

Notice

DESTINÉ AU DIAGNOSTIC IN VITRO.

Utilisation prévue

VeriSeq™ NIPT Solution v2 est un test de diagnostic *in vitro* conçu pour être utilisé comme un test de dépistage des anomalies génétiques fœtales pangénomiques à partir d'échantillons de sang total périphérique maternel de femmes enceintes d'au moins 10 semaines. VeriSeq™ NIPT Solution v2 utilise le séquençage du génome entier (WGS) pour détecter les duplications et délétions partielles pour tous les autosomes et le statut d'aneuploïdie pour tous les chromosomes. Le test offre également l'option d'évaluer l'aneuploïdie des chromosomes sexuels (ACS). Ce produit ne doit pas être utilisé comme l'unique fondement d'un diagnostic ou d'autres décisions sur la prise en charge de la grossesse.

VeriSeq NIPT Solution v2 comprend : le VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 pour le VeriSeq NIPT Microlab STAR, le VeriSeq NIPT Sample Prep Kit et le VeriSeq Onsite Server v2 avec le VeriSeq NIPT Assay Software v2. VeriSeq NIPT Solution v2 est destiné à être utilisé avec un séquenceur de nouvelle génération (NGS).

Résumé et explication du test

Les anomalies chromosomiques fœtales, en particulier l'aneuploïdie, qui est un nombre anormal de chromosomes, sont une cause fréquente d'infertilité, d'anomalies congénitales, de retard de développement et de déficiences intellectuelles. L'aneuploïdie touche environ 1 naissance vivante sur 300 et les fausses couches et les mortinaissances affichent des taux d'aneuploïdie plus élevés que celui-ci.^{1,2} Jusqu'à récemment, il existait deux types de tests prénataux pour ces troubles : les tests diagnostiques ou le dépistage. Les tests diagnostiques impliquent des procédures invasives telles que l'amniocentèse ou le prélèvement de villosités choriales. Ces méthodes de test sont considérées comme la norme de référence pour la détection de l'aneuploïdie fœtale. Cependant, ils sont associés à un risque d'interruption de grossesse de 0,11 % à 0,22 %.³ Les dépistages conventionnels de marqueurs multiples ne présentent aucun risque d'interruption de grossesse car ils sont non invasifs, mais ils sont moins précis que les tests diagnostiques. Leurs taux de détection de la trisomie 21 varient entre 69 % et 96 % selon le dépistage particulier, l'âge maternel et l'âge gestationnel au moment du test.⁴ Il est important de noter qu'ils présentent des taux de faux positifs d'environ 5 %, ce qui peut conduire à des tests diagnostiques invasifs pour confirmation et exposer ainsi la grossesse à un risque d'interruption.⁴ Les dépistages échographiques peuvent également détecter des anomalies chromosomiques, mais ils le font avec encore moins de certitude que ces autres méthodes.

L'aneuploïdie fœtale pour les chromosomes 21, 18, 13, X et Y peut être détectée avec un degré élevé de précision par le test de dépistage prénatal non invasif (NIPT) utilisant le séquençage du génome entier (WGS) de l'ADN libre circulant (ADNlc) extrait du plasma maternel à 10 semaines de gestation ou plus tard. Une méta-analyse récente de plusieurs études cliniques a rapporté les taux de détection regroupés pondérés et les spécificités de la trisomie 21 et de la trisomie 18 dans les grossesses simples comme suit : trisomie 21 99,7 % et

99,96 % et trisomie 18 97,9 % et 99,96 % respectivement.⁵ Une étude suggère que l'utilisation du NIPT comme dépistage primaire pour toutes les grossesses pourrait entraîner une réduction de 89 % du nombre de procédures invasives de confirmation.⁶

Compte tenu de la réduction significative des taux de faux positifs avec le NIPT par rapport au dépistage conventionnel de marqueurs multiples, de nombreuses organisations médicales professionnelles ont publié des déclarations d'opinion soutenant plusieurs indications pour l'utilisation du NIPT.

Plus particulièrement, l'International Society for Prenatal Diagnosis, l'American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) / Society for Maternal Fetal Medicine (SMFM), l'American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG), la European Society of Human Genetics et l'American Society of Human Genetics soutiennent la nécessité d'offrir le NIPT à toutes les femmes enceintes.^{7,8,9} Le conseil avant-test, le consentement éclairé et les tests diagnostiques pour confirmer un résultat positif de dépistage d'ADNc sont recommandés.⁴

VeriSeq NIPT Solution v2 est un test de diagnostic in vitro (DIV) non invasif qui utilise le séquençage du génome entier (WGS) sur des fragments d'ADNc extraits d'échantillons de sang total périphérique maternel provenant de femmes enceintes d'au moins 10 semaines. Le test offre deux options pour les types de dépistage : de base et pangénomique. Le dépistage de base fournit des informations sur le statut de l'aneuploïdie pour les chromosomes 21, 18, 13, X et Y uniquement. Le dépistage pangénomique indique des délétions et des duplications partielles pour tous les autosomes et le statut d'aneuploïdie pour tous les chromosomes. Les deux types de dépistage offrent la possibilité de signaler l'aneuploïdie des chromosomes sexuels (ACS) avec ou sans indication du sexe du fœtus. L'option de signalement de l'ACS peut être désactivée. Si l'option de signalement pour l'ACS est désactivée, le sexe fœtal n'est pas non plus rapporté. Pour plus d'informations sur les options de déclaration du sexe, consultez le *Guide du logiciel VeriSeq NIPT Solution v2 (document n° 1000000067940)*.

Principes de la procédure

VeriSeq NIPT Solution v2 est une solution automatisée pour les tests de NIPT en laboratoire et consiste en une préparation automatisée des échantillons et une analyse des données de séquençage. VeriSeq NIPT Sample Prep Kit est un ensemble de réactifs spéciaux à usage unique qui sont utilisés conjointement avec VeriSeq NIPT Microlab STAR pour préparer des lots de 24, 48 ou 96 échantillons pour le séquençage de nouvelle génération. Les données de séquençage appariées sont analysées pour le génome entier par un logiciel spécialisé, VeriSeq NIPT Assay Software v2, et un rapport qui fournit des résultats qualitatifs est produit.

Le flux de travail comprend les procédures suivantes : prélèvement d'échantillons, isolement du plasma, extraction d'ADNc, préparation de banques, quantification des banques, regroupement des banques, séquençage et analyse décrite plus en détail ci-dessous :

- **Prélèvement des échantillons** : de 7 à 10 ml de sang total périphérique maternel sont prélevés dans un tube Streck cell-free DNA Blood Collection Tube (BCT), qui contient un conservateur qui prévient la lyse cellulaire, ce qui empêche la contamination génomique et stabilise le sang total.
- **Isolement du plasma** : dans les 5 jours suivants le prélèvement, le plasma est isolé du sang total périphérique maternel à l'aide des techniques de centrifugation standard. VeriSeq NIPT Microlab STAR aspire et distribue le plasma dans une plaque de 96 puits profonds pour un traitement successif.

Dans le cas où une nouvelle analyse est nécessaire, les échantillons post-traitement peuvent être rebouchés et conservés à 4 °C pendant 5 jours supplémentaires (jusqu'à un total de 10 jours après le prélèvement sanguin).

**ATTENTION**

Le dépassement des durées de stockage susmentionnées peut avoir des répercussions négatives sur les taux d'échecs des échantillons individuels.

- **Extraction d'ADNlc** : la purification d'ADNlc du plasma est réalisée par adsorption sur une plaque de fixation, lavage de la plaque de liaison pour éliminer les contaminants et élution finale.
- **Préparation de la banque** : les fragments d'ADNlc purifiés subissent un processus de réparation des extrémités pour convertir les extrémités 5' et 3' saillantes en extrémités franches. Ensuite, un nucléotide désoxyadénosine est ajouté aux extrémités 3' pour créer une extrémité franche d'une seule base. Des adaptateurs indexés contenant une extrémité 3' de désoxythymidine sont ensuite ligaturés sur les fragments d'ADNlc traités. L'ADN ligaturé est purifié à l'aide de billes d'immobilisation réversible en phase solide. Chaque échantillon d'un ensemble de 24, 48 ou 96 reçoit un adaptateur indexé unique. Les adaptateurs ont deux fonctions :

**ATTENTION**

Faites preuve d'extrême prudence pour éviter toute contamination croisée des index qui pourrait conduire à des résultats incorrects.

- Les index permettent l'identification des échantillons dans le séquençage successif.
- Les adaptateurs d'index contiennent des séquences qui permettent la capture de la banque sur la surface solide d'une flow cell de séquençage pour la génération d'amplifiats et leur séquençage successif.
- **Quantification** : le produit de la banque est quantifié à l'aide d'un colorant fluorescent dont la concentration est déterminée par comparaison avec une courbe étalon d'ADN.
- **Regroupement et séquençage des banques** : les banques d'échantillons sont regroupées en groupes de 24 ou 48 échantillons, selon des quantités ajustées afin de minimiser les variations de couverture. Chaque groupe est ensuite séquençé à l'aide d'un système de séquençage de nouvelle génération.
- VeriSeq NIPT Solution v2 n'inclut pas d'équipement de séquençage ni les consommables.
- **Analyse** : pour chaque échantillon, l'analyse consiste en :
 - L'identification de fragments de banque par séquence d'index et alignement des lectures appariées sur un génome humain de référence.
 - Estimation de la fraction fœtale de la banque en combinant des informations provenant de la distribution des longueurs et des coordonnées génomiques des fragments de la banque.
 - Après avoir pris en compte les biais connus, un modèle statistique détecte les régions du génome qui sont sous- ou sur-représentées dans la banque de manière cohérente avec une anomalie au niveau estimé de la fraction fœtale.

- Le rapport NIPT fournit un résumé des résultats pour le menu de test sélectionné, dans lequel ANOMALY DETECTED (Anomalie détectée) ou NO ANOMALY DETECTED (Aucune anomalie détectée) est répertoriée, ainsi qu'une estimation de fraction foétale pour les échantillons ayant passé le CQ.
- Le rapport supplémentaire fournit des mesures quantitatives qui caractérisent chacune des anomalies détectées.

Limites de la procédure

Limites du test

- Les preuves à l'appui de la sensibilité et de la spécificité du test couvrent les grossesses simples et gémellaires. Ces instructions d'utilisation ne fournissent pas de données de sensibilité ou de spécificité pour les grossesses d'ordre supérieur (triplés ou plus).
- Le test VeriSeq NIPT Solution v2 n'est pas destiné à détecter la polyploïdie, telle que la triploïdie.
- Le test VeriSeq NIPT Solution v2 n'est pas destiné à détecter les réarrangements chromosomiques équilibrés.
- Le test nécessite des échantillons de sang total périphérique maternel de femmes enceintes d'au moins 10 semaines de gestation.
- Pour les dépistages de base, le test VeriSeq NIPT Solution v2 recherche la présence d'anomalies chromosomiques spécifiques. Les résultats rapportés comme NO ANOMALY DETECTED (Aucune anomalie détectée) n'excluent pas la possibilité d'anomalies chromosomiques des chromosomes testés. Un résultat négatif n'exclut pas la possibilité que la grossesse s'accompagne d'autres anomalies chromosomiques, de maladies génétiques ou d'anomalies congénitales (p. ex., défaut de fermeture du tube neural).
- Pour les dépistages pangénomiques, des délétions et duplications importantes qui touchent moins de 75 % de la taille du chromosome peuvent indiquer une aneuploïdie panchromosomique.
- Pour les dépistages pangénomiques, certaines régions sont exclues de l'analyse. Une liste de ces régions ignorées est disponible sur le site Web de support Illumina. La détection des anomalies génomiques n'est effectuée que sur les régions non exclues.
- Les rapports sur le sexe foetal ne sont pas disponibles dans tous les pays en raison des réglementations locales régissant la déclaration du sexe.
- Sur la base des preuves de la littérature scientifique, les résultats de dépistage basés sur l'ADN libre circulant peuvent être biaisés par certains facteurs maternels et foetaux. Ces facteurs comprennent, sans s'y limiter :
 - Transfusion sanguine maternelle récente
 - Greffe maternelle d'organe / greffe de cellules souches antérieures à la grossesse
 - Maladie auto-immune maternelle
 - Néoplasies maternelles (bénignes et malignes)

- Mosaïcisme maternel
- Variations du nombre de copies maternelles
- Mosaïcisme foëto-placentaire / mosaïcisme placentaire confiné
- Décès foëtal / perte d'un jumeau

Rapports de VeriSeq NIPT Solution v2

- VeriSeq NIPT Solution v2 est un test de dépistage et ne doit pas être considéré indépendamment des autres résultats cliniques et des résultats des tests. Les conclusions sur l'état foëtal et les décisions de gestion de la grossesse ne devraient pas être basées sur les résultats du seul test NIPT.⁷
- VeriSeq NIPT Solution v2 crée un rapport sur les éléments suivants :
 - Les tests de dépistage de base permettent d'examiner la sur-représentation des chromosomes 13, 18 et 21.
 - Les tests de dépistage pangénomique permettent d'examiner la sous-représentation et la sur-représentation de tous les autosomes, notamment les délétions et les duplications partielles d'au moins 7 Mb.
 - Dans les grossesses simples, si la valeur Yes (Oui) ou SCA (ACS) est sélectionnée comme option de déclaration du sexe, les anomalies chromosomiques sexuelles suivantes sont signalées : XO, XXX, XXY et XYY.
 - Dans les grossesses simples, si la valeur Yes (Oui) ou SCA (ACS) est sélectionnée comme option de déclaration du sexe, le sexe du foëtus est rapporté.
 - La présence d'un chromosome Y dans les grossesses gémeillaires.

Composants du produit

VeriSeq NIPT Solution v2 comprend les éléments de préparation d'échantillons suivants :

- VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (24 échantillons) (référence 20025895)
- VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (48 échantillons) (référence 15066801)
- VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (96 échantillons) (référence 15066802)

VeriSeq NIPT Solution v2 comprend les composants logiciels suivants :

- VeriSeq NIPT Assay Software v2 (référence 20047024), préinstallé sur VeriSeq Onsite Server v2.
 - VeriSeq Onsite Server v2 (référence 20028403, 20047000, 20101927) ou un VeriSeq Onsite Server existant (référence 15076164 ou 20016240) mis à niveau à la v2.
- VeriSeq NIPT Workflow Manager v2, (référence 20044988), préinstallé sur VeriSeq NIPT Microlab STAR.
 - VeriSeq NIPT Microlab STAR (référence Hamilton Company Reno : 95475-01 (115 V) & 95475-02 (230 V), Hamilton Company Bonaduz : 806288).
- Local Run Manager VeriSeq NIPT Module (référence 20044989).

Réactifs

Réactifs fournis

Illumina fournit les réactifs suivants : VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (24 échantillons) (référence 20025895), VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (48 échantillons) (référence 15066801) et VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (96 échantillons) (référence 15066802). Les réactifs VeriSeq NIPT Sample Prep Kit sont configurés pour être utilisés avec VeriSeq NIPT Microlab STAR (ML STAR) (référence 95475-01, 95475-02, ou 806288), fourni par Hamilton Company.

VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, Boîte d'extraction

Tableau 1 VeriSeq NIPT Extraction Box (24) et (48), références 20025869 et 15066803

Nom du réactif sur l'étiquette	Nombre de conteneurs dans le kit	Ingrédients actifs	Stockage
Lysis Buffer (Tampon de lyse)	1	Chlorhydrate de guanidine en solution aqueuse tamponnée	15 °C à 30 °C
Wash Buffer I (Tampon de lavage I)	1	Chlorhydrate de guanidine et 2-propanol en solution aqueuse tamponnée	15 °C à 30 °C
Wash Buffer II (Tampon de lavage II)	1	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels	15 °C à 30 °C
Elution Buffer (Tampon d'élution)	1	Solution aqueuse tamponnée	15 °C à 30 °C
Proteinase Buffer (Tampon protéinase)	1	Glycérol en solution aqueuse tamponnée	15 °C à 30 °C
Proteinase K (Protéinase K)	3	Protéinase K lyophilisée	15 °C à 30 °C

Tableau 2 VeriSeq NIPT Extraction Box (96), référence 15066807

Nom du réactif sur l'étiquette	Nombre de conteneurs dans le kit	Ingrédients actifs	Stockage
Lysis Buffer (Tampon de lyse)	1	Chlorhydrate de guanidine en solution aqueuse tamponnée	15 °C à 30 °C
Wash Buffer I (Tampon de lavage I)	1	Chlorhydrate de guanidine et 2-propanol en solution aqueuse tamponnée	15 °C à 30 °C
Wash Buffer II (Tampon de lavage II)	2	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels	15 °C à 30 °C
Elution Buffer (Tampon d'élution)	1	Solution aqueuse tamponnée	15 °C à 30 °C
Proteinase Buffer (Tampon protéinase)	1	Glycérol en solution aqueuse tamponnée	15 °C à 30 °C
Proteinase K (Protéinase K)	4	Protéinase K lyophilisée	15 °C à 30 °C

VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, boîte de préparation de banque

Tableau 3 VeriSeq NIPT Library Prep Box (24) et (48), références 20026030 et 15066809

Nom du réactif sur l'étiquette	Nombre de conteneurs dans le kit	Ingrédients actifs	Stockage
End Repair Mix (Mélange de réparation des extrémités)	1	ADN polymérase et dNTP dans une solution aqueuse tamponnée	-25 °C à -15 °C
A-Tailing Mix (Mélange d'extension et de ligation)	1	ADN polymérase et dATP dans une solution aqueuse tamponnée	-25 °C à -15 °C
Ligation Mix (Mélange de ligation)	1	ADN ligase en solution aqueuse tamponnée	-25 °C à -15 °C
Hybridization Buffer (Tampon d'hybridation)	1	Solution aqueuse tamponnée	-25 °C à -15 °C
NIPT DNA Adapter Plate (Plaque adaptateur d'ADN pour NIPT)	1	Oligonucléotides en solution aqueuse tamponnée	-25 °C à -15 °C

Tableau 4 VeriSeq NIPT Library Prep Box (96), référence 15066810

Nom du réactif sur l'étiquette	Nombre de conteneurs dans le kit	Ingrédients actifs	Stockage
End Repair Mix (Mélange de réparation des extrémités)	1	ADN polymérase et dNTP dans une solution aqueuse tamponnée	-25 °C à -15 °C
A-Tailing Mix (Mélange d'extension et de ligation)	2	ADN polymérase et dATP dans une solution aqueuse tamponnée	-25 °C à -15 °C
Ligation Mix (Mélange de ligation)	2	ADN ligase en solution aqueuse tamponnée	-25 °C à -15 °C
Hybridization Buffer (Tampon d'hybridation)	1	Solution aqueuse tamponnée	-25 °C à -15 °C
NIPT DNA Adapter Plate (Plaque adaptateur d'ADN pour NIPT)	1	Oligonucléotides en solution aqueuse tamponnée	-25 °C à -15 °C

VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, Boîte d'accessoires

Tableau 5 VeriSeq NIPT Accessory Box, référence 15066811

Nom du réactif sur l'étiquette	Nombre de conteneurs dans le kit	Ingrédients actifs	Stockage
DNA Binding Plate (Plaque de fixation à l'ADN)	1	Microplaque en propylène avec membrane en silicone modifiée	2 °C à 8 °C
Resuspension Buffer (Tampon de remise en suspension)	1	Solution aqueuse tamponnée	2 °C à 8 °C
Sample Purification Beads (Billes de purification de l'échantillon)	1	Billes paramagnétiques en phase solide dans une solution aqueuse tamponnée	2 °C à 8 °C
DNA Quantification Reagent (Réactif de quantification de l'ADN)	1	Colorant intercalant de l'ADN dans du DMSO	2 °C à 8 °C
DNA Quantification Standard (Standard de quantification de l'ADN)	1	Étalon ADN double-brin, ADN non spécifique et azide de sodium en solution aqueuse tamponnée	2 °C à 8 °C

VeriSeq NIPT Sample Prep, tubes de flux de travail et étiquettes

Tableau 6 Étiquettes et tubes du flux de travail, référence 15071543

Nom de l'élément sur l'étiquette	Nombre d'articles dans le kit	Stockage
Étiquette (LBL) – Code-barres de la plaque	9	15 °C à 30 °C
Étiquette (LBL) – Code-barres de la plaque à puits profonds	12	15 °C à 30 °C
Tube (TB) – Tube de groupement vide	5	15 °C à 30 °C

Réactifs non fournis

Réactifs requis, non fournis

- Réactifs de séquençage et consommables requis pour le système de séquençage de nouvelle génération (NGS).
- Eau certifiée exempte de DNase/RNase – qualité biologie moléculaire
- Éthanol 100 % (200 proof) – qualité biologie moléculaire

REMARQUE L'éthanol de qualité biologique non moléculaire peut avoir des répercussions négatives sur les performances du test.

Réactifs optionnels, non fournis

- Solution saline tamponnée au phosphate de Dulbecco (DPBS, Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) pour le contrôle sans matrice (NTC, no template control)

Stockage et manipulation

1. La température ambiante est définie comme comprise entre 15 °C et 30 °C.
2. Tous les réactifs sont à usage unique. Après avoir été préparés, les réactifs doivent être utilisés immédiatement.
3. Si l'emballage ou le contenu des composants de VeriSeq NIPT Solution sont endommagés ou compromis, veuillez contacter le service clients Illumina.
4. Les réactifs sont stables lorsqu'ils sont stockés comme indiqué jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du kit. Pour connaître les conditions de stockage, reportez-vous à la colonne Stockage dans les tableaux de la section [Réactifs](#). N'utilisez pas de réactifs périmés.
5. Des changements dans l'aspect physique des réactifs peuvent indiquer une détérioration des matériels. En cas de changements dans l'aspect physique (par exemple, une modification évidente de la couleur du réactif ou une opalescence apparente avec une contamination microbienne), n'utilisez pas les réactifs.
6. Respectez les meilleures pratiques suivantes lors de la manipulation des billes de purification d'échantillon :
 - Ne congelez jamais les billes.
 - Attendez que les billes soient à température ambiante.
 - Immédiatement avant utilisation, agitez au vortex les billes jusqu'à ce qu'elles soient remises en suspension et que la couleur apparaisse homogène.
7. Les tampons de lyse, de lavage I, de lavage II, d'éluion et de protéinase peuvent former des précipités ou des cristaux visibles. Avant utilisation, agitez au vortex vigoureusement, puis inspectez visuellement pour vous assurer qu'il n'y a pas de précipités.

8. Ne congelez jamais le sang total après le prélèvement.
9. Séquencez les banques dès que possible après le regroupement. Les banques regroupées sont stables jusqu'à sept jours entre -25 °C et -15 °C. Aucune dénaturation supplémentaire n'est nécessaire si elles sont stockées dans ces conditions pendant cette période.

Équipements et matériels

Équipement et matériels nécessaires, non fournis

Équipements requis, non fournis

Équipements	Fournisseur
Un système de séquençage de nouvelle génération (NGS) avec les capacités suivantes : <ul style="list-style-type: none"> • Séquençage à lecture appariée de 2 x 36 pb • Compatible avec les adaptateurs à double index VeriSeq NIPT Sample Prep Kit • Production automatique de fichiers BCL • Chimie à deux canaux • 400 millions de lectures appariées par analyse • Compatible avec VeriSeq NIPT Assay Software v2 ou un système de séquençage NextSeq 550Dx. 	Fournisseur d'instruments ou Illumina, référence 20005715
Congélateur, -25 °C à -15 °C	Fournisseur de laboratoire général
Microcentrifugeuse	Fournisseur de laboratoire général
Aide-pipette	Fournisseur de laboratoire général
Réfrigérateur, de 2 °C à 8 °C	Fournisseur de laboratoire général
Pipettes monocanal 20 µl	Fournisseur de laboratoire général
Pipettes monocanal 200 µl	Fournisseur de laboratoire général
Pipettes monocanal 1 000 µl	Fournisseur de laboratoire général
Vortexeur	Fournisseur de laboratoire général
Ensemble centrifugeuse et rotor pour tubes de prélèvement sanguin	

Équipements	Fournisseur
Équivalent : <ul style="list-style-type: none"> Centrifugeuse réfrigérée atteignant 1 600 g avec option sans frein Rotor oscillant à godets avec godets Inserts de godet avec profondeur minimale de 76 mm Inserts adaptateurs pour tubes de prélèvement sanguin de 16 mm x 100 mm 	Fournisseur de laboratoire général
Recommandé : <ul style="list-style-type: none"> Centrifugeuse série Allegra X12R, 1 600 g Centrifugeuse Allegra GH-3.8 Rotor avec récipients Couvercles de récipients pour centrifugeuse Allegra, lot de deux Adaptateur pour centrifugeuse Allegra, 16 mm, lot de quatre 	Beckman Coulter, article n° 392304 (120 V ou 230 V) Beckman Coulter, article n° 369704 Beckman Coulter, article n° 392805 Beckman Coulter, article n° 359150
Ensemble centrifugeuse et rotor pour microplaques	
Équivalent : <ul style="list-style-type: none"> Centrifugeuse atteignant 5 600 g Rotor à plaques oscillantes avec profondeur minimale de 76,5 mm. Multifuge X4 Pro-MD 120 V TX-1000BT Centrifugeuse Sorvall Legend XTR 	Fournisseur de laboratoire général Thermo Fisher Scientific référence 75016034 Thermo Fisher Scientific, référence 75004521 (120 V) ou référence 75004520 (230 V)
<ul style="list-style-type: none"> Rotor pour microplaques HIGHPlate 6000 Plaque haute du rotor 6000 Base de support pour microplaques <ul style="list-style-type: none"> Recommandé : <ul style="list-style-type: none"> Base de support pour 96-puits MicroAmp Porte-plaques PCR 96-puits 	Thermo Fisher Scientific, référence 75003606 Thermo Scientific VWR, référence 97040-244 Thermo Fisher Scientific, référence 4379590 Thermo Fisher Scientific, référence AB-0563/1000
L'un des lecteurs de microplaques suivants, ou équivalent, (fluorimètre) avec SoftMax Pro v6.2.2–7.1.2 : <ul style="list-style-type: none"> Gemini XPS SpectraMax M2, M3, M4 et M5. <ul style="list-style-type: none"> L'insert violet est requis avec le lecteur de microplaques dans le flux de travail. 	Molecular Devices, référence XPS Molecular Devices, références M2, M3, M4 et M5
SpectraMax High-Speed USB, adaptateur de série	Molecular Devices, référence 9000-0938

Équipements	Fournisseur
Thermocycleur présentant les caractéristiques suivantes : <ul style="list-style-type: none"> • Couvercle chauffant • Plage de températures de 4 °C à 98 °C • Précision de la température ± 2 °C • Vitesse de rampe minimale de 2 °C par seconde • Compatible avec la plaque PCR Twin.tec 96-puits, jupe complète 	Fournisseur de laboratoire général
VeriSeq NIPT Microlab STAR	Hamilton, référence 95475-01 (115 V), référence 95475-02 (230 V), ou référence 806288 (pour Hamilton Company Bonaduz).
VeriSeq Onsite Server v2 ou une version plus récente de VeriSeq Onsite Server	Illumina, référence 20028403 ou 20047000 (v2) ou 20101927 ou 15076164 ou 20016240 (mis à jour)
En cas d'utilisation du système de séquençage NextSeq 550Dx : <ul style="list-style-type: none"> • NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5, 75 cycles 	Illumina, référence 20028870

Équipements en option, non fournis

Équipements	Fournisseur
Pluggo Decapper System	LGP Consulting, référence 4600 4450
Plaque de validation de fluorescence SpectraMax SpectraTest FL1	Molecular Devices, référence 0200-5060
Revolver/rotateur de tubes, tubes de 15 ml, 40 tr/min, 100–240 V	Thermo Scientific, référence 88881001 (États-Unis) ou référence 88881002 (UE)

Matériel nécessaire, non fourni

Consommable	Fournisseur
Embouts de filtre conducteurs non stériles de 1 000 μ l	Hamilton, référence 235905
Embouts de filtre conducteurs non stériles de 300 μ l	Hamilton, référence 235903
Embouts de filtre conducteurs non stériles de 50 μ l	Hamilton, référence 235948

Consommable	Fournisseur
<p>Réservoir à puits profonds avec les caractéristiques suivantes :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Microplaque SLAS 1-2004 avec 96 puits à fond pyramidal ou conique et une capacité minimale de 240 ml. • Polypropylène avec préférence pour un faible taux de fixation de l'ADN pour toutes les surfaces en contact avec l'échantillon. • Les dimensions internes (niveau de liquide) sont compatibles avec les étapes d'aspiration et de distribution automatisées de VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Les dimensions en hauteur sont compatibles avec les mouvements automatisés de VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	<p>Fournisseur de laboratoire général</p> <p>Réservoirs compatibles :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Corning Axygen, produit n° RES-SW96-HP-SI • Agilent, produit n° 201246-100
<p>Tubes de réactifs avec les caractéristiques suivantes :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tube qui s'insère solidement, mais sans forcer, dans le support de VeriSeq NIPT Microlab STAR avec un fond conique et une capacité minimale de 20 ml. • Polypropylène sans RNase/DNase. • Les dimensions internes du réservoir (niveau de liquide) génèrent des niveaux de liquide à l'aide de volumes de réactifs de dosage compatibles avec les étapes d'aspiration et de distribution automatisées de VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Les dimensions en hauteur sont compatibles avec les mouvements automatisés de VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	<p>Tubes compatibles :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tube de réactifs Illumina, référence 20095418

Consommable	Fournisseur
<p>Plaques à puits profonds avec les caractéristiques suivantes :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Microplaque SLAS 1–2004, 3–2004 et 4–2004 avec 96 puits à fond pyramidal ou conique et une capacité de puits minimale de 2 ml. • Polypropylène translucide, avec une préférence pour les matériels à faible taux de fixation de l'ADN pour toutes les surfaces en contact avec l'échantillon. • Les dimensions du puits génèrent un niveau de liquide compatible avec les étapes d'aspiration et de distribution automatisées de VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Jupe de plaque qui permet de placer les codes-barres de plaque pour exiger une position avec une adhérence sûre et plane sur la surface. • Cadre résistant au couple capable de supporter un minimum de 5 600 g. • Les dimensions de la hauteur de la plaque sont compatibles avec les mouvements automatisés de VeriSeq NIPT Microlab STAR 	<p>Fournisseur de laboratoire général</p> <p>Plaques compatibles :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, référence 0030505301 • Eppendorf, référence 30502302 • USA Scientific, référence 1896-2000
<p>Plaque de 384 puits avec les caractéristiques suivantes :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Microplaque de 384 puits, optimisée pour les petits volumes, avec une capacité de puits minimum de 50 µl. • Polystyrène noir opaque avec blocage de la lumière et faible taux de fixation de l'ADN pour toutes les surfaces en contact avec les échantillons. • Les dimensions des puits génèrent des niveaux de liquide compatibles avec les étapes d'aspiration et de distribution automatisées de VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Les dimensions de la hauteur des plaques sont compatibles avec les mouvements automatisés de VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Jupe de plaque qui permet de placer les codes-barres de plaque dans la position requise avec une adhérence sûre et plane sur la surface. 	<p>Fournisseur de laboratoire général</p> <p>Plaques compatibles :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Corning, produit n° 3820

Consommable	Fournisseur
<p>Plaque de 96 puits avec les caractéristiques suivantes :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Microplaque avec un cadre résistant au couple capable de supporter un minimum de 5 600 g et 96 puits translucides avec des fonds coniques, des rebords surélevés et une capacité de puits minimale de 150 µl. • Polypropylène sans RNase ni DNase avec un faible taux de fixation de l'ADN pour toutes les surfaces de contact avec l'échantillon. • Les dimensions des puits génèrent des niveaux de liquide compatibles avec les étapes d'aspiration et de distribution automatisées de VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Les dimensions de la hauteur des plaques sont compatibles avec les mouvements automatisés de VeriSeq NIPT Microlab STAR. <p>REMARQUE : les objets en matière plastique compatibles avec des références différentes, par exemple, les plaques à 96 puits compatibles de différents fabricants, peuvent ne pas être directement interchangeables sans étalonnage spécifique de la pièce au système VeriSeq NIPT Microlab STAR par le personnel de service et d'assistance Illumina. En cas de changement d'objets en matière plastique, consultez votre équipe d'assistance Illumina.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Jupe de plaque qui permet de placer les codes-barres de plaque dans la position requise avec une adhérence sûre et plane sur la surface. • Compatible avec les thermocycleurs pour la dénaturation. 	<p>Fournisseur de laboratoire général</p> <p>Plaques compatibles :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, référence 0030129512 • Eppendorf, référence 30129580 • Eppendorf, référence 30129598 • Eppendorf, référence 30129660 • Eppendorf, référence 30129679 • Bio-Rad, référence HSP9601
<p>L'un des opercules suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Film Microseal 'F' • Opercule en aluminium 	<p>Bio-Rad, référence MSF1001 Beckman Coulter, article n° 538619</p>
<p>Tube de prélèvement sanguin pour ADN libre circulant</p>	<p>Streck, catalogue n° 218997</p>
<p>Capuchons à pression</p>	<p>Sarstedt, commande n° 65.802</p>
<p>Tubes à bouchon à vis de 2 ml</p>	<p>Fournisseur de laboratoire général</p>
<p>Embouts à filtre 20 µl pour pipette 20 µl</p>	<p>Fournisseur de laboratoire général</p>
<p>Embouts à filtre 200 µl pour pipette 200 µl</p>	<p>Fournisseur de laboratoire général</p>

Consommable	Fournisseur
Embouts à filtre 1 000 µl pour pipette 1 000 µl	Fournisseur de laboratoire général
Équivalent :	Fournisseur de laboratoire général
<ul style="list-style-type: none"> • Un spray désinfectant rapide à base d'alcool • Une solution de détergent désinfectant 	
Recommandé :	
<ul style="list-style-type: none"> • Eau désionisée et éthanol à 70 % 	

Matériels en option, non fournis

Consommables	Fournisseur
Solution saline tamponnée au phosphate de Dulbecco (DPBS, Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) pour le contrôle sans matrice (NTC, no template control)	Fournisseur de laboratoire général
Tube, bouchon à vis, 10 ml (uniquement pour les échantillons de contrôle)	Sarstedt, référence 60.551
Tube, bouchon à vis, 50 ml	Fournisseur de laboratoire général
Pipettes sérologiques, 25 ml	Fournisseur de laboratoire général
Pipettes sérologiques, 10 ml	Fournisseur de laboratoire général

Prélèvement, transport et stockage des échantillons



ATTENTION

Manipuler tous les échantillons comme s'ils étaient des agents potentiellement infectieux.

- Des échantillons de sang total de 7 à 10 ml doivent être prélevés dans un tube Streck Cell-Free DNA BCT. Ne pas congeler.
- Le transport du sang total doit être conforme à toutes les réglementations applicables au transport des agents étiologiques. Les méthodes rapides d'expédition ou de transport sont recommandées.
- Pendant le transport, conservez à des températures comprises entre 4 °C et 30 °C. Une fois les échantillons reçus, conservez-les entre 2 °C et 8 °C jusqu'à ce qu'ils soient prêts à être utilisés. Le délai entre le prélèvement sanguin et l'isolement plasmatique initial ne doit pas dépasser 5 jours.
- Dans le cas où une nouvelle analyse est nécessaire, les échantillons post-traitement peuvent être rebouchés et conservés à 4 °C pendant 5 jours supplémentaires (jusqu'à un total de 10 jours après le prélèvement sanguin).

**ATTENTION**

L'exposition à des températures élevées supérieures aux plages susmentionnées peut avoir un impact négatif sur les taux d'échec des échantillons individuels et/ou sur les performances des échantillons.

Mises en garde et précautions

- Ce test comporte de la protéinase K. Des risques de lésions corporelles peuvent survenir par inhalation, ingestion, contact avec la peau et contact avec les yeux. L'utiliser dans un endroit bien aéré, porter des vêtements de protection, éviter de respirer la poussière et jeter les contenants et leurs contenus inutilisés conformément aux normes de sécurité gouvernementales applicables.
- Ce test contient du chlorure de guanidine. Des dommages corporels peuvent survenir en cas d'inhalation, d'ingestion, de contact avec la peau ou les yeux. L'utiliser dans un endroit bien aéré, porter des vêtements de protection et jeter tous les récipients et leurs contenus inutilisés conformément aux normes de sécurité gouvernementales locales en vigueur.
- Ce test contient du 2-propanol, un produit chimique inflammable. Le tenir loin des sources de chaleur ou de flammes libres. Des dommages corporels peuvent survenir en cas d'inhalation, d'ingestion, de contact avec la peau ou les yeux. L'utiliser dans un endroit bien aéré, porter des vêtements de protection et jeter tous les récipients et leurs contenus inutilisés conformément aux normes de sécurité gouvernementales locales en vigueur.
- Ce dosage contient du diméthylsulfoxyde, un liquide corrosif et combustible. Des dommages corporels peuvent survenir en cas d'inhalation, d'ingestion, de contact avec la peau ou les yeux. L'utiliser dans un endroit bien aéré, porter des vêtements de protection et jeter tous les récipients et leurs contenus inutilisés conformément aux normes de sécurité gouvernementales locales en vigueur.
- Pour éviter la formation de gaz nocifs, ne pas jeter les déchets d'extraction d'ADNlc (contenant du chlorhydrate de guanidine) avec des déchets contenant de l'eau de Javel (hypochlorite de sodium).
- Manipuler tout spécimen comme s'il était susceptible de contenir des agents potentiellement infectieux.
- Prendre les précautions de routine en laboratoire. Ne pas pipeter avec la bouche. Ne pas manger, boire ou fumer dans les espaces de travail identifiés. Porter des gants jetables et une blouse de laboratoire lors de la manipulation des échantillons et des réactifs de dosage. Se laver soigneusement les mains après avoir manipulé des échantillons et des réactifs de dosage.
- Ne pas utiliser de composant du test au-delà de la date de péremption indiquée sur l'étiquette du test. Ne pas échanger les composants du test de différents lots de test. Les lots de test sont identifiés sur l'étiquette de la boîte de test. Conserver les composants du test à la température spécifiée.
- Pour éviter la dégradation de l'échantillon ou du réactif, s'assurer que toutes les vapeurs d'hypochlorite de sodium provenant du nettoyage se sont complètement dissipées avant de commencer le protocole.
- Le non-respect des procédures spécifiées peut causer des résultats erronés ou une diminution significative de la qualité de l'échantillon.

- Signaler immédiatement tout incident grave relatif à ce produit à Illumina et aux Autorités compétentes des États membres dans lequel l'utilisateur et le patient sont établis.
- Pour de plus amples informations relatives à l'environnement, à la santé et à la sécurité, reportez-vous à la fiche de données de sécurité (FDS) à l'adresse support.illumina.com/sds.html.

Notes de procédure

Éviter les contaminations

- Utilisez des embouts de pipette et des consommables de laboratoire neufs.
- Utilisez des embouts résistants aux aérosols pour réduire le risque de contamination par transfert et de contamination croisée d'échantillon à échantillon.
- En raison du risque de contamination, veillez à ce que le contenu des puits reste entièrement dans les puits. Ne faites pas éclabousser le contenu. Centrifugez après chaque étape de mélange par vortex.
- Respectez les règles applicables en matière de pratiques de laboratoire et d'hygiène lors de la manipulation du sang et de ses dérivés.
- N'utilisez pas d'aérosols d'eau de Javel lors de la préparation de la banque. La contamination par des traces d'eau de Javel peut entraîner l'échec du test.
- Lors du descellement des plaques, veillez à placer la plaque sur une surface plane et solide, en la saisissant fermement. Retirez lentement l'opercule en vous assurant qu'il n'entre pas en contact avec les puits exposés. Veillez à ne pas toucher les puits exposés et à ne pas remuer le contenu. Une contamination croisée de puits à puits peut entraîner des résultats incorrects.

Nettoyage de la plateforme du système VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Avant utilisation, inspectez la plateforme pour s'assurer de sa propreté. Au moins une fois par semaine, effectuez l'entretien hebdomadaire et suivez ces instructions de nettoyage.
- Retirez tous les transporteurs déchargeables et nettoyez-les avec un spray désinfectant rapide à base d'alcool (eau désionisée et éthanol à 70 %) et laissez-les sécher. S'ils sont très sales, trempez-les ensuite dans une solution de détergent désinfectant, rincez avec le désinfectant à base d'alcool et laissez-les sécher.
- Ouvrez le couvercle avant et essuyez la plateforme avec un chiffon imprégné d'eau désionisée et d'éthanol à 70 %. La propreté des blocs coulissants en particulier doit être vérifiée.
- Retirez le collecteur du système de vide de base (BVS) et nettoyez le collecteur, le joint et les compartiments intérieurs du BVS avec un chiffon. Évitez de nettoyer le joint avec de l'éthanol car cela pourrait l'endommager.

- Videz la poubelle des embouts pour la tête CORE 96 et du canal indépendant.
- Retirez la plaque d'éjection des embouts du canal indépendant de la poubelle des embouts et nettoyez-la : vaporisez de l'eau désionisée et de l'éthanol à 70 % directement sur la surface et essuyez-la. Tirez un nouveau sac en plastique sur le cadre et fixez-le à nouveau. Remettez la plaque d'éjection d'embouts propre en place.
- Vaporisez de l'eau désionisée et de l'éthanol à 70 % directement sur la surface de la poubelle de la tête CORE 96 et de la goulotte, puis essuyez-la.
 - Si l'accumulation de débris dans la poubelle des embouts est difficile à éliminer, essuyez avec un chiffon imbibé d'eau exempte de DNase/RNase jusqu'à ce que les débris soient éliminés. Jetez le chiffon de manière appropriée. Passez à la stérilisation avec le désinfectant à base d'alcool.
- Humidifiez un chiffon non pelucheux ou un coton-tige avec de l'éthanol à 70 %. Passez un coton-tige sur la fenêtre du lecteur de codes-barres. À l'aide du même chiffon ou coton-tige, nettoyez chaque puits de l'adaptateur de plaque CPAC. Si vous utilisez un chiffon, en vous aidant d'un crayon, essuyez chaque puits de l'adaptateur pour vous assurer que l'intérieur du puits soit correctement nettoyé.
- Nettoyez les canaux indépendants :
 - Sur les canaux indépendants, nettoyez le manchon d'éjection des embouts (partie extérieure des canaux de pipetage) avec un chiffon non pelucheux imbibé d'eau désionisée et d'éthanol à 70 %. (Consultez *Hamilton Microlab STAR Reference Guide n° 15070074*.)
 - Nettoyez le disque d'arrêt et les joints toriques de la tête de pipetage (partie extérieure des canaux de pipetage) avec un chiffon non pelucheux imbibé d'eau désionisée et d'éthanol à 70 %.
- Nettoyez la tête CORE 96 :
 - À l'aide du même chiffon non pelucheux imbibé d'eau désionisée et d'éthanol à 70 %, nettoyez le boîtier de la tête CORE 96 et le bas des disques d'arrêt.
 - À l'aide du même chiffon ou d'une bout de chiffon déchiré imbibé d'eau désionisée et d'éthanol à 70 %, passez le chiffon sur les côtés des canaux de pipette de la tête CORE 96 afin de nettoyer les joints toriques. Répétez cette procédure pour chaque canal de pipette sur la tête CORE 96.
- Vaporisez les couvercles avant et latéral avec de l'eau désionisée et de l'éthanol à 70 %, puis essuyez-les.
- Nettoyez le ruban de protection du chargement automatique avec un chiffon imbibé d'eau déionisée et d'éthanol à 70 %, puis essuyez-le sans exercer de pression.
- Lorsque la plateforme et les composants sont complètement secs, remontez les transporteurs.

REMARQUE Un nettoyage et un entretien incorrects du ML STAR peuvent entraîner une contamination croisée et des performances de test médiocres.

Contrôle de la qualité

Le matériel de contrôle dont les caractéristiques de performance sont connues peut être évalué afin de détecter les différences dans le traitement et les procédures techniques en laboratoire.

L'analyse d'un échantillon de contrôle ou d'un contrôle sans matrice (NTC) réduit le nombre total d'échantillons maternels inconnus pouvant être traités avec chaque préparation d'échantillon.

Ne dépassez pas deux échantillons NTC par lot de 24 ou 48 échantillons ou quatre échantillons NTC par lot de 96 échantillons.

Instructions d'utilisation

Conseils et techniques

À moins qu'un point d'arrêt de sécurité ne soit spécifié dans le protocole, passez immédiatement à l'étape suivante.

Inscription de codes-barres sur les plaques

- Les codes-barres pour les plaques à jupe complète commencent par PL.
- Les codes-barres des plaques à puits profonds commencent par DW.
- Appliquez des codes-barres sur les plaques à jupe complète et les plaques à puits profonds sur le côté le long de la colonne 12.
- Chargez les plaques avec le code-barres orienté vers la droite pour permettre la lecture automatisée.

Scellement et descelllement de la plaque

- Prenez des précautions extrêmes pour éviter toute contamination croisée ; il ne doit pas y avoir de liquide visible sur la face inférieure de l'opercule.
 - Veillez à ce que le dessous exposé de l'opercule de scellement ne touche pas les puits exposés.
 - Prenez soin de ne pas toucher les puits exposés.
- Scellez toujours le plaque à 96 puits avant de passer aux étapes suivantes du protocole.
 - Étapes de centrifugation
 - Étapes du cyclage thermique
- Pour sceller la plaque, appliquez l'opercule en aluminium sur la plaque, puis scellez. Assurez-vous que la pression est appliquée sur toute la plaque et que l'opercule est bien scellé sur chaque puits individuel.
- Avant de desceller la plaque, procédez comme suit :
 - Centrifugez la plaque à 96 puits à 1 000 g pendant 20 secondes.
 - Placez la plaque sur une surface plane avant de retirer lentement l'opercule.

VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Avant toute utilisation, effectuez et documentez l'entretien requis conformément aux instructions du fabricant.
- Contrôlez le ML STAR pendant les étapes automatisées. Surveillez l'interface du logiciel VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 pour les invites et les instructions pour l'opérateur.

- Maintenez le couvercle avant en place pendant le fonctionnement.
- Maintenez la plateforme libre de tout objet pendant le fonctionnement.
- Si le bouton d'option **Exclude** (Exclure) s'affiche pendant un événement de gestion des erreurs, vous ne devez en aucun cas sélectionner cette option. Si la méthode ne peut pas passer au-delà de l'événement de gestion des erreurs ou propose des options de gestion des erreurs limitées, interrompez l'analyse.
- Pendant les étapes de vide de la plaque, si VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 vous y invite, aidez manuellement à former le scellement entre la plaque et le collecteur de vide.
- Laissez le système jeter automatiquement les embouts de l'adaptateur. Ne retirez pas manuellement les embouts à moins que le logiciel ne vous y invite.
- Retirez les réactifs et les consommables utilisés dès que Workflow Manager vous y invite.
- Videz quotidiennement les poubelles des déchets sous vide. La première poubelle ne doit jamais être remplie à plus de la moitié. Un débordement de déchets sous vide peut endommager la pompe à vide et réduire le vide appliqué au système.
- Pour les lots de 24, 48 et 96 échantillons, chargez un portoir complet d'embouts de pipette à 8 canaux comptés individuellement avant de commencer la préparation.

Traitement des échantillons

Procédure

1. Procédez comme suit pour chaque aliquote :
 - a. Centrifugez les échantillons ayant un code-barres à 1 600 g pendant 10 minutes à 4 °C, frein désactivé.
 - b. Retirez les tubes d'échantillons lorsque la centrifugeuse est complètement arrêtée.
Commencez l'isolement du plasma dans les 15 minutes qui suivent la centrifugation. Si plus de 15 minutes se sont écoulées, centrifugez à nouveau.
2. Inspectez chaque tube pour vérifier l'adéquation de l'échantillon en vérifiant les exigences suivantes :
 - Le volume d'échantillon est conforme aux attentes.
 - Une séparation nette entre les couches érythrocytaire et plasmatique des échantillons est visible après centrifugation.
 - Le niveau plasmatique est d'au moins 1,5 ml au-dessus de la couche leucocyto-plaquettaire.
 - L'échantillon n'est pas fortement hémolysé (c'est-à-dire que le plasma n'est pas rouge foncé en apparence).
 - L'échantillon n'est pas lipémique (c'est-à-dire que le plasma n'est pas blanc trouble ou opaque laiteux en apparence).
 - L'échantillon ne présente pas de coagulation.

**ATTENTION**

Les échantillons qui ont été stockés ou manipulés de manière incorrecte peuvent devenir inappropriés. Si des échantillons inappropriés sont traités, ils peuvent boucher la plaque de fixation pendant les extractions et provoquer un débordement des échantillons dans les puits adjacents.

3. Débouchez les tubes et chargez-les dans les transporteurs de tubes. Chargez tous les échantillons et tous les contrôles de plasma pour le lot.

**ATTENTION**

Lors d'un événement de gestion des erreurs, si l'option Exclude (Exclure) est présentée, ne la sélectionnez pas. Si la méthode ne peut pas passer au-delà de l'événement de gestion des erreurs et que vous disposez d'options de gestion des erreurs limitées, interrompez l'analyse.

Isolement du plasma

Préparation

1. Étiquetez 1 plaque à puits profonds Plasma intermédiaire et appliquez un code-barres.
2. Étiquetez 1 plaque à puits profonds Plasma final et appliquez un code-barres.
3. Pour les lots de 24, 48 et 96 échantillons, chargez un portoir complet d'embouts de pipette à 8 canaux comptés individuellement avant de commencer la préparation.

**ATTENTION**

Assurez-vous d'utiliser le type de plaque approprié pour les plaques Plasma intermédiaire et Plasma final. L'utilisation d'un réservoir à puits profonds au lieu d'une plaque à puits profonds entraînerait la fusion des échantillons et pourrait produire des résultats incorrects.

Procédure

1. Ouvrez le lanceur d'application AppLauncher, puis sélectionnez **VeriSeq NIPT Method**.
2. Saisissez une valeur pour Batch ID (ID de lot) unique et User name (Nom d'utilisateur), puis sélectionnez **OK**. Batch ID (ID de lot) peut contenir jusqu'à 26 caractères. Vous pouvez utiliser des chiffres, des lettres, des traits de soulignement (_) ou des tirets (-). Par exemple : 2025-10-16_Batch3.
L'ID du lot n'est pas sensible à la casse. Les ID de lots sensibles à la casse ne sont pas considérés comme uniques.
Les noms des lots doivent être uniques et ne doivent pas seulement se distinguer par l'utilisation des majuscules. Par exemple, Lot01 et lot01 ne sont pas des noms uniques. Cette même règle s'applique à la dénomination des ID d'échantillons.
3. Sélectionnez **New Batch** (Nouveau lot).
4. Après le lancement, sélectionnez **OK** pour commencer l'isolement du plasma.

5. Sélectionnez la taille du lot, puis sélectionnez **OK**.
6. Sélectionnez le nombre de contrôles sans matrice (NTC, No template controls), puis sélectionnez **OK**.
Les positions de NTC sont toujours les dernières positions sélectionnées. Par exemple, avec deux NTC dans une analyse de 24 échantillons, les positions 23 et 24 sont des NTC.
7. Effectuez l'une des opérations suivantes :
 - Pour charger une feuille d'échantillon existante, sélectionnez la feuille d'échantillon associée au lot, puis sélectionnez **OK**.
 - Pour continuer sans sélectionner de feuille d'échantillon, sélectionnez **No Sample Sheet** (Pas de feuille d'échantillon).

Pour plus d'informations sur la création d'un exemple de feuille, reportez-vous au *Guide du logiciel VeriSeq NIPT solution v2 (document n° 1000000067940)*.

REMARQUE Le type d'échantillon, simple ou gémellaire, doit être enregistré avec précision pour chaque échantillon afin de garantir une analyse correcte des données. Si vous choisissez **No Sample Sheet** (Aucune feuille d'échantillon), assurez-vous de définir les valeurs d'échantillon par défaut dans Workflow Manager Service Tools (Outils de service Workflow Manager). Consultez le *Guide du logiciel VeriSeq NIPT Solution v2 (document n° 1000000067940)* pour plus d'informations.

8. Vérifiez que tous les codes-barres sont apposés, puis chargez les échantillons, les embouts et les plaques (le code-barres étant orienté vers la droite) sur le transporteur.
9. Sélectionnez **OK** après chaque invite de chargement.

Taille du lot échantillon	Transporteur Type	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48, 96	Embout	7–12	Embouts de 1 000 µl	5
			Embouts de 1 000 µl (taille de lot 96 uniquement)	4, 5
	Tube	15	Tubes de prélèvement sanguin préparés 1–24 (pour toutes les tailles de lots)	1 à 24
	Tube	16	Tubes de prélèvement sanguin préparés 25–48 (tailles de lot 48 et 96 uniquement)	25–48
	Tube	17	Tubes d'échantillons de sang préparés 49–72 (taille de lot 96 uniquement)	49–72
	Tube	18	Tubes d'échantillons de sang préparés 73–96 (taille de lot 96 uniquement)	73–96
	Multiflex	19–24	Plaque vide à puits profonds de plasma final avec code-barres	4
	Multiflex	19–24	Plaque vide à puits profonds de plasma intermédiaire avec code-barres	5
	Réactif	47	[Facultatif] Solution saline dans un tampon phosphate de Dulbecco (DPBS) utilisée pour le contrôle sans matrice (NTC)	5

10. Assurez-vous que les transporteurs, le matériel de laboratoire et les réactifs sont correctement chargés.
11. Sur l'écran Pre-Spin Deck Verification (Vérification de la plateforme avant centrifugation), sélectionnez **OK**.
12. Contrôlez le ML STAR exécuter les étapes automatisées.
13. Lorsque Workflow Manager vous y invite, assurez-vous que la plateforme de chargement du ML STAR soit libre pour lui permettre de décharger les transporteurs.
14. Sélectionnez **Unload** (Décharger) pour décharger la plateforme.
15. Retirez la plaque à puits profonds de plasma intermédiaire comme suit.
 - a. Inspectez la plaque pour vérifier que les volumes sont uniformes dans chaque puits (pas d'erreur de pipetage). Le volume attendu est de 1 000 µl.
 - b. Notez toute incohérence lorsque la procédure d'isolement du plasma est terminée.
 - c. Scellez la plaque, chargez, équilibrez et centrifugez à 5 600 g pendant 10 minutes avec le frein désactivé ou sur le réglage le plus bas.
16. Sélectionnez **Yes** (Oui) pour passer à la préparation du plasma final.

17. Retirez l'opercule de la plaque et rechargez la plaque sur le transporteur.

Taille du lot échantillon	Transporteur Type	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Plaque à puits profonds de plasma intermédiaire	5

18. Cochez la case **Intermediate plasma plate has been spun** (La plaque de plasma intermédiaire a été centrifugée), puis sélectionnez **OK**.

19. Contrôlez le ML STAR exécuter les étapes automatisées.

20. Lorsque Workflow Manager vous y invite, assurez-vous que la plateforme de chargement du ML STAR soit libre pour permettre au ML STAR de décharger les transporteurs.

21. Sélectionnez **Unload** (Décharger) pour décharger la plateforme.

22. Lorsque Workflow Manager vous y invite, videz les transporteurs et la plateforme.

23. Retirez la plaque à puits profonds de plasma final.

24. Vérifiez que la plaque ne présente pas les erreurs suivantes :

- Volumes incohérents dans chaque puits. Le volume attendu est de 900 µl.
- Des culots de cellules sont visibles.
- Hémolyse excessive.

Si vous observez des culots anormaux de cellules ou une hémolyse excessive, invalidez l'échantillon affecté à la fin de la méthode d'isolement du plasma ou utilisez Batch Manager. Pour obtenir plus de renseignements sur Batch Manager, consultez le *Guide du logiciel VeriSeq NIPT Solution v2 (document n° 1000000067940)*.

25. Lorsque Workflow Manager vous y invite, sélectionnez **OK**.

26. Entrez des commentaires sur les puits affectés, puis sélectionnez **OK**.

27. Effectuez l'une des opérations suivantes :

- Pour continuer à l'extraction d'ADNlc, sélectionnez **Yes** (Oui).
- Pour arrêter, sélectionnez **Exit** (Quitter).

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Si vous arrêtez, scellez la plaque Plasma final et stockez-la à une température comprise entre 2 °C et 8 °C pendant 7 jours au maximum.

Extraction d'ADNlc

Préparation

1. Examinez visuellement les boîtes d'extraction et d'accessoires pour confirmer que le kit n'est pas périmé.

2. Préparez les réactifs suivants. Étiquetez les tubes réservoirs et les réservoirs du puits profond avec le nom des réactifs.

Réactif	Stockage	Instructions
Plaque à puits profonds de plasma finale	2 °C à 8 °C	Si elle a été conservée, laissez-la reposer 30 minutes pour la ramener à température ambiante. Centrifugez la plaque à 1 000 × g pendant 20 secondes. Descellez la plaque à puits profonds de plasma final avant de l'utiliser.

3. Ajoutez lentement 3,75 ml de tampon protéinase à chaque flacon de réactif de protéinase K.

- Préparez 3 flacons pour 24 et 48 échantillons.
- Préparez 4 flacons pour 96 échantillons.

4. Bouchez les flacons de protéinase K et agitez au vortex jusqu'à la remise en suspension.



ATTENTION

Ne contaminez pas le bouchon en caoutchouc. S'il entre en contact avec d'autres substances, le bouchon de caoutchouc peut contaminer d'autres échantillons.

5. Regroupez la protéinase K préparée de tous les flacons dans un tube de réactif et étiquetez-le comme protéinase K.
6. Ajoutez 100 ml d'EtOH à 100 % dans chaque flacon de réactif du tampon de lavage II.
- Préparez 1 flacon pour 24 et 48 échantillons.
 - Préparez 2 flacons pour 96 échantillons.
7. Retournez les flacons de tampon de lavage II pour mélanger.
8. Cochez les cases des flacons de tampon de lavage II.
9. Étiquetez « Intermédiaire » une nouvelle plaque à jupe complète et appliquez un code-barres sur la plaque.
10. Étiquetez « Élu­tion d'ADNc » une nouvelle plaque à jupe complète et appliquez un code-barres sur la plaque.
11. Étiquetez 1 « Extraction intermédiaire » une nouvelle plaque à puits profonds et appliquez un code-barres sur la plaque.
12. Appliquez un code-barres sur la plaque de fixation de l'ADN.
13. Appliquez un opercule en aluminium sur les puits inutilisés pour les lots de 24 et 48 échantillons.
14. Préparez une solution de nettoyage d'EtOH à 70 % (70 % EtOH et 30 % eau sans DNase/RNase) pour nettoyer le système de vide.

15. Préparez le système de vide comme suit.
 - a. Retirez le collecteur de vide et nettoyez-le avec l'EtOH à 70 %.
Évitez de nettoyer le joint avec de l'EtOH car cela pourrait l'endommager.
 - b. Videz la poubelle du système d'aspiration.
 - c. Assurez-vous que le système de vide ML STAR est activé.

Procédure

1. Sélectionnez **OK** pour démarrer l'extraction d'ADNlc.
2. Si **VeriSeq NIPT Method** n'est pas ouvert :
 - a. Ouvrez le lanceur d'application AppLauncher, puis sélectionnez **VeriSeq NIPT Method**.
 - b. Saisissez une valeur pour Batch ID (ID de lot) et User name (Nom d'utilisateur), puis sélectionnez **OK**.
3. Chargez les embouts sur les transporteurs d'embouts comme suit, puis sélectionnez **OK**.



ATTENTION

Avant de commencer la méthode pour les lots de 24, 48 et 96 échantillons, ajoutez un portoir complet d'embouts pour pipettes à 8 canaux.

Taille du lot échantillon	Type de transporteur	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24	Embout	1–6	Embouts de 1 000 µl	1
		7–12	Embouts de 300 µl	1
48	Embout	1–6	Embouts de 1 000 µl	1, 2
		7–12	Embouts de 300 µl	1
96	Embout	1–6	Embouts de 1 000 µl	1, 2, 3, 4
		7–12	Embouts de 300 µl	1

4. Chargez les embouts comptés sur les transporteurs d'embouts comme suit.

Taille du lot échantillon	Type de transporteur	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48, 96	Embout	49–54	Embouts de 1 000 µl	1
			Embouts de 300 µl	2
			Embouts de 50 µl	3

5. Entrez l'emplacement des premier et dernier embouts pour chaque portoir d'embouts, puis sélectionnez **OK**.

6. Scannez les codes-barres de la boîte d'extraction.
7. Saisissez le nom d'utilisateur ou les initiales de l'opérateur, puis sélectionnez **OK**.
8. Scannez les codes-barres de la boîte d'accessoires.
9. Saisissez le nom d'utilisateur ou les initiales de l'opérateur, puis sélectionnez **OK**.
10. Vérifiez que les codes-barres sont apposés.
11. Descellez la plaque à puits profonds de plasma final si nécessaire.
12. Chargez les plaques (code-barres orienté vers la droite) sur le porte-plaques comme suit, puis sélectionnez **OK**.

Taille du lot échantillon	Type de transporteur	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Nouvelle plaque à jupe complète, intermédiaire, avec code-barres	1
			Nouvelle plaque à jupe complète, élution d'ADNlc, avec code-barres	2
			Nouvelle plaque à puits profonds, extraction intermédiaire, avec code-barres	4
			Plaque à puits profonds de plasma final, avec code-barres	5

13. Confirmez que la plaque de fixation de l'ADN possède un code-barres, puis sélectionnez **OK**.
14. Pour les lots de plaques partiels, appliquez un opercule de plaque découpé sur les puits inutilisés (colonnes 4 à 12 pour les lots de 24 échantillons et colonnes 7 à 12 pour les lots de 48 échantillons).
15. Chargez la plaque de fixation de l'ADN sur le collecteur de vide en orientant le code-barres vers la droite.
16. Avant de placer la plaque de fixation sur le collecteur BVS, inspectez visuellement les puits pour détecter la présence d'éventuelles obstructions.
Cela peut gêner l'écoulement des réactifs sous vide.
17. En cas d'utilisation de lots de 24 ou 48 échantillons, couvrez les puits inutilisés et scellez-les avec un opercule en aluminium. Cochez la case **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (La plaque de fixation à l'ADN est-elle scellée ?), puis sélectionnez **OK**

18. Chargez les tubes de réactifs sur les transporteurs de réactifs comme suit, puis sélectionnez **OK**.

Taille du lot échantillon	Type de transporteur	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48	Réactif	47	Tampon d'éluion, 16 ml	1
			Protéinase K, 11 ml	2
96	Réactif	47	Tampon d'éluion, 16 ml	1
			Protéinase K, 15ml	2

19. Transférez les réactifs spécifiés dans les réservoirs à puits profonds, puis chargez les réservoirs sur les transporteurs de puits profonds comme suit.

20. Sélectionnez **OK**.

Taille du lot échantillon	Type de transporteur	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48	Puits profond	39–44	Tampon de lavage II, 125 ml	1
			Tampon de lavage I, 125 ml	2
			EtOH à 100 %, 60 ml	3
			Tampon de lyse, 100 ml	4
			Eau sans DNase/RNase, 60 ml	5
96	Puits profond	39–44	Tampon de lavage II, 200 ml	1
			Tampon de lavage I, 125ml	2
			EtOH à 100 %, 100 ml	3
			Tampon de lyse, 100ml	4
			Eau sans DNase/RNase, 100ml	5

21. Attendez la fin de la vérification automatique du volume de réactif.

22. Vérifiez que la poubelle du système de vide soit vidée (il est recommandé qu'elle soit vidée à moitié), puis sélectionnez **OK**.

23. Confirmez le positionnement de tous les transporteurs, matériel de laboratoire et réactifs, puis sélectionnez **OK** dans l'écran Extraction Deck Verification (Vérification de la plateforme d'extraction).

24. Contrôlez le ML STAR pendant les étapes automatisées.



ATTENTION

Vous devez invalider manuellement les débordements d'échantillons non détectés par le système avant la contamination des puits voisins.

25. Après la dernière étape de vide, retirez la plaque de fixation de l'ADN et nettoyez la surface inférieure avec de l'EtOH à 70 %.

26. Scellez tous les puits découverts sur la plaque de fixation de l'ADN, puis placez-la sur la plaque à puits profonds de plasma final vide.
27. Centrifugez l'ensemble plaque de fixation de l'ADN/plaque de plasma final à 5 600 g pendant 10 minutes avec le frein activé.
28. Sélectionnez **OK**.
29. Pendant la centrifugation de la plaque de fixation de l'ADN, effectuez le nettoyage du système de vide :
 - a. Retirez le collecteur de vide, puis sélectionnez **OK**.
 - b. Attendez la fin de l'élimination automatisée des déchets.
 - c. Nettoyez le collecteur et l'intérieur du système de vide avec de l'EtOH à 70 %, puis remplacez le collecteur.
 - d. Cochez la case **Manifold is on Vacuum** (Collecteur sous vide) pour lancer le transfert de la plaque d'élution sur le collecteur de vide, puis sélectionnez **OK**.
30. Après centrifugation, descellez les puits contenant les échantillons sur la plaque de fixation de l'ADN.
31. Placez la plaque de fixation à l'ADN sur la plaque d'élution d'ADNIc qui se trouve sur le collecteur de vide.
32. Chargez la plaque de fixation de l'ADN avec le code-barres vers la droite, puis sélectionnez **OK**.
33. Contrôlez le ML STAR pendant les étapes automatisées.
34. Après l'étape d'incubation, cochez la case **Plates are assembled as indicated** (Les plaques sont assemblées comme indiqué). Vérifiez que l'ensemble plaque de fixation de l'ADN/élution d'ADNIc est sur une base de support (si la centrifugeuse l'exige).
35. Scellez les puits découverts sur la plaque de fixation de l'ADN.
36. Centrifugez à 5 600 g pendant 2 minutes avec le frein activé, puis sélectionnez **OK**.
37. Inspectez visuellement la plaque d'élution d'ADNIc pour vérifier la cohérence des volumes dans chaque puits.

Le volume attendu est d'environ 55 µl.
38. Scellez et conservez la plaque d'élution d'ADNIc pour la préparation de la banque.
39. Lorsque Workflow Manager vous y invite, assurez-vous que la plateforme de chargement du ML STAR soit libre pour permettre au ML STAR de décharger les transporteurs.
40. Sélectionnez **Unload** (Décharger) pour décharger la plateforme.
41. Déchargez tous les transporteurs et nettoyez la plateforme du ML STAR, puis sélectionnez **OK**.
42. Entrez des commentaires sur les puits affectés, puis sélectionnez **OK**.
43. Effectuez l'une des opérations suivantes :
 - Pour continuer à préparer les banques, sélectionnez **Yes** (Oui).
 - Pour arrêter, sélectionnez **Exit** (Quitter).

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Si vous arrêtez, scellez la plaque Élution d'ADNIc et stockez-la à une température comprise entre -25 °C et -15 °C pendant 7 jours au maximum.

Préparation des banques

Préparation

1. Contrôlez les boîtes de préparation des banques et des accessoires pour vous assurer que les kits ne sont pas périmés.
2. Préparez les réactifs suivants. Étiquetez les tubes réservoirs et les réservoirs à puits profond avec le nom des réactifs.

Réactif	Stockage	Instructions
A-Tailing Mix (Mélange d'extension et de ligation)	-25 °C à -15 °C	Décongelez à température ambiante. Agitez au vortex pour mélanger, puis centrifugez brièvement.
cfDNA Elution Plate (Plaque d'éluion d'ADNIc)	-25 °C à -15 °C	Si elle a été stockée, vérifiez que la plaque n'a pas été conservée plus de 7 jours et décongelez à température ambiante. Agitez au vortex à 1 500 tr/min. pendant 1 minute. Centrifugez la plaque à 1 000 g pendant 20 secondes.
End Repair Mix (Mélange de réparation des extrémités)	-25 °C à -15 °C	Décongelez à température ambiante. Agitez au vortex pour mélanger.
Hybridization Buffer (Tampon d'hybridation)	-25 °C à -15 °C	Décongelez à température ambiante. Agitez au vortex pour mélanger. Remettez au congélateur après utilisation.
Ligation Mix (Mélange de ligation)	-25 °C à -15 °C	Décongelez à température ambiante. Agitez au vortex pour mélanger, puis centrifugez brièvement.
NIPT DNA Adapter Plate (Plaque adaptateur d'ADN pour NIPT)	-25 °C à -15 °C	Décongelez à température ambiante. Agitez au vortex pour mélanger. Centrifugez la plaque à 1 000 g pendant 20 secondes.
Resuspension Buffer (Tampon de remise en suspension)	2 °C à 8 °C	Agitez au vortex pour mélanger. Remettez au congélateur après utilisation.
Sample Purification Beads (Billes de purification d'échantillon)	2 °C à 8 °C	Laissez reposer pendant 30 minutes pour porter à température ambiante. Agitez au vortex vigoureusement avant chaque utilisation. Agitez au vortex pour mélanger ou inversez jusqu'à ce que toutes les billes soient en suspension et que le mélange soit homogène.

**ATTENTION**

Lors du descellement de la plaque d'adaptateur d'ADN pour NIPT, prenez des précautions extrêmes pour éviter toute contamination croisée d'aérosol entre les puits, qui pourrait engendrer des résultats incorrects.

3. Si la plaque d'éluion d'ADNlc a été stockée congelée, préparez-la comme suit.
 - a. Décongelez à température ambiante.
 - b. Agitez au vortex à 1500 tr/min. pendant 1 minute.
 - c. Centrifugez la plaque à 1 000 g pendant 20 secondes.
4. Étiquetez une nouvelle plaque à jupe complète Banques et appliquez un code-barres de plaque.
5. Préparez de l'EtOH à 80 % à partir d'EtOH absolu. Mélangez 40 ml d'EtOH à 100 % et 10 ml d'eau sans DNase/RNase. Retournez pour mélanger.
6. Assurez-vous que le contrôle thermique du ML STAR soit activé.

Dilution des enzymes

1. Combinez le mélange d'extension et de ligation et le tampon de remise en suspension dans un tube avec bouchon à vis. Agitez au vortex pour mélanger, puis centrifugez brièvement.

Taille du lot échantillon	Mélange d'extension et de ligation (µl)	Tampon de remise en suspension (µl)
24, 48	900	1 200
96	1 800	2 400

2. Combinez le mélange de ligation et le tampon de remise en suspension dans un tube avec bouchon à vis. Agitez au vortex pour mélanger, puis centrifugez brièvement.

Taille du lot échantillon	Mélange de ligation (µl)	Tampon de remise en suspension (µl)
24, 48	230	1 713
96	440	3 278

Procédure

1. Sélectionnez **OK** pour démarrer la préparation de la banque. Si **VeriSeq NIPT Method** n'est pas déjà ouvert :
 - a. Ouvrez le lanceur d'application AppLauncher et sélectionnez **VeriSeq NIPT Method**.
 - b. Saisissez une valeur pour Batch ID (ID de lot) et User name (Nom d'utilisateur), puis sélectionnez **OK**.
2. Vérifiez que les consommables suivants sont préparés, comme indiqué dans l'écran Reagent Preparation (Préparation du réactif) :
 - A-Tailing Mix (Mélange d'extension et de ligation), Ligation Mix (Mélange de ligation) et EtOH à 80 %.

- Sample Purification Beads (Billes de purification d'échantillon), End Repair Mix (Mélange de réparation des extrémités) et NIPT DNA Adapter Plate (Plaque adaptatrice d'ADN pour NIPT).
3. Cochez les cases, puis sélectionnez **OK**.
 4. Scannez les codes-barres de la boîte de préparation de la banque.
 5. Saisissez le nom d'utilisateur ou les initiales de l'opérateur, puis sélectionnez **OK**.
 6. Scannez les codes-barres de la boîte d'accessoires.
 7. Saisissez le nom d'utilisateur ou les initiales de l'opérateur, puis sélectionnez **OK**.
 8. Chargez les embouts sur les transporteurs d'embouts comme suit, puis sélectionnez **OK** pour chaque transporteur.

Taille du lot échantillon	Type de transporteur	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24	Embout	1 à 6	Embouts de 50 µl	1
		7 à 12	Embouts de 300 µl	1, 2
48	Embout	1 à 6	Embouts de 50 µl	1, 2
		7 à 12	Embouts de 300 µl	1, 2, 3, 4
96	Embout	1 à 6	Embouts de 50 µl	1, 2, 3, 4
		7 à 12	Embouts de 300 µl	1, 2, 3, 4, 5

9. Si vous avez arrêté le protocole après la procédure d'extraction d'ADNlc, chargez les embouts comptés sur les transporteurs d'embouts comme suit.

Taille du lot échantillon	Type de transporteur	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48, 96	Embout	49 à 54	Embouts de 1 000 µl	1
			Embouts de 300 µl	2
			Embouts de 50 µl	3

10. Entrez l'emplacement du premier et du dernier embout pour chaque portoir d'embouts, puis sélectionnez **OK**.

11. Confirmez que les codes-barres sont collés, chargez les plaques (code-barres orienté vers la droite) sur le porte-plaques comme suit, puis sélectionnez **OK**.

Taille du lot échantillon	Type de transporteur	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48 , 96	Multiflex	19 à 24	cfDNA Elution Plate (Plaque d'éluion d'ADNlc) avec code-barres	1
			NIPT DNA Adapter Plate (Plaque adaptatrice d'ADN pour NIPT) avec code-barres	2
			Nouvelle plaque 96 puits à jupe complète, pour banques, avec code-barres	3
			Nouvelle plaque 96 puits à jupe complète	4, 5

12. Chargez le transporteur à puits profonds, comme suit, puis sélectionnez **OK**.

Taille du lot échantillon	Type de transporteur	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48 , 96	Puits profond	39 à 44	50 ml d'EtOH à 80 % dans un réservoir à puits profonds	1
			Nouvelle plaque 96 puits à jupe complète	2, 3, 4, 5

13. Chargez les tubes de réactifs sur les transporteurs de réactifs comme suit, puis sélectionnez **OK**.

Taille du lot échantillon	Type de transporteur	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48 , 96	Réactif	47	End Repair Mix (Mélange de réparation des extrémités) 2,5 ml	1
			A-Tailing Mix (Mélange d'extension et de ligation) préparé (volume total)	2
			Ligation Mix (Mélange de ligation) préparé (volume total)	3
			Sample Purification Beads (Billes de purification d'échantillon) 10 ml	4
			Hybridization Buffer (Tampon d'hybridation) 12 ml	5

14. Conservez le reste des 12 ml du tampon d'hybridation (HT1) dans le conteneur pour le regroupement.
15. Assurez-vous que les transporteurs, le matériel de laboratoire et les réactifs sont chargés comme indiqué, puis sélectionnez **OK** dans l'écran Library Deck Verification (Vérification de la plateforme de banque).
16. Attendez la fin de la vérification automatique du volume de réactif.
17. Contrôlez le ML STAR pendant les étapes automatisées.
18. Lorsque Workflow Manager vous y invite, assurez-vous que la plateforme de chargement du ML STAR soit libre pour permettre au ML STAR de décharger les transporteurs.
19. Sélectionnez **Unload** (Décharger) pour décharger la plateforme.
20. Inspectez la plaque de banques pour vérifier que les volumes dans chaque puits soient uniformes.



ATTENTION

Si les volumes des puits sont incohérents, les échantillons peuvent échouer au contrôle de qualité automatisé.

21. En cas de stockage, scellez et conservez la plaque de banques.
22. Déchargez tous les transporteurs, nettoyez la plateforme, puis sélectionnez **OK**.
23. Entrez des commentaires sur les puits affectés, puis sélectionnez **OK**.
24. Effectuez l'une des opérations suivantes :
 - Pour passer à la quantification les banques, sélectionnez **Yes** (Oui).
 - Pour arrêter, sélectionnez **Exit** (Quitter).

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Si vous vous arrêtez, scellez la plaque Banques avant de la stocker. La plaque Banques est stable jusqu'à 7 jours à partir de la date de préparation entre -25 °C et -15 °C.

Quantification des banques

Préparation

1. Préparez les réactifs suivants :

Réactif	Stockage	Instructions
DNA Quantification Reagent (Réactif de quantification de l'ADN)	2 °C à 8 °C	Tenir à l'abri de la lumière. Décongelez à température ambiante pendant 30 à 150 minutes. (Il est recommandé de retirer le réactif au début de la procédure de préparation des banques.) Agitez au vortex pour mélanger, puis centrifugez brièvement.
DNA Quantification Standard (Standard de quantification de l'ADN)	2 °C à 8 °C	Agitez au vortex pour mélanger, puis centrifugez brièvement.
Resuspension Buffer (Tampon de remise en suspension)	2 °C à 8 °C	Agitez au vortex pour mélanger.

2. Si la plaque de banques a été stockée congelée, préparez-la comme suit.
 - a. Vérifiez que la plaque n'a pas été conservée plus de 7 jours et décongelez à température ambiante.
 - b. Agitez au vortex.
 - c. Centrifugez à 1 000 g pendant 1 minute.
3. Allumez le fluorimètre 10 minutes avant de l'utiliser.
4. Appliquez un code-barres sur une nouvelle plaque de 384 puits.
5. Appliquez un code-barres sur une nouvelle plaque à jupe complète.

Procédure

1. Sélectionnez **OK** pour démarrer la quantification.
2. Si VeriSeq NIPT Method n'est pas déjà ouverte :
 - a. Ouvrez le lanceur d'application AppLauncher et sélectionnez **VeriSeq NIPT Method**.
 - b. Saisissez une valeur pour Batch ID (ID de lot) et User name (Nom d'utilisateur), puis sélectionnez **OK**.
3. Scannez les codes-barres de la boîte d'accessoires.
4. Saisissez le nom d'utilisateur ou les initiales de l'opérateur, puis sélectionnez **OK**.

5. Chargez les embouts sur les transporteurs d'embouts comme suit, puis sélectionnez **OK**.

Taille du lot échantillon	Transporteur Type	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48	Embout	1 à 6	Portoir d'embouts de 300 µl	1
			Portoir d'embouts de 50 µl	2
96	Embout	1 à 6	Portoir d'embouts de 300 µl	1
			Portoir d'embouts de 50 µl	2, 3

6. Vérifiez que les codes-barres sont apposés.
 7. Si nécessaire, descellez la plaque de banques.
 8. Chargez les plaques (code-barres orienté vers la droite) sur le transporteur de plaques comme suit, puis sélectionnez **OK**.

Taille du lot échantillon	Transporteur Type	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48, 96	Multiflex	19 à 24	Nouvelle plaque à jupe complète, avec code-barres	1
			Nouvelle plaque 384 puits, avec code-barres	2
			Plaque de banques, avec code-barres	3
			Nouvelle plaque 96 puits à jupe complète	4, 5

9. Chargez les tubes de réactifs sans bouchon sur les transporteurs de tubes comme suit, puis sélectionnez **OK**.

Taille du lot échantillon	Transporteur Type	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48, 96	Tube	46	DNA Quantification Standard (Standard de quantification de l'ADN)	1
			DNA Quantification Reagent (Réactif de quantification de l'ADN)	2

10. Chargez les tubes de réactifs sur les transporteurs de réactifs comme suit, puis sélectionnez **OK**.

Taille du lot échantillon	Transporteur Type	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48, 96	Réactif	47	Nouveau tube de réactif (vide)	1
			Tampon de remise en suspension, 16 ml	2

11. Si vous avez arrêté le protocole après la procédure de préparation des banques, chargez les embouts comptés sur les transporteurs d'embouts comme suit.

Taille du lot échantillon	Transporteur Type	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48, 96	Embout	49 à 54	Embouts de 1 000 µl	1
			Embouts de 300 µl	2
			Embouts de 50 µl	3

12. Entrez l'emplacement des premier et dernier embouts pour chaque portoir d'embouts, puis sélectionnez **OK**.
13. Assurez-vous que les transporteurs, le matériel de laboratoire et les réactifs sont chargés comme indiqué, puis sélectionnez **OK** dans l'écran Quant Deck Verification (Vérification de la plateforme de quantification).
14. Attendez la fin de la vérification automatique du volume de réactif.
15. Contrôlez le ML STAR pendant les étapes automatisées.
16. Lorsque Workflow Manager vous y invite, assurez-vous que la plateforme de chargement du ML STAR soit libre pour permettre au ML STAR de décharger les transporteurs.
17. Sélectionnez **Unload** (Décharger) pour décharger la plateforme.
18. Déchargez la plaque de banques.
- Inspectez la plaque pour vérifier que les volumes d'un puits à l'autre sont uniformes.
 - Scellez la plaque de banques et stockez-la à température ambiante jusqu'à ce que l'analyse des données fluorométriques soit terminée.
19. Déchargez les plaques de 96 puits restantes et vérifiez que les volumes soient uniformes d'un puits à l'autre.
- Des erreurs grossières de volume peuvent indiquer un problème avec les étapes de pipetage.
20. Déchargez la plaque de 384 puits et vérifiez la présence de liquide dans les puits appropriés.
21. Scellez la plaque avec un opercule en aluminium.
22. Centrifugez la plaque à 1 000 g pendant 20 secondes.
23. Incubez à température ambiante pendant 10 minutes, à l'abri de la lumière.
24. Déchargez tous les transporteurs.
25. Nettoyez la plateforme du ML STAR, puis sélectionnez **OK**.

**ATTENTION**

Ne jetez pas les réactifs de quantification tant que les données ne sont pas disponibles. Vous aurez besoin des réactifs si vous devez requantifier.

26. Après incubation, retirez l'opercule en aluminium et chargez la plaque de 384 puits sur le lecteur de microplaques. Veillez à utiliser la plaque d'adaptation violette (référence : 0310-4336) fournie par Molecular Devices ou équivalent, le cas échéant, selon l'instrument utilisé.
 - Assurez-vous que A1 se trouve dans le coin supérieur gauche lors du chargement.
27. Double-cliquez sur le modèle VeriSeq NIPT pour l'ouvrir dans SoftMax Pro.
28. Sélectionnez **New Experiment** (Nouvelle expérience) dans l'onglet **Home** (Accueil).
29. Sélectionnez **Read** (Lire).
30. Exportez les données au format XML comme suit.
 - a. Sélectionnez **Plate** (Plaque) avec le bouton droit de la souris, puis **Renamne** (Renommer).
 - b. Scannez le code-barres de la plaque de quantification, puis sélectionnez **OK**.
 - c. Dans le coin supérieur gauche de l'écran, sélectionnez l'icône de plaque, puis sélectionnez **Export** (Exporter) dans le menu.
 - d. Cochez la case **Expt name** (Nom d'exportation), définissez l'option de date de plaque sur **Raw** (Brut), définissez le format de sortie sur XML, puis sélectionnez **OK**.
 - e. Définissez le chemin et le nom du fichier de sortie, puis sélectionnez **Save** (Enregistrer).L'ordinateur Hamilton doit pouvoir accéder à l'emplacement du fichier. N'utilisez pas d'espaces dans le nom ou le chemin du fichier.

Analyse

1. Sur l'écran **Scanner Information** (Informations du scanner) du ML STAR, saisissez l'ID du fluorimètre.
2. Entrez les commentaires sur l'analyse du fluorimètre, puis sélectionnez **OK**.
3. Naviguez jusqu'au fichier de quantification *.xml qui contient les données fluorométriques, puis sélectionnez **OK**.
4. Examinez la courbe d'étalonnage et les résultats de l'analyse de la concentration de l'échantillon, puis sélectionnez **OK**.
5. Si vous devez scanner à nouveau la plaque, sélectionnez **Rescan** (Scanner à nouveau).

Les échantillons ont une durée de vie limitée et ils sont sensibles à la lumière. Lorsque nécessaire, scannez à nouveau immédiatement.
6. Entrez des commentaires sur les puits affectés, puis sélectionnez **OK**.

7. Évaluez les résultats et procédez comme suit.
 - Si les résultats sont conformes à la spécification, passez à [Regroupement des banques à la page 42](#) (Regroupement des banques). Pour connaître les spécifications, reportez-vous au tableau des mesures et des limites du CQ de quantification dans le *Guide du logiciel de VeriSeq NIPT Solution v2 (document n° 1000000067940)*.
 - Si les résultats ne sont pas conformes à la spécification, le système abandonne la méthode. Répétez les procédures de quantification en commençant par [Préparation à la page 38](#).
8. Effectuez l'une des opérations suivantes :
 - Pour passer à l'étape [Regroupement des banques à la page 42](#), sélectionnez **Yes** (Oui).
 - Pour arrêter, sélectionnez **Exit** (Quitter).

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Si vous vous arrêtez, scellez la Plaque Banques avant de la stocker. La plaque Banques est stable jusqu'à 7 jours à partir de la date de préparation entre -25 °C et -15 °C.

Regroupement des banques

Préparation

1. Préparez les réactifs suivants :

Réactif	Stockage	Instructions
Hybridization Buffer (Tampon d'hybridation)	-25 °C à -15 °C	Décongelez à température ambiante. Agitez au vortex pour mélanger. Remettez au congélateur après utilisation.

2. Si la plaque de banques a été stockée congelée, préparez-la comme suit.
 - a. Vérifiez que la plaque n'a pas été conservée plus de 7 jours et décongelez à température ambiante.
 - b. Agitez au vortex à 1 500 tr/min. pendant 1 minute.
 - c. Centrifugez la plaque à 1 000 g pendant 20 secondes.
 - d. Pipettez pour mélanger.
3. Étiquetez un tube de regroupement vide « Pool A ». Pour 96 échantillons, étiquetez un deuxième tube de regroupement vide « Pool B ».
4. Enregistrez le programme de dénaturation suivant sur le thermocycleur muni d'un couvercle chauffant.
 - a. Choisissez l'option « Preheated lid » (Couvercle préchauffé) et réglez sur 102 °C.
 - b. Réglez le volume de réaction sur 50 µl.
 - c. Réglez la vitesse de rampe au maximum (≥ 2 °C par seconde).
 - d. Incubez à 96 °C pendant 10 minutes, puis à 4 °C pendant 5 secondes.
 - e. Maintenez à 4 °C.

Procédure

- Placez la plaque de banques sur le thermocycleur préprogrammé et lancez le programme de dénaturation. Ne dénaturez pas la plaque de banques avant que la quantification n'ait réussi les mesures de CQ, car vous souhaitez peut-être procéder à une nouvelle quantification.
- Centrifugez la plaque de banques à 1 000 g pendant 20 secondes.
- Sélectionnez **OK** pour démarrer le regroupement des banques.
- Si VeriSeq NIPT Method n'est pas ouvert :
 - Ouvrez le lanceur d'application AppLauncher et sélectionnez **VeriSeq NIPT Method**.
 - Saisissez une valeur pour **Batch ID** (ID de lot) et **User name** (Nom d'utilisateur), puis sélectionnez **OK**.
- Sélectionnez la concentration du regroupement, puis sélectionnez **OK**.
La densité cible de l'amplifiat est de 220–260 K/mm².

REMARQUE Il peut être nécessaire d'augmenter les concentrations et/ou les volumes de regroupement pour les lots de 24 échantillons afin de maintenir des densités d'amplifiat similaires à celles obtenues avec des lots de 48/96 échantillons.

- Si vous y êtes invité par Workflow Manager, effectuez l'une des opérations suivantes :
 - Pour charger une feuille d'échantillon, sélectionnez la feuille d'échantillon associée au lot, puis sélectionnez **Load** (Charger).
 - Pour utiliser les valeurs par défaut du système pour les types d'échantillons restants, les rapports sur le sexe ou le type de dépistage, sélectionnez **Use Default** (Utiliser les valeurs par défaut) pour chaque paramètre.
Pour plus d'informations sur la création d'une feuille d'échantillon, reportez-vous au *Guide du logiciel VeriSeq NIPT Solution v2 (document n° 1000000067940)*.
- Sélectionnez **Start** (Démarrer) pour lancer la minuterie pour la dénaturation de la plaque.
- Chargez les embouts sur les transporteurs d'embouts comme suit.

Taille du lot échantillon	Transporteur Type	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48, 96	Embout	7–12	Embouts avec filtre de 50 µl	1

- Chargez les plaques de banques dénaturées (code-barres orienté vers la droite) sur le transporteur Multiflex comme suit, puis sélectionnez **OK**.

Taille du lot échantillon	Transporteur Type	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Plaque de banques dénaturée (avec code-barres)	1

10. Chargez les tubes de groupement sur les transporteurs comme suit, puis sélectionnez **OK**.

Taille du lot échantillon	Transporteur Type	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48	Tube	46	Nouveau tube de 2 ml, Pool A.	1
96	Tube	46	Nouveau tube de 2 ml, Pool A.	1
			Nouveau tube de 2 ml, Pool B.	2

11. Chargez les tubes de réactifs sur les transporteurs de réactifs comme suit, puis sélectionnez **OK**.

Taille du lot échantillon	Transporteur Type	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48, 96	Réactif	47	3 ml Hybridization Buffer (Tampon d'hybridation)	1

12. Chargez les embouts sur les transporteurs d'embouts comme suit.

Taille du lot échantillon	Transporteur Type	Piste	Élément	Position de l'emplacement
24, 48, 96	Embout	49–54	Embouts avec filtre de 1 000 µl	1
			Embouts avec filtre de 300 µl	2
			Embouts avec filtre de 50 µl	3

13. Entrez l'emplacement des premier et dernier embouts pour chaque portoir d'embouts, puis sélectionnez **OK**.

14. Assurez-vous que les transporteurs, le matériel de laboratoire et les réactifs sont chargés comme indiqué.

15. Dans l'écran **Pooling Deck Verification** (Vérification de la plateforme de regroupement), sélectionnez **OK**.

16. Contrôlez le ML STAR pendant les étapes automatisées.

17. Entrez des commentaires sur les puits affectés, puis sélectionnez **OK**.

18. Lorsque Workflow Manager vous y invite, assurez-vous que la plateforme de chargement du ML STAR soit libre pour permettre au ML STAR de décharger les transporteurs.

19. Sélectionnez **Unload** (Décharger) pour décharger la plateforme.

20. Déchargez le transporteur de tube.

21. Bouchez chaque tube de regroupement, agitez au vortex, puis centrifugez brièvement.

22. Sélectionnez **OK**.

23. Séquencez les banques dès que possible après le regroupement. Scellez la plaque de banques et conservez-la entre -25 °C et -15 °C pendant au plus 7 jours pour permettre le regroupement.

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Si vous arrêtez, bouchez les tubes de regroupement et stockez-les à une température comprise entre -25 °C et -15 °C pendant 7 jours au maximum.

Préparation des banques regroupées pour le séquençage

Préparation

1. Préparez les réactifs suivants :

Réactif	Stockage	Instructions
Tubes de regroupement	-25 °C à -15 °C	Si préalablement stockés, décongelez à température ambiante. Agitez au vortex brièvement. Centrifugez brièvement.

2. Préparez le système de séquençage de nouvelle génération en remplissant les champs suivants dans Local Run Manager VeriSeq NIPT Module :
 - a. **Run Name** (Nom de l'analyse)
 - b. **[Facultatif] Run Description** (Description de l'analyse)
 - c. **Pool Barcode** (Code-barres du regroupement)



ATTENTION

Le code-barres du groupe saisi dans le module Local Run Manager doit correspondre à celui saisi dans Workflow Manager. Le logiciel d'analyse rejette les configurations d'analyse incorrectes et exige un reséquençage.

Pour plus d'informations sur l'utilisation de Local Run Manager VeriSeq NIPT Module, reportez-vous au *Guide du logiciel VeriSeq NIPT Solution v2 (document n° 1000000067940)*.

Procédure

1. Mélangez les volumes suivants à la cartouche de réactif, puis pipetez pour mélanger.
 - Tampon d'hybridation (900 µL)
 - Pool A 450 µl (450 µl)
2. Procédez au séquençage à l'aide du guide de référence de votre instrument de séquençage de nouvelle génération. Pour un NextSeq 550Dx, reportez-vous au *Guide de référence de l'instrument NextSeq 550Dx* (document n° 100000009513) (ou reportez-vous à la notice applicable indiquée sur la page de support d'Illumina www.support.illumina.com).
3. Confirmez que la configuration de l'analyse est correcte lorsque vous y êtes invité.
4. Si nécessaire, répétez cette procédure pour le Pool B.
 - Pour atteindre la plage de densité de l'amplifiat cible, la plaque de banques peut être regroupée en utilisant une concentration de regroupement différente sur l'instrument Hamilton. Le nouveau regroupement invalide le regroupement d'origine.
 - Alternativement, le rapport entre le pool et HT1 (450 µl + 900 µl) peut être modifié pour atteindre la plage de densité cible de l'amplifiat.

Séquençage de nouvelle génération

VeriSeq NIPT Solution v2 peut être utilisé avec un système de séquençage de nouvelle génération avec les spécifications suivantes :

- Capacité de 2 x 36 lectures appariées
- Compatible avec les adaptateurs d'index de VeriSeq NIPT Sample Prep Kit.
- Chimie à deux canaux
- Production automatique de fichiers BCL (*.bcl) (données brutes de l'instrument de séquençage)
- 400 millions de lectures appariées par analyse
- Compatible avec VeriSeq NIPT Assay Software v2

NextSeq 550Dx est compatible avec VeriSeq NIPT Solution v2

Analyse des données de séquençage

Lorsque le séquençage est terminé, les données de séquençage sont automatiquement envoyées à VeriSeq NIPT Assay Software v2 pour l'analyse et de production du rapport. Le rapport inclut les classifications de chaque échantillon du lot ainsi qu'une évaluation de toutes les mesures de l'analyse de CQ. Le processus d'analyse, de l'achèvement du séquençage aux résultats finaux, prend environ 4 heures pour un lot de 48 échantillons. Pour plus d'informations sur l'analyse de données et le fichier produit, consultez *Guide du logiciel VeriSeq NIPT Solution v2 Software* (document n°1000000067940).

Interprétation des résultats

L'algorithme VeriSeq NIPT Solution v2 utilise un modèle statistique sophistiqué qui combine plusieurs types d'informations provenant de la collection de fragments de banques séquencés appariés. Ce modèle est utilisé pour détecter les régions du génome qui sont sous ou sur-représentées dans la banque de chaque échantillon. Fait important, ce modèle explique si le degré de sous-représentation ou de sur-représentation est quantitativement cohérent avec une aneuploïdie dans le génome fœtal au niveau de la fraction fœtale estimée pour la banque.

Pour tous les chromosomes, les données de séquençage appariées sont alignées sur le génome de référence (HG19). Les lectures appariées uniques non dupliquées sont regroupés par blocs de 100 kb. Les comptages des blocs correspondants sont ajustés pour les biais GC et selon la couverture génomique spécifique à la région établie précédemment. À l'aide de ces comptages normalisés, des scores statistiques sont obtenus pour chaque autosome en comparant les régions de couverture qui peuvent être affectées par l'aneuploïdie avec le reste des autosomes. Un rapport de vraisemblance logarithmique (LLR) est calculé pour chaque échantillon en tenant compte de ces scores basés sur la couverture et de la fraction fœtale estimée. Le LLR correspond à la probabilité qu'un échantillon soit affecté compte tenu de la couverture observée et de la fraction fœtale par rapport à la probabilité qu'un échantillon ne soit pas affecté compte tenu de la même couverture observée. Le calcul de ce ratio tient également compte de l'incertitude estimée dans la fraction fœtale. Pour les calculs ultérieurs, le logarithme naturel du rapport est utilisé. Le logiciel du test évalue le LLR pour chaque chromosome cible et chaque échantillon afin de déterminer l'aneuploïdie.

Lors de la création du lot, vous devez définir le type d'échantillon (simple ou gémellaire), le type de dépistage (de base ou pangénomique) et le rapport sur les chromosomes sexuels (Oui, Non et ACS) désiré pour chaque échantillon. Ensemble, ces options déterminent les informations rapportées pour chaque échantillon.

Pour tous les types d'échantillons, le type de dépistage détermine quelles anomalies autosomiques sont rapportées. Pour le type de dépistage de base, seuls les événements de trisomie chromosomique complète impliquant les chromosomes 13, 18 et 21 sont rapportés. Pour le type de dépistage pangénomique, la délétion ou la duplication chromosomique totale ou partielle de tout chromosome autosomique sont rapportées. La longueur de la plus petite délétion ou duplication chromosomique partielle rapportable est de 7 Mb.

Pour les échantillons de grossesse simple, vous pouvez désactiver le rapport sur les chromosomes sexuels. Vous pouvez également configurer pour rapporter les aneuploïdies des chromosomes sexuels en rapportant ou non le sexe des échantillons euploïdes.

Pour les échantillons de jumeaux, si « Yes » est sélectionné pour le rapport sur les chromosomes sexuels, le résultat est limité au rapport sur la présence ou l'absence d'un chromosome Y dans la banque. L'aneuploïdie des chromosomes sexuels ne peut pas être rapportée pour les échantillons de jumeaux.

REMARQUE Lorsque tous les échantillons d'un lot ont le même sexe rapporté, une notification d'erreur par e-mail/interface Web informe l'utilisateur avec un avertissement de mélange/contamination d'échantillon. Le lot sera invalidé et aucun rapport ne sera produit. (Applicable à VeriSeq NIPT Solution v2 server software v2.2 et versions ultérieures.)

Un résultat « ANOMALY DETECTED » (Anomalie détectée) indique que les échantillons dépistés sont positifs pour une ou plusieurs anomalies compatibles avec le type de dépistage sélectionné et l'option de rapport sur les chromosomes sexuels. Lorsqu'une anomalie est détectée, le rapport fournit une description de l'anomalie en notation cytogénétique.

Le logiciel VeriSeq NIPT Assay Software v2 utilise les statistiques générées pendant le séquençage pour fournir une estimation de fraction fœtale (FFE, fetal fraction estimation) pour chaque échantillon. La FFE est l'estimation de la composante ADNlc fœtal récupérée par le test et rapportée sous forme de pourcentage arrondi pour chaque échantillon. L'écart-type moyen de cette estimation pour tous les échantillons est de 1,3 %. La FFE ne doit pas être utilisée seule pour exclure des échantillons lors de la préparation du rapport des résultats.

Pour effectuer des détections de représentation chromosomique, le logiciel VeriSeq NIPT Assay Software v2 utilise le test iFACT (individualized Fetal Aneuploidy Confidence Test) de confiance en matière d'aneuploïdie fœtale, une mesure de seuil dynamique qui indique si le système a généré une couverture de séquençage suffisante, compte tenu de l'estimation de la fraction fœtale pour chaque échantillon. Les détections négatives ne sont rapportées que si l'échantillon atteint le seuil du test iFACT. Si un échantillon n'atteint pas ce seuil, l'évaluation du CQ affiche « FAILED iFACT » (Échec iFACT) et le système ne génère pas de résultat.

Outre le test iFACT, VeriSeq NIPT Assay Software v2 évalue plusieurs autres mesures du CQ pendant l'analyse. Les mesures supplémentaires comprennent des évaluations de l'uniformité de couverture sur les régions génomiques de référence et la distribution des longueurs de fragments d'ADNlc. L'évaluation du CQ affiche soit un indicateur CQ soit un échec du CQ pour toute mesure en dehors de la plage acceptable. En cas d'échec du CQ, le système ne génère pas de résultat pour l'échantillon. Si un échantillon échoue au CQ, il peut être retraité à condition de disposer d'un volume de plasma suffisant dans le tube de prélèvement sanguin.

VeriSeq NIPT Solution v2 génère des données à utiliser dans un rapport final. Elle ne génère pas de rapport final pour le patient. Les clients sont responsables de la conception et du contenu du rapport final qui doit être remis au médecin traitant. Illumina n'est pas responsable du libellé du rapport final destiné aux clients.



ATTENTION

Vérifiez les estimations de fraction fœtale de tous les échantillons. Si les estimations de fraction fœtale sont similaires pour tous les échantillons d'une même série, une fusion des échantillons peut s'être produite et avoir un impact sur les résultats. Contactez le support technique d'Illumina pour obtenir de l'aide.

Caractéristiques de performance

Les données suivantes, décrites dans les sections performances cliniques et performances analytiques, ont été générées à l'aide des protocoles et des matériels décrits dans les instructions d'utilisation, en commençant par le plasma. Toutes les données de séquençage pour cette section ont été générées sur un système de séquençage NextSeq 500/550 ou un système de séquençage NextSeq 550Dx avec les configurations suivantes :

	NextSeq 500/550	NextSeq 550Dx
Logiciel chargé sur l'instrument	NextSeq Control Software 4.0	NextSeq Operating Software 1.3
Version du kit de réactifs	NextSeq 500/550 High Output v2.5 (75 cycles) Reagent Kit	NextSeq 550Dx High Output v2.5 (75 cycles) Reagent Kit
Méthode de séquençage	Séquençage apparié 2 x 36 à haut débit	Séquençage apparié 2 x 36 à haut débit

Étude clinique

La précision clinique VeriSeq NIPT Solution v2 a été démontrée en évaluant des échantillons de plasma de femmes enceintes ayant une grossesse simple ou gémellaire. Les échantillons ont été obtenus à partir de banques d'échantillons de plasma anonymisés qui avaient été obtenus auparavant à partir d'échantillons de sang total périphérique. Plus de 45 000 échantillons ont été pris en considération pour leur inclusion dans l'étude. Ces échantillons ont fait l'objet d'un dépistage prénatal antérieur pour les aneuploïdies chromosomiques fœtales, les délétions partielles et les duplications de 7 Mb ou plus. Tous les échantillons de grossesses affectées et un sous-ensemble d'échantillons consécutifs de grossesses non affectées étaient admissibles pour les tests si les résultats cliniques étaient disponibles et si les critères de l'échantillon étaient remplis. Au total, 2 335 échantillons ont été inclus dans l'ensemble d'analyse. De cet ensemble, 2 328 échantillons provenaient de grossesses simples et sept échantillons provenaient de grossesses gémellaires.

Parmi ces échantillons, 28 (1,2 %, 28/2 335) ont échoué au contrôle de qualité du test au premier passage lors de l'analyse des données de séquençage terminées :

- 27 échecs iFACT (1 XO, 26 non affectées)
- Un échec pour des données en dehors de la plage attendue

Données démographiques et caractéristiques des grossesses

L'âge maternel, l'âge gestationnel et le trimestre de la grossesse sont résumés dans le [Tableau 7](#) pour les échantillons ayant fait l'objet d'un dépistage sur génome entier, notamment les échantillons mosaïques connus. La majorité (98 %) des échantillons de test représentent le premier trimestre de la grossesse.

Les données démographiques ont été évaluées entre la cohorte de base et la cohorte pangénomique et n'ont montré aucune différence statistique. Les données démographiques et les caractéristiques des grossesses étaient similaires, que la présence d'un mosaïcisme connu soit incluse ou non.

Tableau 7 Données démographiques et caractéristiques des grossesses

Statistiques récapitulatives	Génome entier (notamment les mosaïcismes connus)
Nombre d'échantillons	2 307*
Âge maternel – années	
Moyenne	35,08
Écart-type	4,04
Médiane	34,95
25e percentile, 75e percentile	32,31, 37,79
Minimum, maximum	20,22, 53,02
Âge gestationnel au prélèvement sanguin - semaines	
Moyenne	10,93
Écart-type	1,20
Médiane	10,57
25e percentile, 75e percentile	10,29, 11,14
Minimum, maximum	10,00, 27,86
Trimestre de grossesse – n (%)	
< Premier (<14 semaines)	2 252 (98 %)
Deuxième	54 (2 %)
Troisième (≥ 27 semaines)	1 (0 %)

* Les échantillons finaux présentés contenaient 7 jumeaux.

Performance clinique

Les résultats obtenus avec VeriSeq NIPT Solution v2 ont été comparés aux résultats de la norme de référence clinique. Tous les échantillons de l'étude présentaient des critères de référence clinique (vérité clinique) liés au statut d'aneuploïdie chromosomique fœtale et à des délétions et des duplications partielles de 7 Mb ou plus. Le résultat standard de référence clinique pour les échantillons inclus dans cette étude dépendait des résultats de l'analyse chromosomique ou d'un examen physique du nouveau-né avec un dépistage négatif du NIPT basé sur l'analyse NGS. Le personnel de l'étude formé a procédé à la classification des données cliniques standard de référence conformément au document de codage médical du promoteur.

Les méthodes d'analyse chromosomique comprenaient le caryotypage, l'hybridation in situ en fluorescence (FISH) ou l'analyse chromosomique sur puce à ADN (ACPA). L'analyse chromosomique a été effectuée sur le sang périphérique ou la salive de nouveau-nés ou de nourrissons, les échantillons de produits de conception, les amniocytes, les villosités chorales, les tissus placentaires ou le sang de cordon ombilical postnatal.

Le mosaïcisme chromosomique est défini comme la présence de deux lignées cellulaires ou plus avec une composition chromosomique différente chez une même personne. Les lignées cellulaires proviennent généralement du même zygote. Le type et le degré de mosaïcisme varient et dépendent de la chronologie des événements mosaïques au cours de l'embryogenèse et du développement fœtal. Différents types de mosaïcisme apparaissent dans les diagnostics prénataux en fonction de la distribution des lignées cellulaires anormales versus normales sur le cytotrophoblaste, le mésenchyme ou le fœtus.¹⁰ Bien que le mosaïcisme puisse être observé avec toute anomalie chromosomique, la prévalence du mosaïcisme dans les trisomies rares est plus élevée que dans les trisomies des chromosomes 21, 18 et 13 (T21, T18 et T13).¹¹ Dans l'évaluation de la performance, les cas de mosaïcisme ont été inclus dans l'analyse du génome entier, car ce type de criblage pour ce test a pour but de détecter les rares aneuploïdies autosomiques (RAA).

Performance du dépistage de base

Pour le dépistage de base, les anomalies incluent la T21, la T18 et la T13. Au total, 2 243 échantillons de grossesses simples et gémellaires ont été inclus dans l'analyse. Une T21 a correctement été dépistée dans les sept grossesses gémellaires ; elles ne sont pas rapportées dans le tableau suivant.

Tableau 8 Sensibilité et spécificité de VeriSeq NIPT Solution v2 pour la détection des trisomies 21, 18, & 13 dans un dépistage de base des grossesses simples (à l'exclusion des mosaïcismes connus)

	T21	T18	T13
Sensibilité	> 99,9 % (130/130)	> 99,9 % (41/41)	> 99,9 % (26/26)
IC bilatéral à 95 %	97,1 %, 100 %	91,4 %, 100 %	87,1 %, 100 %
Spécificité	99,90 % (1982/1984)	99,90 % (1995/1997)	99,90 % (2000/2002)
IC bilatéral à 95 %	99,63 %, 99,97 %	99,64 %, 99,97 %	99,64 %, 99,97 %

Les performances du test pour le dépistage de base, comme présentées dans le [Tableau 8](#), sont calculées en excluant un sous-ensemble de 64 échantillons affectés de RAA, de délétions ou de duplications autosomiques partielles, ou de mosaïcisme connu. Ces 64 échantillons comprenaient huit mosaïques T21 et trois mosaïques T18. Cinq de ces 11 échantillons ont été identifiés comme étant affectés par l'anomalie détectée par le logiciel VeriSeq NIPT Assay Software v2.

Performance du dépistage pangénomique

En ce qui concerne le dépistage pangénomique, les anomalies comprennent les trisomies, les monosomies et les délétions ou duplications partielles de 7 Mb ou plus. Les échantillons utilisés pour le dépistage pangénomique contenaient 36 échantillons comportant un mosaïcisme connu. Au total, 2 307 échantillons de grossesses simples et gémellaires ont été analysés. Les sept grossesses gémellaires ont été correctement dépistées comme présentant une anomalie du chromosome 21 et ne sont pas mentionnées dans les tableaux suivants.

Performance du dépistage pangénomique pour toute anomalie

Tableau 9 Sensibilité et spécificité de VeriSeq NIPT Solution v2 pour la détection de toute anomalie lors du dépistage pangénomique (notamment les mosaïcismes connus)

	Sensibilité	Spécificité
Estimation % (n/N)	95,5 % (318/333)	99,34 % (1 954/1 967)
IC bilatéral à 95 %	92,7 %, 97,3 %	98,87 %, 99,61 %

Performance du dépistage pangénomique pour les aneuploïdies autosomiques rares

Tableau 10 Sensibilité et spécificité de VeriSeq NIPT Solution v2 pour la détection des aneuploïdies autosomiques rares (RAA) lors du dépistage pangénomique (notamment les mosaïcismes connus)

	Sensibilité	Spécificité
Estimation % (n/N)	96,4 % (27/28)	99,80 % (2 001/2 005)
IC bilatéral à 95 %	82,3 %, 99,4 %	99,49 %, 99,92 %

Performance du dépistage pangénomique pour les délétions ou les duplications partielles

Tableau 11 Sensibilité et spécificité de VeriSeq NIPT Solution v2 pour la détection des délétions et duplications partielles de 7 Mb ou plus lors du dépistage pangénomique (notamment les mosaïcismes connus)

	Sensibilité	Spécificité
Estimation % (n/N)	74,1 % (20/27)	99,80 % (2 000/2 004)
IC bilatéral à 95 %	55,3 %, 86,8 %	99,49 %, 99,92 %

Différences de performance entre le dépistage de base et le dépistage pangénomique

La méthode de notation des trisomies courantes et des aneuploïdies des chromosomes sexuels est la même pour le dépistage de base et le dépistage pangénomique. Le dépistage de base n'applique l'algorithme qu'aux T21, T18 et T13. Cependant, le dépistage pangénomique évalue toutes les trisomies ainsi que les RAA, les

délétions et les duplications partielles.

Il y a deux différences entre les rapports de performance décrites entre le dépistage de base et du dépistage pangénomique. En premier lieu, les échantillons comprenant un cas de mosaïcisme connu à la fois pour les trisomies courantes et pour les RAA, les délétions et les duplications partielles étaient inclus dans le dépistage pangénomique pour l'obtention de données de performance. En deuxième lieu, le dépistage pangénomique peut privilégier la détection d'une duplication ou d'une délétion partielle à celle d'une trisomie complète. La présence d'une trisomie complète en plus d'une duplication ou d'une délétion partielle peut être constatée en se référant au score LLR fourni dans le rapport complémentaire.

Inclusion des mosaïcismes dans le dépistage pangénomique

Le mosaïcisme est répertorié comme une limitation de ce test. En présence de mosaïcisme, le signal foetal d'une anomalie est réduit et peut donc être plus difficile à détecter sans compromettre la spécificité globale du test. Cependant, parce que le mosaïcisme est plus pertinent pour le contenu élargi, les échantillons présentant un mosaïcisme ont été inclus dans le dépistage pangénomique.

Des 64 échantillons inclus dans le dépistage pangénomique, mais non dans le dépistage de base, 36 ont été identifiés comme présentant un mosaïcisme selon le standard de référence clinique. De ces 36 échantillons, 23 détections correspondaient au standard de référence clinique.

Détection des délétions ou duplications partielles par rapport aux aneuploïdies panchromosomiques

VeriSeq NIPT Solution v2 propose des options de menu à la fois pour le dépistage de base et le dépistage pangénomique. Lors du dépistage de base, un résultat indiquant ANOMALY DETECTED (anomalie détectée) est uniquement affiché lorsqu'une aneuploïdie complète est détectée sur les chromosomes 21, 18 ou 13, et si les critères de contrôle de la qualité sont respectés. Dans le dépistage pangénomique, le système détecte l'aneuploïdie sur l'ensemble de tous les autosomes et les événements de délétion partielle et de duplication d'au moins 7 Mb.

Lors de l'utilisation du dépistage pangénomique, dans les cas où à la fois un événement de chromosome entier et un événement de variabilité du nombre de copies (CNV, Copy number variation) dans le même chromosome dépassent le seuil de rapport de vraisemblance logarithmique (LLR, Log likelihood ratio), le système privilégie un événement de délétion ou de duplication partielle à la détection du chromosome entier si la taille de la délétion ou de la duplication partielle couvre environ 75 % ou moins du chromosome sur lequel l'événement est détecté. Si la région de délétion ou de duplication partielle détectée est supérieure à 75 % de la taille du chromosome, l'événement est rapporté comme trisomie ou monosomie complète du chromosome entier si, simultanément, le seuil LLR pour le chromosome entier est également dépassé. De ce fait, des délétions et des duplications sensiblement importantes qui sont inférieures ou égales à 75 % de la taille du chromosome peuvent indiquer une aneuploïdie panchromosomique.

Dans tous les échantillons, le score LLR pour la classification panchromosomique est disponible dans le rapport complémentaire. Le score LLR doit être examiné en tenant compte du seuil spécifié dans la [Probabilités de détection à 95 % pour les régions moyennes par taille pour VeriSeq NIPT Solution v2 à la page 64](#) avant

d'interpréter le résultat. Par exemple, une détection CNV où les scores LLR au niveau chromosomique dépassent le seuil est une indication supplémentaire pour une interprétation compatible avec une aneuploïdie panchromosomique. Voir le [Tableau 12](#) à titre d'exemple.

Dans l'étude clinique, il y avait deux échantillons de grossesse simple avec des duplications très importantes (l'une sur le chromosome 21, l'autre sur le chromosome 18) qui étaient inférieures à 75 % de la taille relative du chromosome (voir le [Tableau 12](#)). Les deux événements ont été rapportés comme des duplications partielles plutôt que comme une trisomie complète pour ce chromosome. Les scores LLR pour ces événements étaient supérieurs au seuil, ce qui correspondait à un résultat de trisomie complète. En cas de résultats de duplication partielle ou de trisomie complète, la prise en charge de suivi d'une détection d'un NIPT positif consiste à proposer au patient un test de confirmation par le biais d'un diagnostic prénatal.

Tableau 12 Exemples d'événements de duplication importants identifiés lors du dépistage pangénomique

	Vérité clinique	Sortie du système pangénomique	Taille de l'anomalie (Mb)	% du chromosome	Scores LLR
Échantillon 1	Singleton trisomie 21	Duplication partielle sur le chr. 21	22,50	48,9	19,43
Échantillon 2	Singleton trisomie 18	Duplication partielle sur le chr. 18	47,00	60,2	12,99

Consultez le guide *VeriSeq NIPT Solution v2 Software Guide (document n° 1000000067940)* pour de plus amples informations sur les mesures de contrôle de la qualité utilisées pour rapporter les résultats d'aneuploïdie.

Chromosomes sexuels

Les résultats des chromosomes sexuels de VeriSeq NIPT Solution v2 ont été comparés aux résultats du standard de référence clinique et sont résumés dans le tableau suivant. Le pourcentage de concordance a été calculé pour chaque chromosome sexuel dans le cadre de chaque résultat du standard de référence clinique. Le pourcentage de concordance a été calculé comme suit : nombre d'échantillons pour lesquels la définition du chromosome sexuel de VeriSeq NIPT Solution v2 correspond à la classification du standard de référence clinique, divisé par le nombre total d'échantillons ayant la même classification du standard de référence clinique.

Tableau 13 Pourcentage de concordance pour la classification du sexe fœtal*

Classification du sexe fœtal		Phénotype à l'examen physique du nouveau-né		Résultats cytogénétiques							
		Féminin	Masculin	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY	Autre**	Manquante
Anomalie non détectée	XX	997	0	21	0	2	0	0	0	0	0
Anomalie non détectée	XY	0	966	0	15	0	0	0	0	0	1
Anomalie détectée	XO	0	0	0	0	19	0	0	1	0	0
Anomalie détectée	XXX	0	0	0	0	0	17	0	0	1	0
Anomalie détectée	XXY	0	0	0	0	0	0	23	0	1	0
Anomalie détectée	XYY	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0
Total		997	966	21	15	21	17	23	12	2	1
Pourcentage de concordance		100	100	100	100	90,5	100	100	91,7	Sans objet	Sans objet

* Cinq grossesses gémellaires ont été correctement classées comme présence du chromosome Y. Deux grossesses ont été correctement classées comme absence du chromosome Y.

** Les autres résultats cytogénétiques étaient XXXXX et XXYY.

Valeur prédictive positive et valeur prédictive négative de VeriSeq NIPT Solution v2

La valeur prédictive positive (VPP, positive predictive value) et la valeur prédictive négative (VPN, negative predictive value) du test fournissent des informations sur la capacité du test à éclairer les décisions cliniques basées sur la sensibilité du test, la spécificité et la probabilité pré-test que le fœtus soit atteint de trisomie (prévalence). Étant donné que la VPP et la VPN dépendent de la prévalence et que la prévalence de ces aneuploïdies peut varier d'une population à l'autre, la VPP et la VPN ont été calculées pour une gamme de valeurs de prévalence plausibles en fonction des valeurs de sensibilité et de spécificité observées lors du dépistage de base (sans mosaïcismes connus) de l'étude de précision clinique. Le [Tableau 17](#) est basé sur le dépistage pangénomique (avec mosaïcismes connus).

Tableau 14 Prévalence de la trisomie 21, VPP et VPN lors du dépistage de base (à l'exclusion des mosaïcismes connus)

Prévalence (%)	VPP (%)	VPN (%)
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

Tableau 15 Prévalence de la trisomie 18, VPP et VPN lors du dépistage de base (à l'exclusion des mosaïcismes connus)

Prévalence (%)	VPP (%)	VPN (%)
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

Tableau 16 Prévalence de la trisomie 13, VPP et VPN lors du dépistage de base (à l'exclusion des mosaïcismes connus)

Prévalence (%)	VPP (%)	VPN (%)
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

Tableau 17 Prévalence de toute anomalie, VPP et VPN lors du dépistage de base (mosaïcismes connus inclus)

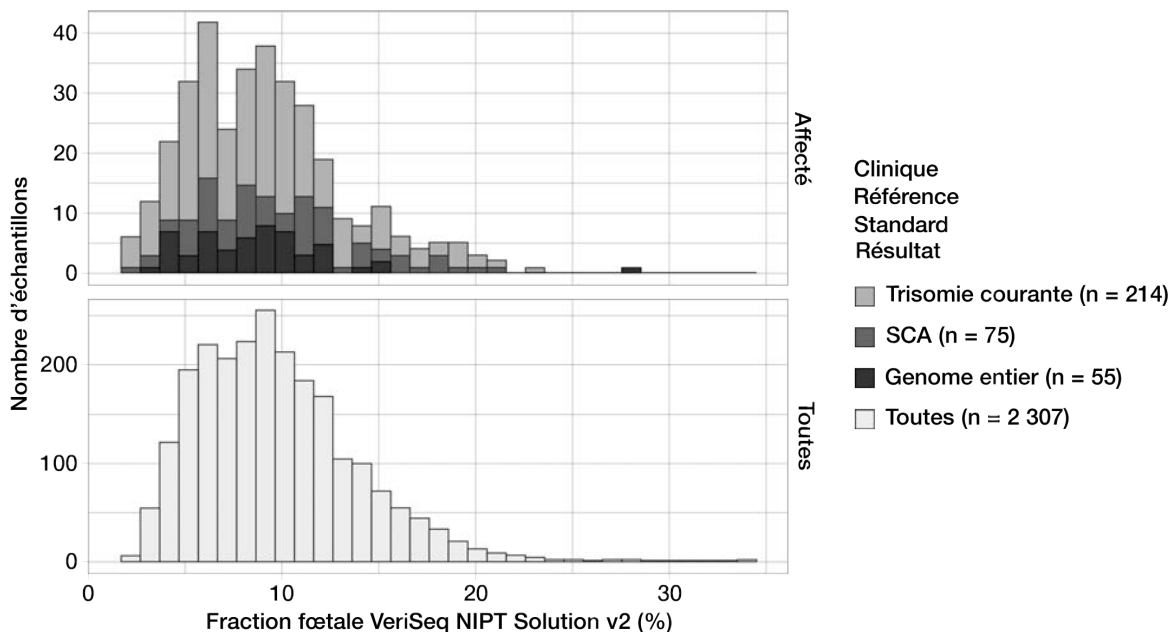
Prévalence (%)	VPP (%)	VPN (%)
0,01	1,42	> 99,99
0,02	2,81	> 99,99

Prévalence (%)	VPP (%)	VPN (%)
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

Distribution de la fraction fœtale

Les estimations de la distribution de la fraction fœtale (FF) de VeriSeq NIPT Solution v2 à partir du dépistage pangénomique avec mosaïcisme sont présentées par catégorie de résultats du standard de référence clinique à la [Figure 1](#).

Figure 1 Distribution de la fraction fœtale



5 échantillons présentaient des anomalies dans plusieurs catégories.
 Le test Trisomie courante comprend les échantillons présentant une trisomie 21, 18 et/ou 13.
 Le test Génome entier comprend les échantillons avec aneuploïdie autosomique rare (RAA) ou délétions et/ou duplications partielles.

Les estimations de la FF variaient de 2 % à 34 % dans l'ensemble avec une médiane de 9 % et un écart interquartile (IQ) de 6 % à 12 %. L'estimation de la FF médiane pour les trisomies courantes et les événements détectés par dépistage pangénomique est de 8 % et de 9 % pour les ACS. La plage des estimations de FF était

cohérente pour tous les résultats. Il n'y a pas de changement apparent dans la distribution de FF parmi les trisomies courantes, les ACS, les événements détectés par dépistage pangénomique ou tous les échantillons dans l'analyse pangénomique.

Performance dans les grossesses gémellaires

Estimation de la performance pour les trisomies 13, 18 et 21, et la présence du chromosome Y, dans les cas de grossesses gémellaires

En raison de la faible prévalence de trisomie 21, 18 et 13 dans les grossesses gémellaires, seul un petit nombre d'échantillons de jumeaux atteints était disponible pour l'étude clinique. Pour estimer la performance de VeriSeq NIPT Solution v2 dans les grossesses gémellaires, des modèles *in silico* basés sur des observations provenant d'échantillons cliniques ont été utilisés pour simuler des populations de grossesses gémellaires. Cette simulation était cohérente avec la population d'utilisation prévue. La distribution de la fraction fœtale a été déterminée à partir d'environ 4 500 échantillons de type gémellaire et comparée à la distribution d'environ 120 000 échantillons de grossesses simples. La distribution de la fraction fœtale conditionnelle à l'état d'aneuploïdie a été déterminée à partir de détections supposées de type simple (1 044 trisomies 21, 307 trisomies 18 et 192 trisomies 13). La combinaison des deux distributions permet les inférences liées à la détection d'aneuploïdie dans les échantillons de type gémellaire. Des groupes de jumeaux dizygotes et monozygotes ont été simulés et une moyenne pondérée représentant leur prévalence dans la population concernée a été calculée (deux groupes de dizygotes pour un groupe de monozygotes) pour estimer la sensibilité. Pour la spécificité, des séries de jumeaux non atteints ont été simulées.

La fraction de chaque échantillon simulé atteint de trisomie (c.-à-d. la fraction affectée) a été calculée différemment pour chaque catégorie d'échantillon :

- Pour les jumeaux monozygotes, la fraction affectée de chaque échantillon a été fixée à 1,0 parce que, dans cette situation, la trisomie affecte les deux jumeaux.
- Pour les jumeaux dizygotes, il a été présumé qu'un seul jumeau était affecté (il est extrêmement rare d'avoir les deux jumeaux dizygotes affectés). Les valeurs de la fraction affectée ont été simulées à l'aide de la distribution connue des rapports de fraction fœtale tels que déterminés à partir d'échantillons cliniques de type gémellaire discordants pour le sexe. Une approche conservatrice a été adoptée en supposant que le jumeau affecté avait toujours la fraction fœtale la plus basse des deux jumeaux. Un facteur de correction a été appliqué pour les fractions fœtales étant en moyenne plus faibles dans les grossesses trisomiques 13 et 18.
- Pour les jumeaux non affectés, la fraction affectée de chaque échantillon a été fixée à zéro.

Pour les jumeaux atteints de trisomie 18 ou 13, la fraction fœtale correspondant à la fraction affectée de l'échantillon a été réduite. La réduction était proportionnelle à la réduction moyenne de la fraction fœtale observée dans les données cliniques dans les trisomies 18 ou 13 de type simple par rapport aux euploïdies de type simple.

La fraction fœtale globale et la fraction affectée de chaque échantillon simulé ont ensuite été utilisées pour calculer un score d'aneuploïdie à l'aide de l'algorithme standard de VeriSeq NIPT Solution v2. La sensibilité a été calculée en déterminant la fréquence à laquelle les scores d'aneuploïdie pour les jumeaux affectés simulés étaient supérieurs au seuil d'aneuploïdie correspondant. De même, la spécificité a été calculée en déterminant la fréquence à laquelle les scores d'aneuploïdie pour les jumeaux simulés non affectés étaient inférieurs au seuil d'aneuploïdie correspondant ([Tableau 18](#)). Les intervalles de confiance à 95 % ont été estimés sur la base du nombre d'échantillons cliniques réels de jumeaux dans l'ensemble de données original, qui ont été classés comme affectés ou non par la trisomie pertinente.

Pour estimer la sensibilité au chromosome Y dans des échantillons de jumeaux, des ensembles de jumeaux XY/XY et XX/XY ont été simulés. Une moyenne pondérée représentant leur prévalence dans la population d'utilisation prévue a été prise (1 XY/XY : 1 XX/XY). Pour estimer la spécificité au chromosome Y chez les jumeaux, un ensemble de jumeaux XX/XX a été simulé. Les valeurs de fraction fœtale globale ont été simulées en fonction de la distribution connue de la fraction fœtale dans les échantillons cliniques de jumeaux.

Pour les jumeaux XY/XY et XX/XY, les scores correspondants du chromosome Y ont été estimés en utilisant la relation connue entre la fraction fœtale et les scores du chromosome Y dans des échantillons cliniques de type simple classés comme étant de sexe masculin. Pour les jumeaux XX/XY uniquement, les valeurs de fraction fœtale affectées (c'est-à-dire de sexe masculin) ont été simulées en utilisant la distribution connue des rapports de fraction fœtale observés entre les jumeaux de la même grossesse, comme déterminé à partir d'échantillons cliniques de jumeaux de sexe différent. Une approche conservatrice a été adoptée, là où la fraction affectée était sélectionnée de façon à ce qu'elle puisse correspondre au plus petit des deux jumeaux. Pour chaque échantillon XX/XY simulé, le score du chromosome Y a été multiplié par la fraction affectée.

Pour les jumeaux XX/XX, les scores du chromosome Y ont été échantillonnés à partir des scores observés dans les échantillons cliniques de type simple classés comme étant de sexe féminin. Le score du chromosome Y et la fraction fœtale globale ont ensuite été utilisés pour classer chaque échantillon simulé comme « chromosome Y présent » ou « chromosome Y absent » en utilisant l'algorithme standard de VeriSeq NIPT Solution v2.

La sensibilité a été calculée en déterminant à quelle fréquence les jumeaux XY/XY ou XX/XY simulés ont été correctement classés comme « chromosome Y présent ». La spécificité a été calculée en déterminant la fréquence à laquelle les jumeaux XX/XX simulés ont été correctement classés comme « chromosome Y absent ». Les intervalles de confiance à 95 % ont été estimés sur la base du nombre d'échantillons cliniques réels de jumeaux dans l'ensemble de données original, qui ont été classés comme « chromosome Y présent » ou « chromosome Y absent ».

Tableau 18 Estimations de la trisomie 21, 18 et 13 dans la population simulée de grossesses gémellaires

	Trisomie 21	Trisomie 18	Trisomie 13	Présence de Y
Sensibilité	96,4 %	95,7 %	93,6 %	> 99,9 %
IC bilatéral à 95 %	(86,4 %, 98,9 %)	(68,3 %, 99,4 %)	(64,1 %, 98,9 %)	(99,9 %, > 99,9 %)
Spécificité	99,9 %	> 99,9 %	> 99,9 %	> 99,9 %
IC bilatéral à 95 %	(99,8 %, > 99,9 %)	(99,9%, > 99,9 %)	(99,9%, > 99,9 %)	(99,7%, > 99,9 %)

Le [Tableau 18](#) présente les estimations ponctuelles et les intervalles de confiance à 95 % estimés pour la sensibilité et la spécificité de VeriSeq NIPT Solution v2 pour détecter la trisomie 21, 18, 13 et la présence de Y dans une population simulée de grossesses gémellaires représentative de la population attendue. Les intervalles de confiance ont été estimés en fonction du nombre d'échantillons de type gémellaire ayant réussi le contrôle de qualité, classés selon qu'ils sont atteints ou non par la trisomie en cause. Le calcul de sensibilité présume que deux tiers des grossesses gémellaires affectées sont dizygotes avec un des jumeaux affecté, alors qu'un tiers des grossesses gémellaires affectées sont monozygotes avec les deux jumeaux affectés.

Les estimations présentées dans le [Tableau 18](#) ne concernent que les grossesses gémellaires. En raison de la prévalence encore plus faible, les données pour les grossesses d'ordre supérieur (triplés ou plus) étaient insuffisantes pour établir des modèles statistiques appropriés permettant d'estimer la précision de la détection de l'aneuploïdie.

Performances analytiques

Précision

Pour évaluer et quantifier la précision du test, une nouvelle analyse des données à l'aide du logiciel de pipeline analytique VeriSeq NIPT Solution v2 provenant de deux études précédentes effectuées avec VeriSeq NIPT Solution a été réalisée :

- Une étude de reproductibilité multicentrique comprenant trois passages effectués par trois opérateurs sur trois sites en utilisant un seul lot de réactif pour un total de neuf analyses.
- Une étude de précision intra-laboratoire comprenant 12 analyses sur un site unique utilisant deux ML STAR, deux systèmes d'instruments de séquençage et trois lots de réactifs de séquençage.

L'objectif de l'étude de précision était de quantifier la précision du test en ce qui concerne la trisomie 21 (T21) et le chromosome Y, mais aussi estimer la variabilité entre différents instruments, kits de préparation de banques et lots de réactifs de séquençage. La reproductibilité pour des conditions non décrites ci-dessus n'a pas été évaluée dans le cadre des études.

Un pool de T21 ayant une fraction fœtale de 5 % a été créé en combinant l'ADNc extrait du plasma maternel de femmes enceintes (avec un fœtus atteint de T21) et l'ADNc extrait du plasma de femmes non enceintes. Un pool d'ADNc ayant une fraction fœtale de 10 % maternelle-fœtus masculin (fœtus XY) a également été créé. Le panel d'échantillons de chaque étude pour chaque analyse comprenait 4 réplicats du pool d'échantillons affectés par la T21 ayant une fraction fœtale de 5 % et 20 réplicats du pool d'ADNc ayant une fraction fœtale maternelle-fœtus masculin de 10 %. Les tests ont été effectués sur 10 jours pour un total de 21 analyses pour les deux études combinées.

La T21 et la présence du chromosome Y ont été choisies pour être évaluées en fonction de la représentativité des conditions cliniques et de la complexité de la détection des anomalies. Étant le plus petit autosome humain, la taille du chromosome 21 a un impact direct sur la sensibilité de la détection de la T21, en particulier à de faibles valeurs de fraction fœtale telles que celles utilisées dans cette étude. Le chromosome Y, tel que présent dans le plasma maternel, est exclusivement d'origine fœtale et donc plus facile à détecter par le test.

La moyenne et les écarts-types observés pour le score LLR du chromosome 21 et les valeurs chromosomiques normalisées (NCV, normalized chromosomal values) du chromosome Y ont montré que l'écart-type (SD, standard deviation) du réplicat était la plus grande source de variabilité. La variation entre les sites, les instruments et les lots de réactifs a ajouté une quantité négligeable de variabilité, comme en témoigne la différence entre l'écart-type total et l'écart-type du réplicat dans le [Tableau 19](#) et le [Tableau 20](#).

Tableau 19 Résumé de l'écart-type (SD) de la réponse du séquençage multicentrique (reproductibilité)

Réponse	N	Moyenne	SD du réplicat	SD total de reproductibilité*
Score LLR du chromosome 21	36	34,43	11,36	11,36
NCV du chromosome Y	180	190,56	7,96	10,20

* Le total inclut la variabilité due au site, à l'opérateur, à l'exécution du test, au jour et au réplicat.

Tableau 20 Résumé de la précision de la réponse du séquençage intra-laboratoire

Réponse	N	Moyenne	SD du réplicat	SD total intra-laboratoire*
Score LLR du chromosome 21	48	36,01	9,07	10,25
NCV du chromosome Y	240	198,68	7,63	7,82

* Le total inclut la variabilité due à l'instrument de séquençage, au lot de réactifs, à l'opérateur, à l'exécution du test, au jour et au réplicat.

Une étude supplémentaire a été réalisée pour comparer la précision du séquençage VeriSeq NIPT Solution v2 (écart-type total) en utilisant la version 2.0 d'une flow cell par rapport à la version 2.5. L'étude comprenait deux types de flow cell (v2.0 et v2.5), trois lots de kits de séquençage, quatre systèmes d'instruments et deux analyses de séquençage par combinaison, pour un total de 48 séquences sur un seul site. Un pool de séquençage a été préparé à partir de plaques d'ADNIc préparées manuellement. Le panel d'échantillons comprenait 4 réplicats du pool d'échantillons de T21 ayant une fraction fœtale de 5 % et 20 réplicats du pool d'ADNIc ayant une fraction fœtale maternelle-fœtus masculin de 10 %. Les résultats de l'étude sont présentés dans le [Tableau 21](#) et confirment qu'il n'y a pas de différence dans la précision du séquençage entre Flow Cell v2.0 et Flow Cell v2.5.

Tableau 21 Résumé de la précision de la réponse du séquençage avec Flow Cell v2.0 par rapport à Flow Cell v2.5

Réponse	Nombre d'observations par version	SD total v2.0*	SD total v2.5*	Résultat statistique**
Score LLR du chromosome 21	96	9,56	8,44	Statistiquement équivalent (valeur de p- = 0,25)
NCV du chromosome Y	480	7,74	7,38	Statistiquement équivalent (valeur de p- = 0,38)

* Le total inclut la variabilité due à l'instrument de séquençage, au lot de réactifs, à l'exécution du test, au jour et au réplicat.

**Basé sur le test F pour évaluer l'égalité des variances (écarts-types au carré)

Contamination croisée

La contamination croisée a été évaluée dans le flux de travail de préparation des échantillons de VeriSeq NIPT Solution. Des pools de plasma de femmes non enceintes (XX) et d'hommes adultes (XY) ont été testés dans un schéma de damier sur 4 plaques de 96 puits. N = 48 pour les échantillons de femmes et d'hommes par plaque, pour un total de 192 échantillons de femmes et 192 échantillons d'hommes. Aucun des échantillons de femme n'a montré une couverture du chromosome Y statistiquement supérieure au contexte estimé, indiquant qu'il n'y a pas eu de contamination croisée provenant d'échantillons d'hommes dans la même plaque. Aucune contamination croisée détectable n'a été observée dans VeriSeq NIPT Solution.

Substances potentiellement interférentes

L'impact des substances potentiellement interférentes a été évalué avec VeriSeq NIPT Solution en évaluant la performance du test en présence de telles substances.

L'albumine, la bilirubine, l'hémoglobine et les triglycérides (endogènes) ont été injectés dans des groupes de plasmas maternels provenant de grossesses féminines (fœtus XX) non affectées. Elles ont été testées à deux concentrations pour chaque substance de test (n = 16 pour chaque test). Aucune interférence n'a été observée dans les performances du test.

Tableau 22 Substances potentiellement interférentes (endogènes)

Substance de test	Test à faible concentration (mg/ml)	Test à concentration élevée (mg/ml)
Albumine	35	50
Bilirubine	0,01	0,15
Hémoglobine	100	200
Triglycérides	1,5	5

L'ADN génomique (ADNg) maternel naturel dans le plasma peut également potentiellement interférer avec les performances du test, car il peut être extrait avec l'ADNlc fœtal. Des quantités d'ADN génomique de 1,6, 3,3 et 4,9 ng par échantillon (correspondant à 1, 2 et 3 écarts-types au-dessus de la concentration moyenne attendue d'ADNg après 7 jours de stockage du sang total¹²) ont été ajoutées à l'ADNlc extrait du plasma maternel de grossesses féminines (fœtus XX) non affectées. Les échantillons ont ensuite été testés dans la VeriSeq NIPT Solution (n = 16 pour chaque concentration). Aucune interférence dans les performances du test n'a été observée en présence de quantités élevées d'ADNg.

Vingt substances médicamenteuses potentiellement interférentes (exogènes) couramment utilisées ou prescrites pendant la grossesse ont été testées selon l'EP7-A2 (Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline—second Edition). Les 20 substances potentiellement interférentes ont été combinées en quatre groupes, injectées dans le plasma maternel de grossesses féminines non affectées et testées dans VeriSeq NIPT Solution (N = 16 pour chaque groupe). Aucune interférence dans les performances du test n'a été observée en présence de ces substances exogènes.

Tableau 23 Substances potentiellement interférentes (exogènes)

Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4
Paracétamol	Diphenhydramine	Albutérol	Cétirizine
Acétylcystéine	Érythromycine	Bupropion	Dextrométhorphan
Bisoprolol	Guaïfénésine	Caféine	Acide L-ascorbique
Citalopram	Héparine	Sertraline	Métoprolol
Desloratadine	Lidocaïne	Fluorure de sodium	Nadolol

Limite de détection

La limite de détection (LD, Limit of Detection) est définie comme le niveau de fraction fœtale qui correspond à la probabilité de détection de 95 % d'une affection d'intérêt, telle que la T21. Des études et des analyses statistiques ont été menées pour évaluer la LD de VeriSeq NIPT Solution v2 pour diverses affections communes.

La probabilité de détection d'une affection d'intérêt dans un échantillon affecté traité par VeriSeq NIPT Solution v2 dépend principalement de trois facteurs :

- la fraction fœtale
- la profondeur de séquençage
- la taille et la complexité de la région génomique d'intérêt

En supposant une profondeur de séquençage constante, une anomalie donnée est plus facile à détecter dans un échantillon avec un pourcentage de fraction fœtale plus élevé que dans un échantillon avec un pourcentage de fraction fœtale plus faible. Inversement, en supposant une fraction fœtale constante, une anomalie donnée est plus facile à détecter dans un échantillon avec une profondeur de séquençage plus élevée que dans un échantillon avec une profondeur de séquençage plus faible. Enfin, les anomalies dans des régions génomiques plus petites ou plus complexes sont plus difficiles à détecter que les aberrations dans des régions génomiques plus grandes ou moins complexes, en supposant une fraction fœtale et une profondeur de séquençage constantes.

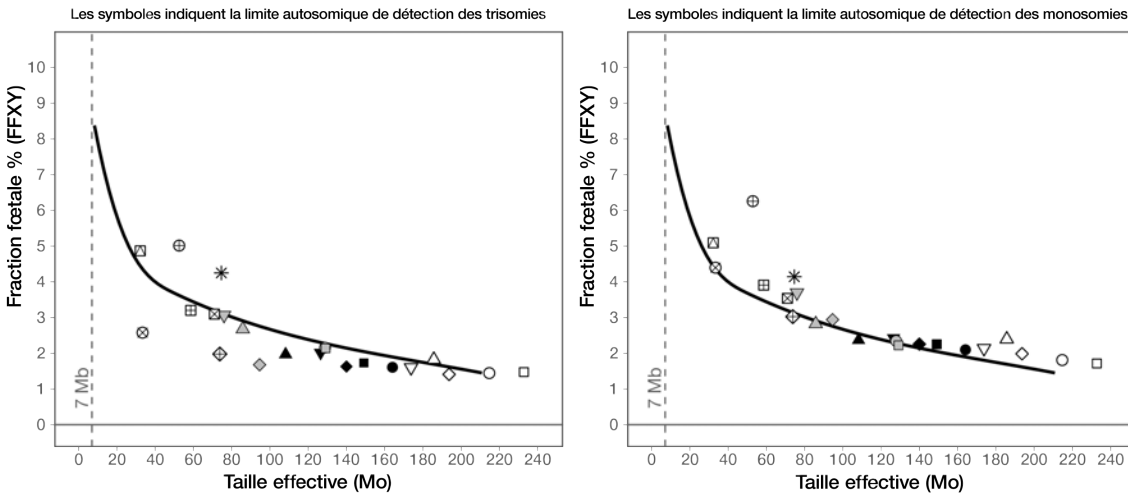
Pour déterminer la LD pour la détection de T21, des échantillons comprenant des mélanges d'échantillons de T21 groupés et d'échantillons non affectés groupés ont été analysés. Les deux types d'analytes ont été mélangés sur une série de titrages pour créer un ensemble de sept niveaux de fraction fœtale (0, 2, 3, 4, 5, 6 et 10 %). Chaque niveau était représenté par un total de 10 répliqués.

Pour augmenter davantage la résolution de la grille de fraction fœtale pour l'analyse LD, les données de cette étude ont été complétées par les données issues d'une dilution *in silico*. Les effets de la dilution expérimentale et du titrage ont été simulés par le mélange contrôlé des données de séquençage. Les données de ce titrage *in silico* couvraient un ensemble de 14 niveaux de fraction fœtale (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 et 4,50 %) avec 32 répliqués pour chaque niveau. Une analyse probit a été appliquée aux données résultantes pour déterminer la LD pour T21.

Indépendamment, un modèle statistique utilisant la fraction fœtale, la profondeur de séquençage et la taille/complexité génomique a été élaboré pour prédire la probabilité de détection de toute anomalie dans tous les échantillons. Ce modèle a été établi à partir des données correspondant à un ensemble de 1 405 échantillons XY. La LD pour T21, telle que prédite par ce modèle, concordait avec l'estimation basée sur les probits décrite ci-dessus. Ce modèle statistique a été utilisé pour estimer les valeurs de LD pour les aneuploïdies sur tous les autosomes et pour les délétions et les duplications partielles.

Figure 2 présente la probabilité de détection à 95 % pour les régions moyennes selon la taille et les limites autosomiques de détection pour toutes les trisomies et toutes les monosomies. Seuil LLR CNV 15.1.

Figure 2 Probabilités de détection à 95 % pour les régions moyennes par taille pour VeriSeq NIPT Solution v2



Chr	Symbole	Trisomie		Monosomie	
		Seuil LLR	LD (%)	Seuil LLR	LD (%)
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	Symbole	Trisomie		Monosomie	
		Seuil LLR	LD (%)	Seuil LLR	LD (%)
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

Résolution des problèmes

Résolution des problèmes relatifs à VeriSeq NIPT Solution v2

Type de défaillance	Résultat possible	Interprétation	Action recommandée	Commentaires
Entrée de plasma insuffisante	Échec du CQ de l'échantillon	Volume de plasma insuffisant.	Prélevez à nouveau	Selon l'inspection visuelle du volume de plasma.
Défaillance liée au tube de sang	Le sang n'est pas séparé en couches	L'échantillon n'a pas été centrifugé.	Assurez-vous que la centrifugeuse fonctionne et que le tube a été centrifugé à la vitesse correcte. Prélevez à nouveau l'échantillon.	
		Stockage ou transport incorrect de l'échantillon (hémolyse de l'échantillon).	Prélevez à nouveau l'échantillon.	Les échantillons congelés ne se séparent pas. De mauvaises conditions de transport ou de stockage peuvent entraîner l'hémolyse des échantillons.

Type de défaillance	Résultat possible	Interprétation	Action recommandée	Commentaires
Obstruction d'échantillons ou écoulement lent	Contamination du plasma	Les échantillons individuels peuvent obstruer la plaque de fixation s'il y a une contamination importante dans l'échantillon de plasma.	Inspectez l'échantillon. Si le plasma restant dans le tube est rouge ou laiteux, annulez l'échantillon et demandez un nouvel échantillon. Si l'échantillon semble normal, testez à nouveau l'échantillon.	
	Débordement de l'échantillon	Inspection visuelle inadéquate de chaque tube pour vérifier la pertinence de l'échantillon.	Invalidez tous les échantillons des puits voisins concernés par le débordement.	Peut indiquer que les échantillons ont été transportés ou stockés de manière inappropriée avant le traitement. Excluez les échantillons inappropriés du traitement.
	Erreur de fonctionnement du matériel	Digestion inadéquate du matériel pendant l'extraction.	Testez à nouveau l'échantillon. Si le problème persiste au même emplacement du puits avec d'autres échantillons, contactez le support technique d'Illumina.	

Type de défaillance	Résultat possible	Interprétation	Action recommandée	Commentaires
Échec du CQ de l'analyse de l'échantillon	Échec du CQ du séquençage	<p>Les causes possibles sont les suivantes :</p> <ul style="list-style-type: none"> Quantité insuffisante de matériel génétique Mauvais transfert durant la manipulation des échantillons Échec du réactif du séquençage 	Contrôlez l'annotation de l'échantillon. Vérifiez que les performances sont similaires sur les échantillons précédents en position relative sur la plaque. Testez à nouveau l'échantillon.	Indique une entrée d'échantillon insuffisante ou une erreur de transfert sur le ML STAR. Un matériel génétique insuffisant peut provenir d'ADN libre circulant en quantité insuffisante dans le plasma ou d'un ADN cellulaire provoquant une dilution excessive de l'échantillon pour le séquençage.
	Faible taux de FF ou de sites non exclus (NES)	Données produites insuffisantes pour générer un rapport précis.	Testez à nouveau à partir du plasma.	

Type de défaillance	Résultat possible	Interprétation	Action recommandée	Commentaires
Échec du CQ de la quantification	Échec de l'analyse de quantification. Médiane du lot inférieure au minimum	Rendement du processus insuffisant.	Répétez la quantification. En cas d'échec de la répétition, contactez le support technique d'Illumina.	Des mesures de courbe d'étalonnage non conformes indiquent des problèmes de préparation de la banque (p. ex. utilisation d'éthanol de qualité non biologique) ou des problèmes de quantification.
	Échec de l'analyse de quantification	Échec de la courbe d'étalonnage.	Répétez la quantification. En cas d'échec de la répétition, contactez le support technique d'Illumina.	
Échec du regroupement	Échec du regroupement des échantillons	L'analyse du regroupement n'est pas en mesure de calculer les volumes de pool appropriés.	Réévaluez la concentration du regroupement cible. Réexécutez l'analyse du regroupement.	

Résolution des problèmes relatifs à VeriSeq NIPT Microlab STAR

Étape du processus	Code d'erreur	Texte de l'erreur	Description	Solution pour l'utilisateur
Création du lot	EM0044	The Batch ID entered contains forbidden characters. (L'ID de lot saisi contient des caractères interdits.)	VeriSeq NIPT Solution v2 accepte uniquement les chiffres, les lettres, les traits de soulignement et les tirets pour tous les champs de données.	Renommez le lot en utilisant un nom qui ne contient pas de caractères spéciaux.

Étape du processus	Code d'erreur	Texte de l'erreur	Description	Solution pour l'utilisateur
Création du lot	EM0051	The Batch ID is greater than 36 characters in length. (L'ID de lot comporte plus de 36 caractères.)	VeriSeq NIPT Solution v2 limite la longueur des noms de lot à 36 caractères maximum.	Renommez le lot en utilisant un nom qui contient 36 caractères maximum.
Création du lot	EM0076	Unable to connect to VeriSeq Onsite Server v2 (Impossible de se connecter à VeriSeq Onsite Server v2)	VeriSeq Onsite Server v2 ne répond pas aux demandes de données de Workflow Manager	<ol style="list-style-type: none"> 1. Assurez-vous que le système ML STAR est connecté au réseau. 2. Assurez-vous que VeriSeq Onsite Server v2 est en fonction. 3. Vérifiez que ML STAR peut se connecter à VeriSeq Onsite Server v2 (via une requête ping). 4. Si les étapes précédentes ne permettent pas de résoudre le problème, contactez le support technique d'Illumina.
Création du lot	EM0118	This batch has been failed and cannot be further processed. (Ce lot a échoué et ne peut pas être traité ultérieurement.)	Le lot spécifié a déjà échoué et ne peut plus être traité.	L'enregistrement du lot sur le VeriSeq Onsite Server v2 indique que le lot sélectionné a échoué. Aucun autre traitement n'est autorisé. Créez un autre lot avec les échantillons requis.
Création du lot	Sans objet	This batch has already completed processing. Would you like to repool? (Le traitement de ce lot est déjà terminé. Voulez-vous regrouper à nouveau ?)	Le lot indiqué a été traité par regroupement. Le seul traitement autorisé est de regrouper de nouveau.	<p>Regroupez comme suit.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sélectionnez Re-Pool (Regrouper de nouveau). • Interrompez la méthode et assurez-vous que le nom du lot est correct avant le regroupement.

Étape du processus	Code d'erreur	Texte de l'erreur	Description	Solution pour l'utilisateur
Isolement du plasma	WP0087	Duplicate sample barcodes loaded. (Doublons des codes-barres des échantillons chargés.)	Des échantillons avec des codes-barres identiques ont été chargés sur le système.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Suivez les invites de Workflow Manager pour identifier les échantillons qui sont des doublons. 2. Supprimez les doublons et renommez-les ou remplacez-les. 3. Rechargez les échantillons.
Isolement du plasma	EP0102	Samples specified in the Sample Sheet were not loaded. (Les échantillons spécifiés dans la feuille d'échantillon n'ont pas été chargés.)	Les échantillons inclus dans la feuille d'échantillons n'ont pas été inclus dans les codes-barres chargés.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Suivez les invites de Workflow Manager pour identifier les échantillons manquants. 2. Effectuez l'une des actions suivantes : <ul style="list-style-type: none"> • Ajoutez les échantillons manquants au lot et rechargez les échantillons. • Interrompez la méthode et modifiez la feuille d'échantillons au besoin. Redémarrez la méthode.
Chargement de la plaque	Sans objet	Venus Barcode Mask Error (Erreur du masque de code-barres Venus)	Workflow Manager applique l'association plaque-lot correcte à l'aide des masques de code-barres Venus.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Vérifiez le positionnement de la plaque pour confirmer que la disposition sur la plaque est correcte. 2. Assurez-vous que la plaque chargée est la bonne plaque pour le lot indiqué.

Étape du processus	Code d'erreur	Texte de l'erreur	Description	Solution pour l'utilisateur
Extraction d'ADNlc	WE0150	Pressure in the vacuum chamber is too low. (La pression dans la chambre à vide est trop faible.)	Workflow Manager ne poursuit pas le travail si la détection de pression de la conduite de vide au repos est inférieure à 400 Torr.	<ol style="list-style-type: none">1. Vérifiez l'absence de plis ou d'autres obstructions dans la conduite de vide.2. Ouvrez les clips de dégagement de la conduite des déchets, laissez la pression s'échapper, puis fermez complètement les clips de la conduite des déchets.3. Assurez-vous que le contrôleur de vide et la pompe sont sous tension.4. Vérifiez la bouteille de déchets sous vide. Si la bouteille de déchets est plus qu'à moitié pleine, videz-la.5. Si le problème persiste, contactez le support technique d'Illumina.
Extraction d'ADNlc	WE0153	Pressure in the vacuum chamber is too high. (La pression dans la chambre à vide est trop élevée.)	Si la dépression mesurée est trop élevée avant le démarrage du contrôle de la pression, le système pourrait mal fonctionner.	À l'arrière du contrôleur, assurez-vous que toutes les connexions et conduites de dépression sont bien fixées.

Étape du processus	Code d'erreur	Texte de l'erreur	Description	Solution pour l'utilisateur
Extraction d'ADNIc	WE0996	Vacuum failed to seal. (Le vide n'a pas maintenu.)	Le problème d'échec du processus de vide doit être résolu avant de continuer	<p>Vérifiez que le problème soit résolu avant de sélectionner OK.</p> <ol style="list-style-type: none">1. Vérifiez si la plaque de fixation est bien alignée contre le collecteur de vide. Avec une main gantée, appuyez avec force sur la plaque de fixation.2. Notez le bruit de mise en place du vide et observez le débit d'eau à travers la plaque de liaison.3. Ouvrez la vue « Trace » (Suivi) dans Workflow Manager. Une fois que la mesure de pression réelle atteint au moins 50 unités de pression de moins que la mesure ambiante, sélectionnez OK pour continuer avec l'extraction d'ADNIc.4. Si le relevé de pression requis n'est pas atteint pendant le temps imparti, sélectionnez OK pour continuer avec le premier chargement du lysat.5. Interrompez le procédé après la distribution du lysat sur la plaque de fixation. Remplacez la plaque de fixation et appuyez avec force sur celle-ci.6. Si le lysat ne s'écoule pas à travers la plaque, contactez le support technique Illumina.

Étape du processus	Code d'erreur	Texte de l'erreur	Description	Solution pour l'utilisateur
Extraction d'ADNlc	WM0219	If Vacuum is on, manually rest the pump. (Si le vide est activé, interrompez manuellement la pompe.)	Le vide peut rester activé après l'interruption d'une méthode pendant l'extraction.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sur le contrôleur de vide, appuyez sur le bouton Power (Marche/Arrêt) pour arrêter le vide. 2. Attendez 10 secondes, puis appuyez de nouveau sur le bouton Power (Marche/Arrêt) pour réactiver le vide.
Extraction d'ADNlc	EE0477	An error has occurred while moving a plate. (Une erreur s'est produite lors du déplacement d'une plaque.) (Erreur iSWAP)	Si une erreur iSWAP est rencontrée (chute de plaque, échec du prélèvement, etc.), le système vous invite à terminer le déplacement de la plaque manuellement.	<p>Assurez-vous que la plaque peut être récupérée (pas de déversement)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Si la plaque ne peut pas être récupérée, interrompez l'analyse. • Si la plaque peut être récupérée, suivez les instructions affichées pour effectuer le transfert de plaque manuellement.
Extraction d'ADNlc	EE0519	Scanned barcode does not match Binding Plate barcode on record. (Le code-barres scanné ne correspond pas au code-barres de la plaque de fixation enregistré.)	La plaque de fixation chargée ne correspond pas au code-barres de la plaque retirée.	Assurez-vous que la plaque en cours de chargement correspond au code-barres enregistré (voir le registre des événements pour connaître le code-barres attendu).

Étape du processus	Code d'erreur	Texte de l'erreur	Description	Solution pour l'utilisateur
API	EA0372	Unable to connect to the data server. (Impossible de se connecter au serveur des données.)	VeriSeq Onsite Server v2 ne répond pas aux demandes de données de Workflow Manager.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Assurez-vous que le système ML STAR est connecté au réseau. 2. Assurez-vous que VeriSeq Onsite Server v2 est en fonction. 3. Vérifiez que ML STAR peut se connecter à VeriSeq Onsite Server v2 (via une requête ping).
	EA0774	Connection Error. The API server connection failed to validate. (Erreur de connexion. La connexion au serveur API n'a pas pu être validée.)	VeriSeq Onsite Server v2 ne répond plus aux demandes de données de Workflow Manager	<ol style="list-style-type: none"> 1. Assurez-vous que le système ML STAR est connecté au réseau. 2. Vérifiez que ML STAR peut se connecter à VeriSeq Onsite Server v2 (via une requête ping). 3. Assurez-vous que VeriSeq Onsite Server v2 est en fonction.
	EA0780	403 : Invalid Request The current transaction is not valid.	The data sent violates the system workflow logic. (Demande non valide. La transaction actuelle n'est pas valide. Les données envoyées enfreignent la logique du flux de travail du système.)	Consultez les détails de l'erreur pour plus d'informations. Les causes courantes impliquent des entrées trop longues ou qui ne respectent pas la liste de caractères acceptables.

Références

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.

Historique des révisions

Document	Date	Description de la modification
Document n° 1000000078751 v09	Avril 2024	<p>Retiré</p> <ul style="list-style-type: none"> • Référence 20030577 obsolète. • Capacité de tube maximale requise pour la centrifugeuse de tubes de prélèvement sanguin. <p>Ajouté</p> <ul style="list-style-type: none"> • Nouvelle référence 20101927 pour VeriSeq Onsite Server v2. • Unité de dimensions pour les tubes de prélèvement sanguin de 10 ml. • Clarification sur les versions compatibles de SoftMax Pro. • Note de clarification indiquant que seuls des articles en plastique compatibles doivent être utilisés pour assurer l'interchangeabilité avec VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Remarque concernant l'avertissement relatif à la contamination de l'adjuvant d'échantillon dans la section Interprétation des résultats. • Mise en garde ne congelez pas les échantillons de sang total prélevés sous Streck Cell-Free DNA BCT. • Mise en garde pour éviter l'exposition de l'échantillon à des températures élevées. • Clarification concernant les limites du test et les conditions de reproductibilité. • Clarification de la valeur limite de détection des LLR CNV à la Figure 2 de la section Limite de détection. <p>Mise à jour</p> <ul style="list-style-type: none"> • Référence de cuve de réactif compatible du tube de réactif Roche au tube de réactif Illumina et ajout d'une nouvelle référence. • Thermo Fisher Multifuge X4 Pro-MD référence 75016034. • Déclaration d'avertissement : des volumes de puits incohérents peuvent entraîner l'échec du CQ automatisé des échantillons. • Référence aux notices de l'appareil.
Document n° 1000000078751 v08	Août 2022	<p>Mise à jour du numéro de pièce du flux de production</p> <p>Suppression de l'instruction de pipeter pour mélanger si la plaque de banque était congelée.</p>

Document	Date	Description de la modification
Document n° 1000000078751 v07	Mai 2022	<p>Division des limitations de la procédure dans VeriSeq NIPT Solution v2 Reporting et inclusion des deux premières puces. Texte restant dans un nouvel en-tête Limitations du dosage.</p> <p>Retiré</p> <ul style="list-style-type: none"> • VeriSeq de toutes les étiquettes de réactifs. • Appliquez un code-barres sur la plaque VeriSeq NIPT Adapter Plate dans Préparation des banques. <p>Ajouté</p> <ul style="list-style-type: none"> • Le mot certifié pour l'eau sans DNase/RNase. • L'un des lecteurs de microplaques suivants, ou équivalent, et SpectraMax M2, M3, M4, M5 et remarque. • À la section VeriSeq NIPT Microlab STAR pour expliquer ce qu'il faut faire lors d'un événement de gestion d'erreur. • Une remarque pour inspecter visuellement les puits. • Instructions pour les lots de 24 et 48 échantillons dans toutes les sections du protocole. • Étapes pour savoir quand utiliser la plaque d'adaptation violette ou équivalente. • Le texte de la section Données démographiques et Caractéristiques de la grossesse doit inclure les résultats de la grossesse du premier trimestre. • Une puce aux spécifications de la plaque à puits profonds pour inclure la résistance au couple. <p>Mise à jour</p>
		<ul style="list-style-type: none"> • Texte pour des noms de lots uniques pour plus de clarté et inclure un exemple. • Symboles et formatation pour les remarques, les mises en garde et les avertissements. • Résultats des sous-puces de test. • Thiocyanate de guanidine en chlorhydrate de guanidine. • CVS à BVS (système de vide de base) • Le texte pour l'utilisation de dépistage à l'échelle du génome et du score LLR. • Spécifications : Spécifications des cuves à réactifs, plaques à puits profonds, plaques 384 puits, plaques 96 puits
Document n° 1000000078751 v06	Août 2021	Mise à jour de l'adresse du représentant autorisé de l'UE.

Document	Date	Description de la modification
Document n° 1000000078751 v05	Décembre 2020	<p>Mise à jour des sections Principes de procédure, Mises en garde et précautions, et Étiquetage des produits avec des clarifications supplémentaires pour répondre aux demandes réglementaires.</p> <p>Mises à jour mineures du contenu du protocole pour correspondre au style et à l'organisation actuels d'Illumina.</p> <p>Correction de la description du chromosome 21 comme « deuxième plus petit autosome humain » à « plus petit autosome humain » dans la section Précision de Performance analytique.</p> <p>Ajout de mises en garde pour traiter de l'utilisation inappropriée des réservoirs et des risques d'amalgamation des échantillons aux sections Isolement du plasma – Préparation et Interprétation des résultats.</p> <p>Ajout de nouvelles références de serveur et de logiciel pour la publication de nouveaux modèles de serveur et de mises à jour de références de logiciel.</p> <p>Ajout de mises en garde aux informations de protocole et de résolution de problèmes pour traiter et prévenir les débordements d'échantillons.</p> <p>Mise à jour des ingrédients actifs dans le réactif DNA Quantification Standard dans la boîte d'accessoires pour les aligner sur la fiche de données de sécurité.</p> <p>Mise à jour des conventions de dénomination du module Local Run Manager VeriSeq NIPT pour assurer la cohérence avec les autres documentations.</p> <p>Ajout d'un historique des révisions.</p>
Document n° 1000000078751 v04	Octobre 2020	Corrections mineures.
Document n° 1000000078751 v03	Septembre 2020	Mise à jour de la liste des matériels pour présenter les spécifications des consommables de laboratoire ainsi que les options compatibles connues.

Document	Date	Description de la modification
Document n° 1000000078751 v02	Février 2020	<p>Mise à jour de la présentation des informations sur les performances cliniques afin de mieux faire comprendre les différences entre les types de dépistage de base et pangénomique.</p> <p>Ajout d'une nouvelle section sur les différences de performance entre le dépistage de base et le dépistage pangénomique.</p> <p>Suppression des informations contradictoires sur le caractère facultatif du rapport complémentaire de la section Principes de procédure.</p> <p>Mise à jour de la convention de dénomination du logiciel VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 tout au long du document pour une cohérence stylistique.</p> <p>Mise à jour de l'étiquetage des adresses d'Australie et d'Illumina Pays-Bas pour refléter les changements récents.</p>
Document n° 1000000078751 v01	Août 2019	Suppression de l'étape dupliquée dans Extraction d'ADNIc causée par une erreur du logiciel de publication.
Document n° 1000000078751 v00	Mai 2019	Publication initiale.

Brevets et marques de commerce

Ce document et son contenu sont exclusifs à Illumina, Inc. et ses filiales (« Illumina ») et sont exclusivement destinés à un usage contractuel de ses clients en lien avec l'utilisation du ou des produits décrits dans la présente et à aucune autre utilisation. Ce document et son contenu ne seront pas utilisés ou distribués dans tout autre but et/ou autrement communiqués, divulgués ou reproduits de quelque manière que ce soit sans l'autorisation préalable et écrite d'Illumina. Par le biais de ce document, Illumina ne fournit aucune licence sur ses droits de brevets, de marques, d'auteur ou tout autre droit commun, ni aucun droit semblable de tierces parties.

Les instructions présentes dans ce document doivent être strictement et explicitement respectées par du personnel qualifié et correctement formé afin d'assurer une utilisation sûre et correcte du ou des produits décrits dans la présente. Tout le contenu de ce document doit être entièrement lu et compris avant d'utiliser le ou les produits.

LE FAIT DE NE PAS LIRE ENTièrement ET DE NE PAS SUIVRE EXPLICITEMENT TOUTES LES INSTRUCTIONS CONTENUES DANS LA PRÉSENTE PEUT CAUSER DES DOMMAGES AU OU AUX PRODUITS, DES BLESSURES AUX PERSONNES, Y COMPRIS AUX UTILISATEURS OU À D'AUTRES PERSONNES, ET DES DOMMAGES À D'AUTRES BIENS, ET ANNULERA TOUTE GARANTIE APPLICABLE AU OU AUX PRODUITS.

ILLUMINA DÉCLINE TOUTE RESPONSABILITÉ EN CAS DE DOMMAGE CAUSÉ PAR UNE MAUVAISE UTILISATION DU OU DES PRODUITS DÉCRITS DANS LA PRÉSENTE (Y COMPRIS DES PARTIES DE CELLE-CI OU LE LOGICIEL).

© 2024 Illumina, Inc. Tous droits réservés.

Toutes les marques sont la propriété d'Illumina, Inc. ou de leurs propriétaires respectifs. Pour plus d'informations sur les marques déposées, consultez la page www.illumina.com/company/legal.html.

Coordonnées



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, Californie 92122 États-Unis
+(1) 800 809 ILMN (4566)
+(1) 858 202 4566 (en dehors de l'Amérique du Nord)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Promoteur australien

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

Étiquette du produit

Pour obtenir des informations détaillées sur les symboles susceptibles d'apparaître sur l'emballage et l'étiquette du produit, consultez la légende des symboles pour votre kit dans l'onglet *Documentation* à l'adresse support.illumina.com.

Un résumé de la sécurité et des performances (SSP) est disponible à l'adresse

<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>, après le lancement de la base de données européenne sur les dispositifs médicaux (Eudamed). Il est lié à l'UDI-DI de base (0081627002NIPTRP).