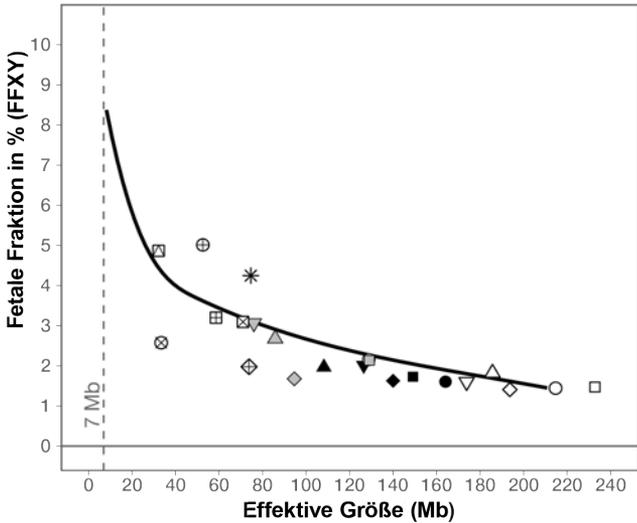
Davon unabhängig wurde ein Statistikmodell auf Grundlage der fetalen Fraktion, der Sequenzierungstiefe und der Größe/Komplexität des Genombereichs entwickelt, mit dem die Nachweiswahrscheinlichkeit einer beliebigen Abweichung in jeder Probe prognostiziert werden kann. Dieses Modell wurde mit Daten entwickelt, die einem Satz mit 1.405 XY-Proben entsprechen. Die mit diesem Modell prognostizierte Nachweisgrenze für T21 gilt als übereinstimmend mit der bereits erläuterten Probit-basierten Schätzung. Mit diesem statistischen Modell wurden die Werte der Nachweisgrenze für Aneuploidien bei allen Autosomen und für partielle Deletionen und Duplikationen geschätzt.

In [Abbildung 2](#) sind die 95%ige Nachweiswahrscheinlichkeit für durchschnittliche Bereiche im Verhältnis zur Größe sowie die autosomalen Nachweisgrenzen für alle Trisomien und Monosomien dargestellt. CNV LLR Cutoff 15.1.

Abbildung 2 95%ige Nachweiswahrscheinlichkeit für durchschnittliche Bereiche im Verhältnis zur Größe für VeriSeq NIPT Solution v2

Symbole zeigen autosomale Nachweisgrenzen für Trisomien an

Symbole zeigen autosomale Nachweisgrenzen für Monosomien an



Chr	Symbol	Trisomie		Monosomie	
		LLR-Schwellenwert	Nachweisgrenze (%)	LLR-Schwellenwert	Nachweisgrenze (%)
1	○	7	1,44	13,2	1,80
2	□	9	1,47	13,6	1,71
3	◇	5	1,41	13,8	1,99
4	△	7	1,82	15,2	2,39
5	▽	7,6	1,60	17	2,14
6	●	7,3	1,60	15,4	2,09
7	■	6,6	1,73	14	2,25
8	◆	5,8	1,63	14,8	2,25
9	▲	8	1,97	13,6	2,37
10	▼	8,8	2,01	14,7	2,42
11	○	12,2	2,14	15,7	2,35

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

Fehlerbehebung

VeriSeq NIPT Solution v2 – Fehlerbehebung

Fehlerart	Mögliche Folge	Interpretation	Empfohlene Aktion	Anmerkungen
Unzureichende Plasmazugabe	Qualitätssicherung der Probe schlägt fehl	Das Plasmavolumen ist nicht ausreichend.	Führen Sie eine erneute Entnahme durch.	Basierend auf der visuellen Prüfung des Plasmavolumens.
Blutröhrchen-Fehler	Blut wird nicht in Schichten getrennt	Die Probe wurde nicht zentrifugiert.	Vergewissern Sie sich, dass die Zentrifuge gestartet und das Röhrchen mit der korrekten Zentrifugalkraft geschleudert wurde. Entnehmen Sie eine neue Probe.	
		Die Probe wurde unsachgemäß gelagert oder transportiert (Hämolyse der Probe).	Entnehmen Sie eine neue Probe.	Gefrorene Proben lassen sich nicht trennen. Unsachgemäße Transport- oder Lagerungsbedingungen können zur Hämolyse der Proben führen.

Fehlerart	Mögliche Folge	Interpretation	Empfohlene Aktion	Anmerkungen
Probenverstopfung oder langsamer Fluss	Plasmakontamination	Einzelne Proben können die Bindungsplatte verstopfen, wenn die Plasmaprobe stark kontaminiert ist.	Kontrollieren Sie die Probe. Brechen Sie die Probe ab und fordern Sie eine erneute Entnahme an, wenn das verbleibende Plasma im Röhrchen rot oder milchig aussieht. Wenn die Probe normal aussieht, testen Sie sie erneut.	
	Probenüberlauf	Unzureichende Sichtprüfung der einzelnen Röhrchen auf Probeneignung.	Alle Proben, die sich in vom Überlauf betroffenen umliegenden Wells befinden, müssen ungültig gemacht werden.	Weist u. U. darauf hin, dass die Probe vor der Verarbeitung unter unzureichenden Bedingungen transportiert oder gelagert wurde. Ungeeignete Proben müssen von der Verarbeitung ausgeschlossen werden.
	Hardwarestörung	Unzureichender Aufschluss des Materials bei der Extraktion.	Testen Sie die Probe erneut. Falls das Problem mit anderen Proben in der Well-Position weiterhin auftritt, wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.	

Fehlerart	Mögliche Folge	Interpretation	Empfohlene Aktion	Anmerkungen
Fehler bei der Analyse-Qualitätssicherung einer einzelnen Probe	Sequenzierungsqualitätssicherung schlägt fehl.	Mögliche Ursachen sind: <ul style="list-style-type: none"> • unzureichende Zugabe genetischen Materials • Übertragungsfehler bei der Handhabung der Proben • fehlerhafte Sequenzierungsreagenzien 	Prüfen Sie die Probenannotation. Prüfen Sie, ob bei zuvor verarbeiteten Proben eine ähnliche Performance an der relativen Plattenposition beobachtet wurde. Testen Sie die Probe erneut.	Gibt entweder eine unzureichende Probenzugabe oder einen Übertragungsfehler auf dem ML STAR-Gerät an. Die Ursache für unzureichendes genetisches Material kann nicht genügend zellfreie DNA im Plasma oder zellbasierte DNA sein, was zu einer übermäßigen Verdünnung der Probe für die Sequenzierung führt.
	Niedriger FF- oder NES-Count (Non-Excluded Sites, nicht ausgeschlossene Loci)	Es wurden nicht genügend Daten für einen genauen Bericht generiert.	Führen Sie einen erneuten Test mit Plasma durch.	

Fehlerart	Mögliche Folge	Interpretation	Empfohlene Aktion	Anmerkungen
Fehler bei der Qualitätssicherung der Quantifizierung	Quantifizierungslauf schlägt fehl. Batch-Mittelwert unter Mindestwert	Unzureichendes Prozessergebnis.	Wiederholen Sie die Quantifizierung. Wenn diese fehlschlägt, wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.	Das Nichterreichen der Metriken für die Standardkurve weist auf Fehler bei der Bibliotheksvorbereitung (Verwendung von Ethanol in für die Molekularbiologie ungeeigneter Qualität usw.) oder beim Quantifizierungsprozess hin.
	Quantifizierungslauf schlägt fehl	Nichterreichen der Standardkurve.	Wiederholen Sie die Quantifizierung. Wenn diese fehlschlägt, wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.	
Fehler beim Pooling	Proben-Pooling kann nicht abgeschlossen werden	Bei der Pooling-Analyse können die ordnungsgemäßen Pool-Volumina nicht berechnet werden.	Ermitteln Sie noch einmal die Zielkonzentration des Pools. Führen Sie die Pooling-Analyse erneut durch.	

Beheben von Problemen mit dem VeriSeq NIPT Microlab STAR-Gerät

Verarbeitungsschritt	Fehlercode	Fehlermeldung	Beschreibung	Maßnahmen des Benutzers zur Problembekämpfung
Batcherstellung	EM0044	The Batch ID entered contains forbidden characters.	VeriSeq NIPT Solution v2 erlaubt für alle Datenfelder nur Zahlen, Buchstaben, Unterstriche und Bindestriche.	Ändern Sie den Namen des Batches so, dass er keine Sonderzeichen enthält.
Batcherstellung	EM0051	The Batch ID is greater than 36 characters in length.	In VeriSeq NIPT Solution v2 ist die Länge von Batchnamen auf maximal 36 Zeichen begrenzt.	Benennen Sie den Batch in einen Namen mit weniger als 36 Zeichen um.
Batcherstellung	EM0076	Unable to connect to VeriSeq Onsite Server v2	Der VeriSeq Onsite Server v2 reagiert nicht auf Datenanforderungen vom Workflow Manager.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Stellen Sie sicher, dass das ML STAR-Gerät mit dem Netzwerk verbunden ist. 2. Stellen Sie sicher, dass der VeriSeq Onsite Server v2 aktiviert ist. 3. Überprüfen Sie, ob das ML STAR-Gerät eine Verbindung zum VeriSeq Onsite Server v2 herstellen kann (per Ping-Abfrage). 4. Wenn mit den oben genannten Schritten das Problem nicht behoben werden kann, wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.

Verarbeitungsschritt	Fehlercode	Fehlermeldung	Beschreibung	Maßnahmen des Benutzers zur Problembeseitigung
Batcherstellung	EM0118	This batch has been failed and cannot be further processed.	Der angegebene Batch ist bereits fehlgeschlagen, sodass eine Weiterverarbeitung nicht möglich ist.	Das Batchprotokoll auf dem VeriSeq Onsite Server v2 gibt an, dass der ausgewählte Batch fehlgeschlagen ist. Die Weiterverarbeitung ist nicht zulässig. Erstellen Sie einen anderen Batch mit den erforderlichen Proben.
Batcherstellung	Nicht zutreffend	This batch has already completed processing. Would you like to repool?	Der angegebene Batch hat das Pooling bereits durchlaufen. Die einzige zulässige Verarbeitungsoption ist die Wiederholung des Poolings.	Wiederholen Sie das Pooling wie folgt. <ul style="list-style-type: none"> • Wählen Sie Re-Pool (Pooling wiederholen). • Brechen Sie die Methode ab und stellen Sie sicher, dass der Batchname korrekt ist, bevor Sie den Batch erneut poolen.
Plasmainsolation	WP0087	Duplicate sample barcodes loaded.	Es wurden Proben mit identischen Barcodes auf das System geladen.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Befolgen Sie die Anweisungen des Workflow Manager, um die Proben mit identischen Barcodes zu identifizieren. 2. Entfernen Sie die Dubletten und ändern Sie deren Bezeichnung oder ersetzen Sie sie. 3. Laden Sie die Proben neu.

Verarbeitungsschritt	Fehlercode	Fehlermeldung	Beschreibung	Maßnahmen des Benutzers zur Problembhebung
Plasmaisolation	EP0102	Samples specified in the Sample Sheet were not loaded.	Im Probenblatt aufgeführte Proben waren bei den geladenen Barcodes nicht enthalten.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Befolgen Sie die Anweisungen des Workflow Manager, um die fehlenden Proben zu identifizieren. 2. Führen Sie einen der folgenden Schritte durch: <ul style="list-style-type: none"> • Nehmen Sie die fehlenden Proben in den Batch auf und laden Sie die Proben neu. • Brechen Sie die Methode ab und ändern Sie das Probenblatt wie erforderlich. Starten Sie die Methode neu.
Laden der Platte	Nicht zutreffend	Venus Barcode Mask Error	Der Workflow Manager erfordert eine korrekte Platten-zu-Batch-Zuordnung mit Venus-Barcode-Masken.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Überprüfen Sie die Platzierung bzw. Anordnung der Platte, um sicherzustellen, dass diese korrekt ist. 2. Stellen Sie sicher, dass die geladene Platte die korrekte Platte für den angegebenen Batch ist.

Verarbeitungsschritt	Fehlercode	Fehlermeldung	Beschreibung	Maßnahmen des Benutzers zur Problembeseitigung
cfDNA-Extraktion	WE0150	Pressure in the vacuum chamber is too low.	Der Workflow Manager fährt nicht mit der Verarbeitung fort, wenn der Ruhedruck des Vakuumschlauchs < 400 Torr beträgt.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Prüfen Sie die Vakuumleitung auf Knicke oder andere Hindernisse. 2. Lösen Sie die Klemmen des Abfallschlauchs, sodass Druck entweichen kann, und schließen Sie sie anschließend wieder vollständig. 3. Stellen Sie sicher, dass der Vakuum-Controller und die Vakuumpumpe eingeschaltet sind. 4. Überprüfen Sie die Abfallflasche. Leeren Sie die Abfallflasche, wenn diese über die Hälfte gefüllt ist. 5. Falls das Problem weiterhin besteht, wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.
cfDNA-Extraktion	WE0153	Pressure in the vacuum chamber is too high.	Wenn vor Beginn der Druckregelung der gemessene Vakuumdruck zu hoch ist, funktioniert das System ggf. nicht ordnungsgemäß.	Stellen Sie auf der Rückseite des Controllers sicher, dass alle Vakuumschlüsse und -schläuche fest sitzen.

Verarbeitungsschritt	Fehlercode	Fehlermeldung	Beschreibung	Maßnahmen des Benutzers zur Problembeseitigung
cfDNA-Extraktion	WE0996	Vacuum failed to seal.	Das Leck muss vor dem Fortfahren beseitigt werden.	<p>Stellen Sie sicher, dass das Leck beseitigt wurde, bevor Sie OK wählen.</p> <ol style="list-style-type: none">1. Stellen Sie sicher, dass die Bindungsplatte bündig am Vakuummanifold anliegt. Drücken Sie die Bindungsplatte mit behandschuhter Hand kräftig nach unten.2. Achten Sie auf das Vakuumgeräusch und beobachten Sie den Wasserfluss durch die Bindungsplatte.3. Öffnen Sie die Trace-Ansicht im Workflow Manager. Wenn der tatsächliche Druckwert mindestens 50 Druckeinheiten geringer als der Umgebungsdruckwert ist, wählen Sie OK, um mit der cfDNA-Extraktion fortzufahren.4. Wenn der erforderliche Druckwert in der eingeräumten Zeit nicht erreicht wird, wählen Sie OK, um mit dem Laden des ersten Lysats fortzufahren.5. Halten Sie das Verfahren nach der Zuführung des Lysats in die Bindungsplatte an. Platzieren Sie die Bindungsplatte erneut und drücken Sie sie kräftig nach unten.6. Wenn das Lysat nicht durch die Platte fließt, wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.

Verarbeitungsschritt	Fehlercode	Fehlermeldung	Beschreibung	Maßnahmen des Benutzers zur Problembeseitigung
cfDNA-Extraktion	WM0219	If Vacuum is on, manually rest the pump.	Das Vakuum bleibt ggf. bestehen, nachdem ein Verfahren während der Extraktion abgebrochen wurde.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Drücken Sie die Ein/Aus-Taste am Vakuum-Controller, um das Vakuumsystem auszuschalten. 2. Warten Sie 10 Sekunden und drücken Sie dann die Ein/Aus-Taste erneut, um das Vakuumsystem wieder einzuschalten.
cfDNA-Extraktion	EE0477	An error has occurred while moving a plate. (iSWAP error)	Wenn ein iSWAP-Fehler auftritt (Platte fällt herunter, kann nicht aufgenommen werden usw.), werden Sie aufgefordert, die Platte manuell zu bewegen.	<p>Stellen Sie sicher, dass die Platte wiederverwendet werden kann (kein verschüttetes Material).</p> <ul style="list-style-type: none"> • Brechen Sie den Lauf ab, wenn eine erneute Verwendung der Platte nicht möglich ist. • Ist die Wiederverwendung möglich, befolgen Sie die angezeigten Anweisungen für die manuelle Durchführung der Plattenübertragung.
cfDNA-Extraktion	EE0519	Scanned barcode does not match binding plate barcode on record.	Die geladene Bindungsplatte stimmt nicht mit dem Barcode der entfernten Platte überein.	Stellen Sie sicher, dass die geladene Platte dem aufgezeichneten Barcode entspricht (im Trace-Protokoll ist der geforderte Barcode aufgeführt).

Verarbeitungsschritt	Fehlercode	Fehlermeldung	Beschreibung	Maßnahmen des Benutzers zur Problembeseitigung
API	EA0372	Unable to connect to the data server.	Der VeriSeq Onsite Server v2 reagiert nicht auf Datenanforderungen vom Workflow Manager.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Stellen Sie sicher, dass das ML STAR-Gerät mit dem Netzwerk verbunden ist. 2. Stellen Sie sicher, dass der VeriSeq Onsite Server v2 aktiviert ist. 3. Überprüfen Sie, ob das ML STAR-Gerät eine Verbindung zum VeriSeq Onsite Server v2 herstellen kann (per Ping-Abfrage).
	EA0774	Connection Error. The API server connection failed to validate.	Der VeriSeq Onsite Server v2 reagiert nicht mehr auf Datenanforderungen vom Workflow Manager.	<p>Stellen Sie Folgendes sicher:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Stellen Sie sicher, dass das ML STAR-Gerät mit dem Netzwerk verbunden ist. 2. Überprüfen Sie, ob das ML STAR-Gerät eine Verbindung zum VeriSeq Onsite Server v2 herstellen kann (per Ping-Abfrage). 3. Stellen Sie sicher, dass der VeriSeq Onsite Server v2 aktiviert ist.
	EA0780	403: Invalid Request The current transaction is not valid.	Die gesendeten Daten verstoßen gegen die Workflow-Logik des Systems.	Weitere Informationen finden Sie in den Fehlerdetails. Häufige Ursachen sind Eingaben von unzulässiger Länge oder mit unzulässigen Zeichen.

Quellen

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. 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.

Versionsverlauf

Dokument	Datum	Beschreibung der Änderung
Dokument-Nr. 1000000078751 v09	April 2024	<p>Entfernt</p> <ul style="list-style-type: none"> • Veraltete Artikel-Nr. 20030577 entfernt. • Angabe hinsichtlich der maximalen Röhrchenkapazität für die Zentrifuge für Blutentnahmeröhrchen entfernt. <p>Hinzugefügt</p> <ul style="list-style-type: none"> • Neue Artikel-Nr. 20101927 für VeriSeq Onsite Server v2 hinzugefügt. • Einheit für 10-ml-Blutprobenröhrchen aktualisiert. • Erläuterung zu den kompatiblen Versionen von SoftMax Pro hinzugefügt. • Erläuternder Hinweis hinzugefügt, dass nur geeignete Kunststoffwaren verwendet werden dürfen, um die Austauschbarkeit mit VeriSeq NIPT Microlab STAR sicherzustellen. • Hinweis zur Vermischung/Verunreinigung von Proben im Abschnitt „Interpretation der Ergebnisse“ hinzugefügt. • Warnhinweis hinzugefügt, dass in Streck Cell-Free DNA BCT gewonnene Vollblutproben nicht eingefroren werden dürfen. • Warnhinweis bezüglich der Vermeidung von Probenexposition bei höheren Temperaturen hinzugefügt. • Erläuterung der Einschränkungen und Reproduzierbarkeitsbedingungen in Zusammenhang mit dem Assay hinzugefügt. • Erläuterung zu CNV LLR Cutoff in Abbildung 2 im Abschnitt „Nachweisgrenze“ hinzugefügt. <p>Aktualisiert</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hinweis auf geeignetes Reagenzreservoir von Roche Reagent Tub zu Illumina Reagent Tub aktualisiert und neue Artikelnummer hinzugefügt. • Katalogartikelnummer für Thermo Fisher Multifuge X4 Pro-MD zu 75016034 aktualisiert. • Warnhinweis zum möglichen Nichtbestehen der automatischen Qualitätssicherung bei ungleichmäßig gefüllten Wells. • Verweis auf Gerätepackungsbeilagen hinzugefügt.

Dokument	Datum	Beschreibung der Änderung
Dokument-Nr. 1000000078751 v08	August 2022	Workflow-Artikelnummer aktualisiert. Anweisung, bei zuvor gefrorenen Bibliotheksplatten zum Mischen zu pipettieren, entfernt.
Dokument-Nr. 1000000078751 v07	Mai 2022	<p>Einschränkungen des Verfahrens unter „VeriSeq NIPT Solution v2-Berichte“ aufgeteilt und die ersten beiden Aufzählungspunkte aufgenommen. Verbleibenden Text in neuen Abschnitt mit der Überschrift „Einschränkungen des Assays“ verschoben.</p> <p>Entfernt</p> <ul style="list-style-type: none"> • VeriSeq aus allen Reagenzienbezeichnungen. • Hinzufügen eines Platten-Barcodes zu VeriSeq NIPT Adapter Plate bei der Probenvorbereitung. <p>Hinzugefügt</p> <ul style="list-style-type: none"> • Angabe „zertifiziert“ zu DNase-/RNase-freiem Wasser. • Einer der folgenden Mikroplatten-Reader oder ein gleichwertiges Gerät sowie SpectraMax M2, M3, M4, M5 und Hinweis. • Zum Abschnitt „VeriSeq NIPT Microlab STAR“, in dem erklärt wird, was bei einem Fehlerereignis zu tun ist. • Hinweis zur Sichtkontrolle der Wells. • Anweisungen zu Batches mit 24 und 48 Proben in allen Protokollabschnitten. • Schritte zur Verwendung der violetten Adapterplatte oder vergleichbar. • Abschnitt „Demographische Gruppen und Schwangerschaftsmerkmale“ um die Ergebnisse zum ersten Schwangerschaftstrimester ergänzt. • Zusätzlichen Aufzählungspunkt zum Thema Verwindungssteifigkeit zu Spezifikationen für Deep-Well-Platten hinzugefügt. <p>Aktualisiert</p>

Dokument	Datum	Beschreibung der Änderung
		<ul style="list-style-type: none">• Erläuterung zu eindeutigen Batch-Namen und Beispiel hinzugefügt.• Symbole und Formatierung für Hinweis, Vorsicht und Warnung.• Unterpunkte mit Testergebnissen.• Guanidinthiocyanat zu Guanidinhydrochlorid.• CVS zu BVS (Basic Vacuum System)• Erläuterungen zur Verwendung von genomweitem Screening und LLR-Score.• Spezifikationen: Reagenzreservoirspezifikationen, Deep-Well-Platten, 384-Well-Platten, 96-Well-Platten
Dokument-Nr. 1000000078751 v06	August 2021	Adresse der autorisierten europäischen Vertretung aktualisiert.

Dokument	Datum	Beschreibung der Änderung
Dokument-Nr. 1000000078751 v05	Dezember 2020	<p>Zusätzliche vorgeschriebene Erläuterungen zu den Abschnitten „Verfahrensprinzipien“, „Warn- und Vorsichtshinweise“ und „Produktkennzeichnungen“ hinzugefügt.</p> <p>Geringfügige Änderungen an den Inhalten des Protokolls zur Anpassung an die aktuellen Stil- und Organisationsvorgaben von Illumina vorgenommen.</p> <p>Beschreibung von Chromosom 21 im Abschnitt „Präzision“ unter „Analyseperformance“ von „zweitkleinstes Autosom“ zu „kleinstes Autosom“ korrigiert.</p> <p>Warnhinweise bezüglich der unsachgemäßen Verwendung von Behältern und des Risikos einer Vermischung der Proben unter „Vorbereitung“ im Abschnitt „Isolieren von Plasma“ sowie zum Abschnitt „Interpretation der Ergebnisse“ hinzugefügt.</p> <p>Neue Server- und Software-Artikelnummern hinzugefügt, da ein neues Servermodell eingeführt und die Software-Artikelnummern aktualisiert wurden.</p> <p>Hinweise zum Umgang mit übergelaufenen Proben bzw. zur Verhinderung des Überlaufs zu den Protokoll- und Fehlerbehebungsinformationen hinzugefügt.</p> <p>Aktive Inhaltsstoffe in DNA Quantification Standard für Reagenzien in der Zubehör-Box an das Sicherheitsdatenblatt angepasst.</p> <p>Benennung des Local Run Manager VeriSeq NIPT Module an andere Dokumentationen angepasst.</p> <p>Versionshistorie hinzugefügt.</p>
Dokument-Nr. 1000000078751 v04	Oktober 2020	Geringfügige Änderungen.
Dokument-Nr. 1000000078751 v03	September 2020	Materialliste dahingehend aktualisiert, dass Spezifikationen für Laborausstattung mit bekannten geeigneten Produkten aufgeführt sind.

Dokument	Datum	Beschreibung der Änderung
Dokument- Nr. 1000000078751 v02	Februar 2020	Darstellung der Daten zur klinischen Performance aktualisiert, sodass die Unterschiede zwischen einfachem und genomweitem Screening verdeutlicht werden. Neuer Abschnitt „Performanceunterschiede zwischen einfachem und genomweisem Screening“ hinzugefügt. Widersprüchliche Angaben zur Optionalität des ergänzenden Berichts aus dem Abschnitt „Verfahrensprinzipien“ entfernt. Benennung der VeriSeq NIPT Workflow Manager v2-Software im gesamten Dokument vereinheitlicht. Kennzeichnung der Adressen von Illumina in Australien und in den Niederlanden an aktuelle Änderungen angepasst.
Dokument- Nr. 1000000078751 v01	August 2019	Die aufgrund eines Fehlers in der DTP-Software entstandene Doppelung eines Schritts unter „Extraktion der cfDNA“ entfernt.
Dokument- Nr. 1000000078751 v00	Mai 2019	Erste Version.

Patente und Marken

Dieses Dokument und dessen Inhalt sind Eigentum von Illumina, Inc. sowie deren Partner-/Tochterunternehmen („Illumina“) und ausschließlich für den bestimmungsgemäßen Gebrauch durch den Kunden in Verbindung mit der Verwendung des hier beschriebenen Produkts/der hier beschriebenen Produkte und für keinen anderen Bestimmungszweck ausgelegt. Dieses Dokument und dessen Inhalt dürfen ohne schriftliches Einverständnis von Illumina zu keinem anderen Zweck verwendet oder verteilt bzw. anderweitig übermittelt, offengelegt oder auf irgendeine Weise reproduziert werden. Illumina überträgt mit diesem Dokument keine Lizenzen unter seinem Patent, Markenzeichen, Urheberrecht oder bürgerlichem Recht bzw. ähnlichen Rechten an Dritte.

Die Anweisungen in diesem Dokument müssen von qualifiziertem und entsprechend ausgebildetem Personal genau befolgt werden, damit die in diesem Dokument beschriebene Verwendung des Produkts/der Produkte sicher und ordnungsgemäß erfolgt. Vor der Verwendung dieser Produkte muss der Inhalt dieses Dokuments vollständig gelesen und verstanden worden sein.

FALLS NICHT ALLE HIERIN AUFGEFÜHRTE ANWEISUNGEN VOLLSTÄNDIG GELESEN UND BEFOLGT WERDEN, KÖNNEN PRODUKTSCHÄDEN, VERLETZUNGEN DER BENUTZER UND ANDERER PERSONEN SOWIE ANDERWEITIGER SACHSCHADEN EINTRETEN UND JEGLICHE FÜR DAS PRODUKT/DIE PRODUKTE GELTENDE GEWÄHRLEISTUNG ERLISCHT.

ILLUMINA ÜBERNIMMT KEINERLEI HAFTUNG FÜR SCHÄDEN, DIE AUS DER UNSACHGEMÄSSEN VERWENDUNG DER HIERIN BESCHRIEBENEN PRODUKTE (EINSCHLIESSLICH TEILEN DAVON ODER DER SOFTWARE) ENTSTEHEN.

© 2024 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

Alle Marken sind Eigentum von Illumina, Inc. bzw. der jeweiligen Inhaber. Spezifische Informationen zu Marken finden Sie unter www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktinformationen



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, Kalifornien 92122, USA
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (außerhalb von Nordamerika)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Produktkennzeichnungen

Die vollständige Referenz der Symbole, die auf der Produktverpackung und -beschriftung verwendet werden, finden Sie im Symbolschlüssel unter support.illumina.com auf der Registerkarte *Documentation* (Dokumentation) für Ihr Kit.

Ein Kurzbericht über Sicherheit und Performance (SSP, Summary of Safety and Performance) ist nach Einführung der Europäischen Medizingerätedatenbank (Eudamed) unter <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> abrufbar. Dieser ist mit der Basis-UDI-DI (0081627002NIPTRP) verknüpft.