

Prospect

PENTRU DIAGNOSTIC IN VITRO.

Utilizarea preconizată

VeriSeq™ NIPT Solution v2 este un test de diagnosticare *in vitro* destinat utilizării ca test de screening pentru detectarea anomaliilor genetice genomice ale fătului din probe de sânge integral periferic matern recoltat de la femei însărcinate cu vârsta gestațională de cel puțin 10 săptămâni. VeriSeq NIPT Solution v2 utilizează secvențierea completă a genomului pentru a detecta duplicările și delețiile parțiale pentru toți autozomii și starea aneuploidiei pentru toți cromozomii. Testul oferă o opțiune de a solicita raportarea aneuploidiei cromozomului sexual (SCA). Se interzice utilizarea produsului ca bază unică de diagnosticare sau pentru alte decizii de gestionare a sarcinii.

VeriSeq NIPT Solution v2 include: VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 pentru VeriSeq NIPT Microlab STAR, kiturile VeriSeq NIPT Sample Prep Kit și serverul VeriSeq Onsite Server v2 cu VeriSeq NIPT Assay Software v2. VeriSeq NIPT Solution v2 este destinată utilizării împreună cu un sistem de secvențiere de generație nouă.

Rezumatul și explicarea testului

Anomaliile cromozomiale fetale, în special aneuploidia, care reprezintă un număr anormal de cromozomi, sunt o cauză frecventă a problemelor reproductive, a anomaliilor congenitale, a întârzierii de dezvoltare și a dizabilităților intelectuale. Aneuploidia afectează aproximativ 1 din 300 de nașteri de feți vii, cu frecvență mult mai mare asociată avorturilor spontane și nașterii după deces in utero.^{1,2} Până de curând, au existat două tipuri de teste prenatale pentru aceste afecțiuni: testarea de diagnosticare sau screeningul. Testarea de diagnosticare implică proceduri invazive de tipul amniocentezei sau prelevarea de vil corionic. Aceste metode de testare sunt considerate standardul de bază pentru detectarea aneuploidiei fetale. Cu toate acestea, sunt asociate unui risc de pierdere a sarcinii între 0,11% și 0,22%.³ Screeningurile convenționale cu markeri multipli nu implică risc de pierdere a sarcinii, deoarece sunt neinvazive, dar sunt mai puțin precise decât testele de diagnosticare. Ratele de detectare pentru trisomia 21 variază între 69 și 96%, în funcție de screeningul specific, de vârsta mamei și de vârsta gestațională la testare.⁴ Un aspect important este că au rate fals pozitive de aproximativ 5%, ceea ce poate duce la testarea de diagnosticare invazivă pentru confirmare și, astfel, la riscul de pierdere a sarcinii din cauza procedurii.⁴ Screeningurile ecografice pot detecta, la rândul lor, anomaliile cromozomiale, dar certitudinea lor este chiar mai redusă decât a metodelor antemenționate.

Aneuploidia fetală pentru cromozomii 21, 18 și 13, X și Y poate fi detectată cu un grad ridicat de precizie prin testarea prenatală neinvazivă (NIPT), folosind secvențierea genomică a ADN-ului acelular (cfADN) obținut din plasmă maternă la o vârstă gestațională mai mare sau egală cu 10 luni. O meta-analiză recentă a mai multor studii clinice a raportat rate ponderate cumulate de detectare și specificități pentru trisomia 21 și trisomia 18 la sarcinile cu făt unic după cum urmează: trisomia 21 99,7% și 99,96% și trisomia 18 97,9% și respectiv 99,96%.⁵ Un studiu sugerează că utilizarea NIPT ca screening principal pentru toate sarcinile ar putea duce la o reducere cu 89% a numărului de proceduri invazive de confirmare.⁶

Dată fiind reducerea semnificativă a ratelor fals pozitive cu NIPT comparativ cu screeningul convențional cu markeri multipli, numeroase organizații medicale de specialiști au produs declarații de sprijin pentru indicațiile de utilizare a NIPT.

Mai specific, International Society for Prenatal Diagnosis, American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) /Society for Maternal Fetal Medicine (SMFM), American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) și European Society of Human Genetics/American Society of Human Genetics sprijină asigurarea NIPT pentru toate femeile însărcinate.^{7,8,9} Se recomandă consilierea anterioară testării, consimțământul informat și testarea de diagnosticare pentru confirmarea unui rezultat de screening cfADN pozitiv.⁴

VeriSeq NIPT Solution v2 este un test de diagnosticare neinvazivă in vitro (IVD) care utilizează secvențierea genomică a fragmentelor de cfADN derivate din specimene de sânge integral periferic matern de la femei însărcinate cu vârstă gestațională de cel puțin 10 săptămâni. Testul oferă două opțiuni pentru tipurile de screening: de bază și genomic. Screeningul de bază furnizează informații privind starea aneuploidiei doar pentru cromozomii 21, 18, 13, X și Y. Screeningurile genomice furnizează duplicările și delețiile parțiale pentru toți autozomii și starea aneuploidiei pentru toți cromozomii. Ambele tipuri de screening oferă opțiunea de raportare a aneuploidiei cromozomului sexual (SCA), cu sau fără raportarea sexului fătului. Opțiunea de raportare pentru SCA poate fi dezactivată. Dacă opțiunea de raportare pentru SCA este dezactivată, nu se raportează nici sexul fătului. Pentru mai multe informații privind opțiunile de raportare a sexului, consultați Ghid software pentru VeriSeq NIPT Solution v2 (nr. document 1000000067940).

Principiile procedurii

VeriSeq NIPT Solution v2 este o soluție automată de testare NIPT de laborator, care constă din pregătirea automată a specimenului și analiza datelor de secvențiere. VeriSeq NIPT Sample Prep Kit sunt reactivi specializați de unică folosință, utilizați împreună cu VeriSeq NIPT Microlab STAR pentru a pregăti loturi de 24, 48 sau 96 de specimene pentru secvențierea de nouă generație. Toate datele de secvențiere genomică la ambele capete sunt analizate de un software specializat, VeriSeq NIPT Assay Software v2, generându-se un raport cu rezultatele calitative.

Fluxul de lucru constă din următoarele proceduri: colectarea specimenelor, izolarea plasmei, extragerea cfADN, pregătirea bibliotecii, cuantificarea bibliotecii, cumulara bibliotecii, secvențierea și analiza, prezentate mai detaliat:

- **Colectarea specimenului**– 7-10 ml de sânge integral periferic matern se colectează într-o eprubetă Streck pentru recoltarea de sânge (BCT) pentru ADN liber circulant, care previne liza celulei și contaminarea genomică și stabilizează sângele integral.
- **Izolarea plasmei** – în termen de 5 zile de la colectare, plasma este izolată de sângele integral periferic matern, cu tehnici de centrifugare standard. VeriSeq NIPT Microlab STAR aspiră și dispensează plasma într-o placă cu godeuri adânci, cu 96 de godeuri, pentru procesarea ulterioară. În cazul în care este necesară retestarea, speciemenele pentru post-procesare se pot închide din nou cu capacul și depozita la 4°C pentru încă alte 5 zile (până la un număr total de 10 zile de la recoltarea de sânge).

**ATENȚIE**

Depășirea perioadei de depozitare menționate anterior poate afecta ratele de eșec individuale ale speciimenelor.

- **Extracția cfADN** – purificarea cfADN din plasmă se realizează prin absorbția pe o placă de fixare, spălarea plăcii de fixare pentru eliminarea contaminanților și eluare.
- **Pregătirea bibliotecii** – fragmentele de cfADN purificat sunt supuse unui proces de reparare a capetelor pentru a transforma prelungirile 5' și 3' în extremități cu extensie homopolimerică. Apoi se adaugă o nucleotidă de deoxiadenozină la extremitățile 3' pentru a crea o prelungire cu bază unică. Adaptoarele indexate cu o singură prelungire 3' pe bază de deoxitimidină sunt apoi legate la fragmente de cfADN procesate. ADN-ul legat este purificat folosind bilele de imobilizare inversă pentru fază solidă. Fiecare specimen dintr-un set de 24, 48 sau 96 primește un adaptor indexat unic. Adaptoarele servesc următoarelor 2 scopuri:

**ATENȚIE**

Procedați cu extremă atenție pentru a evita contaminarea încrucișată a indecșilor, care poate duce la rezultate incorecte.

- Indexările permit identificarea speciimenelor în secvențierea ulterioară.
- Adaptoarele de indexare conțin secvențe care permit captarea bibliotecii pe o suprafață solidă a unei Flow Cell de secvențiere pentru generarea de clustere și secvențiere ulterioară.
- **Cuantificare** – produsul Bibliotecă este cuantificat cu colorant fluorescent în concentrație determinată comparativ cu o curbă ADN standard.
- **Cumularea și secvențierea bibliotecii** – bibliotecile de specimene sunt cumulate în grupe de 24 sau 48 de specimene în cantități ajustate pentru minimizarea variației în acoperire. Fiecare grup este apoi secvențiat cu un secvențiator de ultimă generație.
- VeriSeq NIPT Solution v2 nu include echipamentul de secvențiere și consumabile.
- **Analiză** – pentru fiecare specimen, analiza constă din următoarele:
 - Identificarea fragmentelor bibliotecii prin secvențiere și alinierea indexului pentru citirile cu secvențiere la ambele extremități la un genom de referință uman.
 - Estimarea fracției fetale a bibliotecii prin combinarea informațiilor din coordonatele de lungime și genomice ale fragmentelor bibliotecii.
 - După contorizarea pentru decalajele cunoscute, un model statistic detectează regiunile genomului care sunt sub sau suprareprezentate în bibliotecă, similar unei anomalii la nivelul estimat al fracției fetale.
 - Raportul NIPT prezintă rezumatul pentru meniul de testare selectat, afișând ANOMALY DETECTED (Anomalie detectată) sau NO ANOMALY DETECTED (Nicio anomalie detectată) împreună cu o estimare a fracției fetale pentru speciimenele conforme la CC.
 - Raportul suplimentar prezintă valorile cantitative care caracterizează fiecare anomalie detectată.

Limitările procedurii

Limitările testului

- Dovezile în sprijinul sensibilității și specificității acoperă sarcinile cu făt unic și gemelare. Aceste instrucțiuni de utilizare nu furnizează date privind sensibilitatea și specificitatea pentru tripleți sau sarcini de ordin superior.
- VeriSeq NIPT Solution v2 nu este destinată detectării poliploidilor, ca, de exemplu, triploidia.
- VeriSeq NIPT Solution v2 nu este destinată detectării rearanjărilor cromozomiale echilibrate.
- Pentru test sunt necesare specimene de sânge integral periferic matern de la femei însărcinate, cu vârstă gestațională de cel puțin 10 săptămâni.
- Pentru screeningurile de bază, testul VeriSeq NIPT Solution v2 caută anomaliile cromozomiale specifice. Rezultatele raportate drept NO ANOMALY DETECTED (Nicio anomalie detectată) nu elimină posibilitatea unor anomalii cromozomiale ale cromozomilor testați. Un rezultat negativ nu elimină posibilitatea ca sarcina să prezinte alte anomalii cromozomiale, afecțiuni genetice sau defecte congenitale (de ex., defect de tub neural deschis).
- Pentru screeningurile genomice, delețiile și duplicările de mari dimensiuni mai mici de 75% din dimensiunea cromozomului pot să indice aneuploidie cromozomială totală.
- Pentru screeningurile genomice, anumite zone sunt excluse din analiză. O listă cu astfel de regiuni excluse este disponibilă pe site-ul web de asistență Illumina. Detectarea anomaliilor genomice se efectuează doar pe regiunile neexcluse.
- Raportarea sexului fătului nu este disponibilă în toate regiunile din cauza reglementărilor locale privind raportarea sexului.
- Pe baza literaturii de specialitate, rezultatele la screeningul pe bază pentru ADN acelular pot fi confuze din cauza unor factori materni și fetali. Unii factori sunt enumerați în continuare, neexhaustiv:
 - Transfuzie de sânge recentă la mamă
 - Transplant anterior de organe/celule stem la mamă
 - Boală autoimună a mamei
 - Neoplasme (benigne și maligne) ale mamei
 - Mozaicism matern
 - Variații ale numărului de copii la mamă
 - Mozaicism feto-placentar/mozaicism placentar circumscris
 - Deces fetal intrauterin/geamăn absorbit

VeriSeq NIPT Solution v2

- VeriSeq NIPT Solution v2 este un test de screening, de care să nu se țină seama independent de alte rezultate clinice și ale testelor. Concluziile privind starea fătului și deciziile privind gestionarea sarcinii nu trebuie să se bazeze doar pentru rezultatele screeningului NIPT.⁷
- VeriSeq NIPT Solution v2 raportează privind următoarele:
 - Screeningul de bază testează suprareprezentarea cromozomilor 13, 18 și 21
 - Screeningul genomic testează sub și suprareprezentarea tuturor autozomilor, inclusiv delețiile și duplicările parțiale de cel puțin 7 Mb.
 - La sarcinile cu făt unic cu Yes (Da) sau SCA selectate drept opțiune de raportare a sexului, următoarele anomalii ale cromozomului sexual: XO, XXX, XXY și XYY.
 - La sarcinile cu făt unic cu Yes (Da) selectat drept opțiune de raportare a sexului, se raportează sexul fetal.
 - Prezența cromozomului Y la sarcinile gemelare.

Componentele produsului

VeriSeq NIPT Solution v2 (nr. piesă 20030577) constă din următoarele kituri de pregătire a specimenelor:

- Kit de pregătire specimen VeriSeq NIPT (24 de specimene) (nr. piesă 20025895)
- Kit de pregătire specimen VeriSeq NIPT (48 de specimene) (nr. piesă 15066801)
- Kit de pregătire specimen VeriSeq NIPT (96 de specimene) (nr. piesă 15066802)

VeriSeq NIPT Solution v2 (nr. piesă 20030577) constă din următoarele componente software:

- VeriSeq NIPT Assay Software v2 (nr. piesă 20047024), preinstalat pe serverul local VeriSeq v2.
 - Serverul local VeriSeq v2 (nr. piesă 20028403 sau 20047000) sau un server local VeriSeq (nr. piesă 15076164 sau 20016240) existent, căruia i s-a făcut upgrade la v2.
- VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 (nr. piesă 20044988), preinstalat pe VeriSeq NIPT Microlab STAR
 - VeriSeq NIPT Microlab STAR (nr. piesă Hamilton Company Reno: 95475-01 (115 V) și 95475-02 (230 V), Hamilton Company Bonaduz: 806288)
- Modulul Local Run Manager al VeriSeq NIPT (nr. piesă 20044989)

Reactivi

Reactivi furnizați

Illumina furnizează următorii reactivi: VeriSeq Sample Prep Kit (24 de specimene) (nr. piesă 20025895), VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (48 de specimene) (nr. piesă 15066801) și VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (96 de specimene) (nr. piesă 15066802). Kiturile de pregătire a specimenelor VeriSeq NIPT sunt configurate pentru

utilizare împreună cu ML STAR (nr. piesă 95475-01, 95475-02 sau 806288), furnizat de Hamilton Company.

VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, casetă de extracție

Tabel 1 VeriSeq NIPT, casetă de extracție(24) și (48), nr. piesă 20025869 și 15066803

Numele reactivului de pe etichetă	Numărul de recipiente din set	Ingrediente active	Depozitare
Soluție tampon de liză	1	Guanidină clorhidrat în soluție apoasă tamponată	între 15°C și 30°C
Soluție tampon de spălare I	1	Guanidină clorhidrat și 2-propanol în soluție apoasă tamponată	între 15°C și 30°C
Soluție tampon de spălare II	1	Soluție apoasă tamponată de săruri	între 15°C și 30°C
Soluție tampon de eluare	1	Soluție apoasă tamponată	între 15°C și 30°C
Soluție tampon de proteinază	1	Glicerol în soluție apoasă tamponată	între 15°C și 30°C
Proteinază K	3	Proteinază K liofilizată	între 15°C și 30°C

Tabel 2 VeriSeq NIPT, casetă de extracție (96), nr. piesă 15066807

Numele reactivului de pe etichetă	Numărul de recipiente din set	Ingrediente active	Depozitare
Soluție tampon de liză	1	Guanidină clorhidrat în soluție apoasă tamponată	între 15°C și 30°C
Soluție tampon de spălare I	1	Guanidină clorhidrat și 2-propanol în soluție apoasă tamponată	între 15°C și 30°C
Soluție tampon de spălare II	2	Soluție apoasă tamponată de săruri	între 15°C și 30°C
Soluție tampon de eluare	1	Soluție apoasă tamponată	între 15°C și 30°C
Soluție tampon de proteinază	1	Glicerol în soluție apoasă tamponată	între 15°C și 30°C
Proteinază K	4	Proteinază K liofilizată	între 15°C și 30°C

VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, casetă de pregătire a bibliotecii

Tabel 3 VeriSeq NIPT, casetă de pregătire a bibliotecii, (24) și (48), nr. piesă 20026030 și 15066809

Numele reactivului de pe etichetă	Numărul de recipiente din set	Ingrediente active	Depozitare
Amestec de reparare capăt	1	Polimerază ADN și dNTP-uri în soluție apoasă tamponată	între -25°C și -15°C
Amestec de poliadenilare	1	Polimerază ADN și dATP în soluție apoasă tamponată	între -25°C și -15°C
Amestec de legare	1	Ligază ADN în soluție apoasă tamponată	între -25°C și -15°C
Soluție tampon de hibridizare	1	Soluție apoasă tamponată	între -25°C și -15°C
Placă adaptor ADN NIPT	1	Oligonucleotide în soluție apoasă tamponată	între -25°C și -15°C

Tabel 4 VeriSeq NIPT, casetă de pregătire a bibliotecii (96), nr. piesă 15066810

Numele reactivului de pe etichetă	Numărul de recipiente din set	Ingrediente active	Depozitare
Amestec de reparare capăt	1	Polimerază ADN și dNTP-uri în soluție apoasă tamponată	între -25°C și -15°C
Amestec de poliadenilare	2	Polimerază ADN și dATP în soluție apoasă tamponată	între -25°C și -15°C
Amestec de legare	2	Ligază ADN în soluție apoasă tamponată	între -25°C și -15°C
Soluție tampon de hibridizare	1	Soluție apoasă tamponată	între -25°C și -15°C
Placă adaptor ADN NIPT	1	Oligonucleotide în soluție apoasă tamponată	între -25°C și -15°C

VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, casetă accesorii

Tabel 5 VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, casetă accesorii, nr. piesă 15066811

Numele reactivului de pe etichetă	Numărul de recipiente din set	Ingrediente active	Depozitare
Placă de fixare a ADN-ului	1	Microplacă de propilenă cu membrană de silicon modificată	între 2°C și 8°C
Soluție tampon de resuspendare	1	Soluție apoasă tamponată	între 2°C și 8°C
Bile de purificare specimen	1	Bile paramagnetice pentru fază solidă în soluție apoasă tamponată	între 2°C și 8°C
Reactiv de cuantificare ADN	1	Colorant de intercalare ADN în DMSO	între 2°C și 8°C
Standard de cuantificare ADN	1	Standard dsADN, ADN nespecific și azidă de sodiu în soluție apoasă tamponată	între 2°C și 8°C

VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, eprubete și etichete pentru fluxul de lucru

Tabel 6 Eprubete și etichete pentru fluxul de lucru, nr. piesă 15071543

Numele articolului de pe etichetă	Numărul de articole din kit	Depozitare
Etichetă (LBL) - cod de bare placă	9	între 15°C și 30°C
Etichetă (LBL) - cod de bare placă cu godeuri adânci	12	între 15°C și 30°C
Eprubetă (TB) - eprubetă de cumulare goală	5	între 15°C și 30°C

Reactivi nefurnizați

Reactivi obligatorii, nefurnizați

- Reactivii de secvențiere și consumabilele necesare pentru sistemul de secvențiere de generație nouă (NGS)
- Apă certificată fără ADnază/ARNază, pentru biologie moleculară
- Etanol, 100% (200 proof), pentru biologie moleculară

NOTĂ Etanolul inadecvat pentru biologie moleculară poate afecta negativ performanța testului.

Reactivi opționali, nefurnizați

- Ser fiziologic tamponat cu fosfat Dulbecco (DPBS) pentru controlul fără șablon (NTC)

Depozitare și manipulare

1. Temperatura camerei este definită ca fiind intervalul dintre 15°C și 30°C.
2. Toți reactivii sunt de unică folosință. După ce reactivii sunt pregătiți de utilizare, trebuie folosiți imediat.
3. Dacă orice ambalaj sau conținut al componentelor VeriSeq NIPT Solution este deteriorat sau compromis, luați legătura cu departamentul Asistență clienți Illumina.
4. Reactivii sunt stabili dacă sunt depozitați conform indicațiilor până la data de valabilitate specificată pe etichetele kiturilor. Pentru condițiile de depozitare, consultați coloana Depozitare din tabele din secțiunea [Reactivi](#). Nu utilizați reactivi expirați.
5. Modificările aspectului fizic al reactivilor furnizați pot indica deteriorarea materialelor. Dacă apar modificări ale aspectului fizic (ca, de exemplu modificări evidente ale culorii reactivilor sau tulburare vizibilă cu contaminare microbiană), nu folosiți reactivii.
6. Respectați cele mai bune practici următoare la manipularea bilelor de purificare a speciimenelor:
 - Nu congelați niciodată bilele.
 - Lăsați bilele să ajungă la temperatura camerei înainte de utilizare.
 - Imediat înainte de utilizare, agitați în agitator vortex bilele până când sunt corect suspendate și culoarea pare omogenă.
7. Soluția tampon de liză, soluția tampon de spălare I, soluția tampon de spălare II, soluția tampon de eluare și soluția tampon de proteinază pot forma precipitate sau cristale vizibile. Înainte de utilizare, agitați viguros în agitator vortex și apoi inspectați vizual pentru a vă asigura că nu prezintă precipitare.
8. Nu congelați niciodată sângele integral după recoltare.
9. Secvențiați bibliotecile cât mai curând posibil după cumulare. Bibliotecile cumulate sunt stabile timp de până la 7 zile la temperaturi între -25°C și -15°C. Nu este necesară nicio denaturare suplimentară dacă sunt depozitate această perioadă în condițiile respective.

Echiptamente și materiale

Echiptamente și materiale obligatorii, nefurnizate

Echiptamente obligatorii, nefurnizate

Echiptament	Furnizor
<p>Sistem de secvențiere de ultimă generație (NGS) cu următoarele funcții:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Secvențiere la ambele capete-de 2 x 36 bp • Compatibil cu adaptoarele pentru indexare dublă VeriSeq NIPT Sample Prep Kit • Creare automată de fișiere BCL • Analiză chimică pe canal dublu • 400 de milioane de citiri cu secvențiere la ambele-capete per ciclu • Compatibil cu VeriSeq NIPT Assay Software v2 sau un sistem de secvențiere NextSeq 550Dx. 	Furnizorul instrumentului sau Illumina, nr. piesă 20005715
Congelator, între -25°C și -15°C	Furnizor general pentru laboratoare
Microcentrifugă	Furnizor general pentru laboratoare
Portpipetă	Furnizor general pentru laboratoare
Frigider, între 2°C și 8°C	Furnizor general pentru laboratoare
Pipete monocanal-de 20 μl	Furnizor general pentru laboratoare
Pipete monocanal-de 200 μl	Furnizor general pentru laboratoare
Pipete monocanal-de 1000 μl	Furnizor general pentru laboratoare
Agitator vortex	Furnizor general pentru laboratoare
<p>Ansamblu centrifugă/rotor pentru eprubete de recoltare a sângelui</p> <p>Echivalente:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Centrifugă cu răcire, forță centrifugă maximă 1600 × g, cu opțiune fără frânare • Rotor cu cupe basculante și cupe • Inserturi pentru cupe cu adâncime minimă de 76 mm • Adaptoare pentru inserturi pentru eprubete de recoltare a sângelui de 16 mm x 100 mm 	Furnizor general pentru laboratoare

Echipament	Furnizor
<p>Recomandate:</p> <ul style="list-style-type: none"> Centrifugă Allegra seria X12R, 1600 g Rotor de centrifugă Allegra GH-3.8 cu cupe Capace de cupe pentru centrifuga Allegra, set de două Ansamblu adaptoare pentru centrifuga Allegra, 16 mm, set de patru 	<p>Beckman Coulter, nr. articol 392304 (120 V sau 230 V)</p> <p>Beckman Coulter, nr. articol 369704</p> <p>Beckman Coulter, nr. articol 392805</p> <p>Beckman Coulter, nr. articol 359150</p>
Ansamblu centrifugă/rotor pentru microplăci	
<p>Echivalente:</p> <ul style="list-style-type: none"> Centrifugă, forță centrifugă maximă 5600 × g Rotor cu plăci basculante, cu suporturi de placă cu 96 de godeuri, adâncime minimă 76,5 mm. Multifuge X4 Pro-MD 120V TX-1000BT Centrifugă Sorvall Legend XTR 	<p>Furnizor general pentru laboratoare</p> <p>Thermo Fisher Scientific, nr. 4379590</p> <p>Thermo Fisher Scientific, nr. catalog 75004521 (120 V) sau nr. catalog 75004520 (230 V)</p>
<ul style="list-style-type: none"> Rotor pentru microplăci HIGHPlate 6000 Rotor HIGHPLate 6000 <p>Suport pentru microplăci</p> <ul style="list-style-type: none"> Recomandate: <ul style="list-style-type: none"> Suport pentru microplăci cu 96-de godeuri MicroAmp Suport placă PCR cu 96-de godeuri 	<p>Thermo Fisher Scientific, nr. de catalog 4379590</p> <p>Thermo Scientific VWR, nr. de catalog 97040-244</p> <p>Thermo Fisher Scientific, nr. de catalog 4379590</p> <p>Thermo Fisher Scientific, nr. de catalog AB-0563/1000</p>
<p>Unul dintre următoarele cititoare de microplăci (fluorometru) sau echivalent cu SoftMax Pro v6.2.2-7.1.2 sau ulterioară:</p> <ul style="list-style-type: none"> Gemini XPS SpectraMax M2, M3, M4 și M5. <ul style="list-style-type: none"> Insertul violet este inclus, pentru utilizare în fluxul de lucru, împreună cu cititorul de microplăci. 	<p>Molecular Devices, nr. piesă XPS</p> <p>Molecular Devices, nr. piesă M2, M3, M4 și M5</p>
<p>Adaptor serial USB de mare viteză SpectraMax</p>	<p>Molecular Devices, nr. piesă 0200-5060</p>

Echipament	Furnizor
Ciclor termic cu următoarele specificații: <ul style="list-style-type: none"> • Capac încălzit • interval de temperatură de la 4°C la 98°C • precizia temperaturii $\pm 2^\circ\text{C}$ • viteza rampă minimă de 2°C/s • Compatibil cu placa cu 96-de godeuri Twin.tec PCR, cu bordură completă 	Furnizor general pentru laboratoare
VeriSeq NIPT Microlab STAR	Hamilton, nr. piesă 95475-01 (115 V), 95475-02 (230 V) sau # 806288 (pentru Hamilton Company Bonaduz)
VeriSeq Onsite Server v2 sau VeriSeq Onsite Server upgradat	illumina, nr. piesă 20028403 sau 20047000 (v2) ori 15076164 sau 20016240 (upgradat)
Dacă se utilizează un sistem de secvențiere NextSeq 550Dx: <ul style="list-style-type: none"> • Kit de reactivi cu randament ridicat NextSeq 550Dx v2.5 (75 de cicluri) 	illumina, nr. piesă 20028870

Echipele opționale, nefurnizate

Echipament	Furnizor
Sistem de destupare Pluggo	LGP Consulting, nr. piesă 4600 4450
Placă de validare cu fluorescență SpectraMax SpectraTest FL1	Molecular Devices, nr. piesă 0200-5060
Carusel/agitator rotativ pentru eprubete de 15 ml, 40 rpm, 100-240 V	Thermo Scientific, nr. catalog 88881001 (SUA) sau 88881002 (UE)

Materiale obligatorii, nefurnizate

Consumabil	Furnizor
1000 μl Conductive Non-Sterile Filter Tips (Vârfuri cu filtru nesterile conductoare de 1000 μl)	Hamilton, nr. piesă 235905
300 μl Conductive Non-Sterile Filter Tips (Vârfuri cu filtru nesterile conductoare de 300 μl)	Hamilton, nr. piesă 235903
50 μl Conductive Non-Sterile Filter Tips (Vârfuri cu filtru nesterile conductoare de 50 μl)	Hamilton, nr. piesă 235948

Consumabil	Furnizor
<p>Rezervor pentru godeuri adânci cu următoarele specificații:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Format de microplacă SLAS 1–2004 cu 96 de godeuri cu fund piramidal sau conic și capacitate minimă de 240 ml. • Polipropilenă, de preferat din material cu fixare redusă a ADN-ului pentru toate suprafețele de contact cu speci­menele. • Dimensiunile interne (nivelul lichidului) sunt compatibile cu pașii de aspirare și de dispensare automatizați ai VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Înălțimile sunt compatibile cu mișcările automate ale VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	<p>Furnizor general pentru laboratoare</p> <p>Rezervoare compatibile:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Corning Axygen, nr. de produs RES-SW96-HP-SI • Agilent, nr. de produs 201246-100
<p>Casetă de reactiv cu următoarele specificații:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Casetă cu bună fixare, fără a forța, în suportul VeriSeq NIPT Microlab STAR, cu fund conic și cu capacitate minimă de 20 ml. • Polipropilenă fără RNază/DNază. • Dimensiunile interne (nivelul lichidului) ale rezervorului generează niveluri ale lichidului pe baza volumelor reactivilor pentru test compatibile cu pașii de aspirare și dispensare automatizați ai VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Înălțimile sunt compatibile cu mișcările automate ale VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	<p>Casete compatibile:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Illumina Reagent Tub, nr. piesă 20095418

Consumabil	Furnizor
<p>Plăci cu godeuri adânci cu următoarele specificații:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Format de microplacă SLAS 1–2004, 3–2004 și 4–2004 cu 96 de godeuri cu fund piramidal sau conic și capacitate minimă a godeurilor de 2 ml. • Polipropilenă translucidă, de preferat din material cu fixare redusă a ADN-ului pentru toate suprafețele de contact cu speci­menele. • Dimensiunile godeurilor generează un nivel al lichidului compatibil cu pașii de aspirare și de dispensare automatizați ai VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Bordură a plăcii care să permită plasarea de coduri de bare în poziția necesară, cu aderență puternică la suprafața plană. • Cadru rezistent la tensiune mecanică, care suportă minimum 5600 x g. • Înălțimile plăcii sunt compatibile cu mișcările automate ale VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	<p>Furnizor general pentru laboratoare</p> <p>Plăci compatibile:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, nr. piesă 0030505301 • Eppendorf, nr. piesă 30502302 • USA Scientific, nr. piesă 1896-2000
<p>Placă cu 384 de godeuri cu următoarele specificații:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Microplacă cu 384 de godeuri, optimizată pentru volume mici, cu capacitate minimă a godeurilor de 50 µl. • Polistiren negru opac, cu capacitate de blocare a luminii și cu fixare redusă a ADN-ului la toate suprafețele de contact cu speci­menele. • Dimensiunile godeurilor generează niveluri ale lichidului compatibile cu pașii de aspirare și dispensare automatizați ai VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Înălțimile plăcii sunt compatibile cu mișcările automate ale VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Bordură a plăcii care să permită plasarea de coduri de bare în poziția necesară, cu aderență puternică la suprafața plană. 	<p>Furnizor general pentru laboratoare</p> <p>Plăci compatibile:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Corning, nr. de produs 3820

Consumabil	Furnizor
<p>Placă cu 96 de godeuri cu următoarele specificații:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Microplacă cu cadru rezistent la tensiune mecanică, care să suporte minimum 5600 × g și cu 96 de godeuri translucide cu fund conic, bordură înălțată și capacitate minimă a godeurilor de 150 μl. • Polipropilenă fără RNază/DNază și cu fixare redusă a ADN-ului la toate suprafețele de contact cu speci­menele. • Dimensiunile godeurilor generează niveluri ale lichidului compatibile cu pașii de aspirare și dispensare automatizați ai VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Înălțimile plăcii sunt compatibile cu mișcările automate ale VeriSeq NIPT Microlab STAR. <p>NOTĂ: E posibil ca piesele din plastic cu numere de piesă diferite compatibile, de exemplu, plăcile cu 96 de godeuri de la alți producători să nu fie direct interschimbabile și să necesite o calibrare adaptată la piesă a sistemului VeriSeq NIPT Microlab STAR de către personalul de service și asistență tehnică Illumina. Pentru schimbările de piese din plastic, consultați echipa de asistență tehnică Illumina.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bordură a plăcii care să permită plasarea de coduri de bare în poziția necesară, cu aderență puternică la suprafața plană. • Compatibilitate cu cicloarele termice pentru denaturare. 	<p>Furnizor general pentru laboratoare</p> <p>Plăci compatibile:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, nr. piesă 0030129512 • Eppendorf, nr. piesă 30129580 • Eppendorf, nr. piesă 30129598 • Eppendorf, nr. piesă 30129660 • Eppendorf, nr. piesă 30129679 • Bio-Rad, nr. piesă HSP9601
<p>Una dintre următoarele opțiuni de folie de sigilare:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Microseal 'F' Foil (Folie Microseal F) • Folii de sigilare 	<p>Bio-Rad, nr. catalog MSF1001 Beckman Coulter, nr. articol 538619</p>
Cell-Free DNA BCT CE	Streck, nr. catalog 218997
Capace cu introducere prin presare	Sarstedt, nr. de comandă 65.802
Eprubete de 2 ml cu capac filetat	Furnizor general pentru laboratoare
Vârfuri de filtru de 20 μl pentru pipetor de 20 μl	Furnizor general pentru laboratoare
Vârfuri de filtru de 200 μl pentru pipetor de 200 μl	Furnizor general pentru laboratoare
Vârfuri de filtru de 1000 μl pentru pipetor de 1000 μl	Furnizor general pentru laboratoare

Consumabil	Furnizor
Echivalente: <ul style="list-style-type: none"> • Spray dezinfectant rapid pe bază de alcool • Soluție de detergent dezinfectant Recomandate: <ul style="list-style-type: none"> • Apă deionizată și etanol 70% 	Furnizor general pentru laboratoare

Materiale opționale, nefurnizate

Consumabil	Furnizor
Ser fiziologic tamponat cu fosfat Dulbecco (DPBS) pentru controlul fără șablon (NTC)	Furnizor general pentru laboratoare
Eprubetă, capac filetat, 10 ml (doar pentru speci­me­nele de control)	Sarstedt, nr. de comandă 60.551
Eprubetă, capac filetat, 50 ml	Furnizor general pentru laboratoare
Pipete serologice de 25 ml	Furnizor general pentru laboratoare
Pipete serologice de 10 ml	Furnizor general pentru laboratoare

Colectarea, transportul și depozitarea speci­me­nelor



ATENȚIE

Manevrați toate speci­me­nele ca și cum ar prezenta potențial infecțios.

- Probele de sânge integral de 7-10 ml trebuie colectate în BCT pentru ADN acelu­lar Streck. Nu congelați.
- Transportarea sângelui integral trebuie să se efectueze în conformitate cu toate reglementările în vigoare privind transportul de agenți etiologici. Se recomandă metode de expediere/transport rapide.
- În timpul transportului, depozitați la temperaturi între 4°C și 30°C. După primirea speci­me­nelor, depozitați-le între 2°C și 8°C până pot fi procesate. Intervalul dintre recoltarea de sânge și izolarea plasmei inițiale nu trebuie să depășească 5 zile.
- În cazul în care este necesară retestarea, speci­me­nele pentru post-procesare se pot astupa din nou cu capacul și depozita la 4°C pentru încă alte 5 zile (până la un număr total de 10 zile de la recoltarea de sânge).



ATENȚIE

Expunerea la temperaturi ridicate, peste intervalurile susmenționate, poate afecta negativ ratele de eșec și/sau performanța speci­me­nelor.

Avertismente și precauții

- Acest test conține proteinază K. Se pot produce vătămări corporale prin inhalare, ingerare, contact cu pielea și contact cu ochii. Utilizați în spații bine ventilate, purtați echipament de protecție, evitați să inhalați praf și eliminați orice recipiente și conținut neutilizate, în conformitate cu standardele de siguranță guvernamentale în vigoare.
- Acest test conține clorură de guanidiniu. Se pot produce vătămări corporale prin inhalare, ingerare, contact cu pielea și contact cu ochii. Utilizați în spații bine ventilate, purtați echipament de protecție și eliminați orice recipiente și conținut neutilizate, în conformitate cu standardele de siguranță guvernamentale locale în vigoare.
- Acest test conține 2-propanol, o substanță chimică inflamabilă. A se păstra departe de căldură și flacără deschisă. Se pot produce vătămări corporale prin inhalare, ingerare, contact cu pielea și contact cu ochii. Utilizați în spații bine ventilate, purtați echipament de protecție și eliminați orice recipiente și conținut neutilizate, în conformitate cu standardele de siguranță guvernamentale locale în vigoare.
- Acest test conține sulfoxid de dimetil, un lichid coroziv și combustibil. Se pot produce vătămări corporale prin inhalare, ingerare, contact cu pielea și contact cu ochii. Utilizați în spații bine ventilate, purtați echipament de protecție și eliminați orice recipiente și conținut neutilizate, în conformitate cu standardele de siguranță guvernamentale locale în vigoare.
- Pentru a împiedica formarea de gaze nocive, nu eliminați deșeurile de la extragerea cfADN (conțin tiocianat de guanidină) împreună cu deșeurile care conțin hipoclorit de sodiu.
- Manevrați toate specișenele ca și cum ar conține agenți cu potențial infecțios.
- Utilizați măsurile de precauție de rutină pentru activitățile de laborator. Nu utilizați pipete de gură. Nu mâncați, nu beți și nu fumați în spațiile de lucru desemnate. Purtați mănuși de unică folosință și halate de laborator la manipularea specișenelor și reactivilor pentru testare. După ce manipulați specișene și reactivi pentru teste, spălați-vă temeinic pe mâini.
- Nu utilizați nicio componentă a testelor după perioada de valabilitate de pe eticheta cutiei pentru test. Nu schimbați între ele componentele pentru teste din diferite loturi de testare. Loturile de testare sunt identificate pe eticheta casetei pentru test. Depozitați componentele de testare la temperatura specificată.
- Pentru a împiedica degradarea specișenului sau a reactivului, asigurați-vă că toți vaporii de hipoclorit de sodiu de la curățare s-au disipat complet înainte de a începe protocolul.
- Nerespectarea procedurilor specificate poate duce la rezultate incorecte sau la reducerea semnificativă a calității specișenelor.
- Raportați imediat orice incidente grave conexe acestui produs către Illumina și autoritățile competente ale statelor membre în care sunt rezidenți utilizatorul și pacientul.
- Pentru informații privind mediul, sănătatea și siguranța, consultați fișele cu date de securitate (SDS) la adresa support.illumina.com/sds.html.

Note procedurale

Evitarea contaminării

- Utilizați vârfuri și consumabile de laborator noi.
- Utilizați vârfuri rezistente la aerosolizare pentru a reduce riscul de transfer și contaminare încrucișată între specimene.
- Din cauza potențialului de contaminare, fiți extrem de atenți pentru a vă asigura că întregul conținut rămâne în totalitate în godeu. Nu distribuiți conținutul prin stropire. Centrifugați respectând toți pașii de agitare vortex.
- Respectați reglementările în vigoare aplicabile bunelor practici de laborator și igienei la manipularea sângelui și a produselor derivate din sânge.
- Nu utilizați hipoclorit de sodiu aerosolizat la pregătirea bibliotecilor. Contaminarea cu oligoelemente de hipoclorit de sodiu poate duce la eșecul testului.
- La desigilarea tuturor plăcilor, așezați placa cu grijă pe o suprafață stabilă, plană, cu priză fermă. Dezlipiți lent folia de sigilare, fără ca aceasta să intre în contact cu godeurile expuse. Aveți grijă să nu atingeți godeurile expuse și să nu perturbați conținutul acestora. Contaminarea încrucișată între godeuri poate duce la rezultate incorecte.

Curățarea platformei VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Înainte de utilizare, inspectați platforma pentru curățenie. Cel puțin o dată pe săptămână, efectuați întreținerea săptămânală și respectați aceste instrucțiuni de curățare.
- Scoateți toate suporturile neîncărcabile și curățați-le cu spray dezinfectant rapid pe bază de alcool, apă de-ionizată și etanol 70% și lăsați-le la uscat. Dacă sunt foarte murdare, imersați-le apoi într-o soluție de detergent dezinfectant, clătiți cu dezinfectant pe bază de alcool și lăsați-le la uscat.
- Deschideți capacul frontal și ștergeți platforma cu o lavetă saturată cu apă de-ionizată și etanol 70%. Trebuie verificată în special curățenia blocurilor laterale.
- Scoateți colectorul BVS (sistem de vid de bază) și curățați colectorul, garnitura și compartimentele interioare ale BVS cu laveta. Evitați curățarea garniturii cu etanol, deoarece materialul poate deveni friabil.
- Goliți vârfurile folosite CORE 96-head și ale canalului independent.
- Demontați placa de ejectare a vârfurilor din canalul independent de la unitatea de eliminare a vârfurilor și curățați-o: pulverizați apă de-ionizată și etanol 70% direct pe suprafață și ștergeți. Trageți o pungă nouă de plastic peste cadru și fixați-o. Puneți placa de ejectare a vârfurilor curată înapoi în poziție.
- Pulverizați apă de-ionizată și etanol 70% direct pe suprafața casetei pentru vârfuri folosite -CORE 96-head și pe conducta de evacuare a deșeurilor și ștergeți-le.

- Dacă acumularea de reziduuri este dificil de curățat de pe caseta pentru vârfuri folosite, ștergeți-o cu o lavetă umezită cu apă fără-DNază/RNază până la eliminarea acumulării de reziduuri. Eliminați laveta în mod corespunzător. Continuați cu sterilizarea cu dezinfectant pe bază de-alcool.
- Umeziți o lavetă fără-scame sau un tampon de bumbac cu etanol 70%. Tamponați fereastra scannerului laser de la cititorul de coduri de bare. Cu aceeași lavetă sau același tampon, curățați fiecare godeu al adaptorului de plăci CPAC. Dacă utilizați o lavetă, presați-o în fiecare godeu al adaptorului cu partea neascuțită a unui creion, pentru a vă asigura că interiorul godeului este curățat corect.
- Curățați canalele independente:
 - Pe canalele independente, curățați manșonul de ejectare a vârfurilor (exteriorul canalelor de pipetare) cu o lavetă fără-scame, îmbibată cu apă de-ionizată și etanol 70%. (Consultați *Ghidul de referință Hamilton Microlab STAR nr. 15070074.*)
 - Curățați discul opritor și o-ringurile capului de pipetare (exteriorul canalelor de pipetare) cu o lavetă fără-scame, îmbibată în apă de-ionizată și etanol 70%.
- Curățați CORE 96-head:
 - Cu aceeași lavetă fără-scame îmbibată în apă de-ionizată și etanol 70%, curățați carcasa sistemului cu 96-de capete de pipetare și dedesubtul discurilor opritoare.
 - Treceți aceeași lavetă sau o bucată de lavetă îmbibată în apă de-ionizată și etanol 70% printre lateralele canalelor de pipetare ale sistemului cu 96 de-capete pentru a curăța o-ringurile. Repetați această procedură pentru fiecare canal de pipetare al sistemului cu 96 de-capete.
- Pulverizați carcasa frontală și laterală cu apă de-ionizată și etanol 70% și uscați-o prin ștergere.
- Curățați banda de protecție pentru încărcare automată cu o lavetă îmbibată în apă de-ionizată și etanol 70% și ștergeți fără a apăsa.
- Când platforma și componentele sunt complet uscate, puneți suporturile la loc.

NOTĂ Curățarea și întreținerea incorecte ale ML STAR pot determina contaminarea-încrucișată și performanța nesatisfăcătoare a testului.

Controlul calității

Materialul de control cu caracteristici de performanță cunoscute poate fi evaluat pentru a detecta diferențe la procesare și în procedurile tehnice din laborator.

Rularea unui specimen de control sau a unui control fără șablon reduce numărul total de specimene materne necunoscute care pot fi procesate la fiecare pregătire a speciemenelor.

Nu depășiți cele două speciemen NTC per lot de 24 sau 48 de specimene sau cele patru specimene NTC per lot de 96 de specimene.

Instrucțiuni de utilizare

Sfaturi și tehnici

Dacă în protocol nu se specifică un punct de oprire în siguranță, continuați imediat cu pasul următor.

Aplicarea codurilor de bare pe plăci

- Codurile de bare pentru plăcile cu bordură completă încep cu PL.
- Codurile de bare pentru plăcile cu godeuri adânci încep cu DW.
- Aplicați codurile de bare pe plăcile cu bordură completă și plăcile cu godeuri adânci pe partea de lângă coloana 12.
- Încărcați plăcile cu codul de bare spre dreapta pentru a permite scanarea automată.

Sigilarea și desigilarea plăcii

- Procedați cu atenție extremă pentru evitarea contaminării încrucișate, astfel încât să nu existe lichid vizibil pe fața inferioară a foliei de sigilare.
 - Asigurați-vă că fața inferioară expusă a foliei de sigilare nu intră în contact cu godeurile expuse.
 - Nu atingeți sub niciun motiv godeurile expuse.
- Sigilați întotdeauna placa cu 96 de godeuri înaintea următorilor pași din protocol:
 - Pașii de centrifugare
 - Pașii de ciclare termică
- Pentru a sigila placa, aplicați folia adezivă pe placă și sigilați. Asigurați-vă că ați aplicat presiune pe întreaga placă și că folia este etanșată peste fiecare godeu.
- Înainte de desigilarea plăcii, efectuați următoarele operațiuni:
 - Centrifugați scurt placa cu 96 de godeuri 20 de secunde la 1000 × g.
 - Așezați placa pe o suprafață plană înainte de a o desigila lent.

VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Înainte de utilizare, efectuați și documentați întreținerea necesară, în conformitate cu instrucțiunile producătorului.
- Observați ML STAR în timpul etapelor automate. Monitorizați interfața software a VeriSeq NIPT v2 Workflow Manager pentru vizualizarea solicitărilor și instrucțiunilor pentru operator.
- Țineți capacul frontal închis în timpul funcționării.
- Mențineți platforma liberă de orice obiect în timpul funcționării.
- Dacă în timpul unui eveniment de procesare a erorilor se afișează butonul cu opțiunea **Exclude** (Excludere), nu selectați această opțiune în niciun caz. Dacă metoda nu poate depăși evenimentul de procesare a erorilor și aveți opțiuni limitate în acest sens, abandonați ciclul.

- Dacă VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 o solicită în timpul pașilor de vidare a plăcii, ajutați manual la etanșarea între placă și colectorul de vid.
- Lăsați sistemul să elimine automat vârful din adaptor. Nu eliminați manual vârful dacă software-ul nu o solicită.
- Eliminați reactivii consumați și consumabilele utilizate la solicitarea Workflow Manager.
- Goliți zilnic baloanele de sticlă pentru reziduurile aspirate. Primul balon de sticlă nu trebuie să fie niciodată peste ½ plin. Supraplinul cu deșeuri aspirate poate afecta pompa de vid și poate reduce presiunea de vidare din sistem.
- Pentru loturile 24, 48 și 96 de specimene, încărcăți un rastel de vârful pentru 8 canale numărate individual înainte de inițializarea metodei.

Procesarea specimenelor

Procedură

1. Finalizați următoarele etape pentru fiecare alicotă:
 - a. Centrifugați speciamele cu cod de bare 10 minute la 1600 × g și 4°C cu frâna oprită.
 - b. Când centrifuga se oprește complet, scoateți eprubetele.Începeți izolarea plasmei în următoarele 15 minute după centrifugare. Dacă trec mai mult de 15 minute, centrifugați din nou.
2. Inspectați fiecare eprubetă pentru a determina dacă specimenul este adecvat conform următoarelor cerințe:
 - Volumul specimenului este cel preconizat.
 - Separarea clară între straturile de eritrocite și plasmă ale specimenelor este vizibilă după centrifugare.
 - Nivelul plasmei este cu cel puțin 1,5 ml peste cel al peliculei leucocitare.
 - Specimenul nu este hemolizat excesiv (plasma este de culoare roșu-închis).
 - Specimenul nu este lipemic (plasma este de culoare alb tulbure sau alb lăptos opac).
 - Specimenul nu prezintă coagulare.



ATENȚIE

Specimenele depozitate sau manipulate necorespunzător pot deveni neadecvate. Dacă în fluxul de lucru sunt procesate specimene neadecvate, acestea pot înfunda placa de fixare în timpul extracției, determinând evenimente de revărsare a specimenelor în godeurile învecinate.

3. Destupați eprubetele și încărcăți-le în suporturile pentru eprubete. Încărcați toate speciamele și controalele pentru plasmă din lot.

**ATENȚIE**

Nu selectați opțiunea Exclude (Excludere) dacă vă este oferită în timpul unui eveniment de procesare a erorilor. Dacă metoda nu poate depăși evenimentul de procesare a erorilor și aveți opțiuni limitate în acest sens, abandonați ciclul.

Izolarea plasmei

Preparare

1. Etichetați 1 placă cu godeuri adânci cu Plasmă intermediară și aplicați un cod de bare.
2. Etichetați 1 placă cu godeuri adânci cu Plasmă finală și aplicați un cod de bare.
3. Pentru loturile 24, 48 și 96 de specimene, încărcați un rastel de vârfuri pentru 8 canale numărate individual înainte de inițializarea metodei.

**ATENȚIE**

Asigurați-vă că folosiți tipul de placă corect pentru plăcile pentru Plasmă intermediară și pentru Plasmă finală. Utilizarea unui rezervor pentru godeuri adânci în locul unei plăci cu godeuri adânci duce la amestecarea speciemenelor și poate determina rezultate incorecte.

Procedură

1. Deschideți AppLauncher și selectați **VeriSeq NIPT Method** (Metoda VeriSeq NIPT).
2. Introduceți un ID de lot unic și numele utilizatorului și apoi selectați **OK**.
ID-ul de lot poate conține ≤ 26 de caractere. Puteți folosi cifre, litere, caractere de subliniere (_) sau liniuțe (-). De exemplu: 2025-10-16_Batch3.
ID-ul de lot este independent de majuscule/minuscule. ID-urile de lot dependente de majuscule/minuscule nu sunt considerate unice.
Denumirile de lot trebuie să fie unice, fără ca unica diferență să fie utilizarea majusculelor/minusculelor. De exemplu, denumirile Batch01 și batch01 nu sunt unice. Aceeași regulă se aplică pentru denumirile ID-urilor de specimen.
3. Selectați **New Batch** (Lot nou).
4. După inițiere, selectați **OK** pentru a începe izolarea plasmei.
5. Selectați dimensiunea lotului, apoi selectați **OK**.
6. Selectați numărul de controale fără șablon (NTC), apoi selectați **OK**.
Locașurile NTC sunt întotdeauna ultimele locașuri selectate. De exemplu, cu două NTC într-un ciclu cu 24 de specimene, pozițiile 23 și 24 sunt NTC.
7. Efectuați unul dintre următorii pași:
 - Pentru a încărca o fișă de specimen existentă, selectați fișa de specimen asociată lotului și apoi selectați **OK** (încărcare).

- Pentru a continua fără să selectați o fișă de specimen, selectați **No Sample Sheet** (Fără fișă de specimen).

Pentru informații privind crearea unei fișe de specimen, consultați *Ghid software pentru VeriSeq NIPT Solution v2 (nr. document 1000000067940)*.

NOTĂ Tipul de specimen, pentru făt unic sau gemelar, trebuie înregistrat cu precizie pentru fiecare specimen, pentru a se asigura analiza corectă a datelor. Dacă alegeți **No Sample Sheet** (Fără fișă de specimen), asigurați-vă că ați setat valorile implicite ale specimenelor în instrumentele de service Workflow Manager. Pentru informații suplimentare, consultați *Ghid software pentru VeriSeq NIPT Solution v2 (nr. document 1000000067940)*.

8. Confirmați că toate codurile de bare sunt atașate și apoi încărcați speci­menele, vârfurile și plăcile (cu codul de bare orientat spre dreapta) pe suport.
9. Selectați **OK** după fiecare solicitare de încărcare.

Dimensiunea lotului de specimene	Suport Tip	Tract	Articol	Poziția locației
24, 48, 96	Sfat	7–12	Vârfuri de 1000 µl	5
			Vârfuri de 1000 µl (doar lot de 96)	4, 5
	Eprubetă	15	Eprubete pentru specimene de sânge pregătite, 1-24 (pentru toate dimensiunile de loturi)	1–24
	Eprubetă	16	Eprubete pentru specimene de sânge pregătite, 25-48 (doar pentru loturile de 48 și 96)	25–48
	Eprubetă	17	Eprubete pentru specimene de sânge pregătite, 49-72 (doar pentru loturi de 96)	49–72
	Eprubetă	18	Eprubete pentru specimene de sânge pregătite, 73-96 (doar pentru loturi de 96)	73–96
	Multiflex	19–24	Placă goală cu godeuri adânci, plasmă finală - cu cod de bare	4
	Multiflex	19–24	Placă goală cu godeuri adânci, plasmă intermediară - cu cod de bare	5
	Reactiv	47	[Opțional] Ser fiziologic tamponat cu fosfat Dulbecco (DPBS), utilizat pentru controlul fără șablon (NTC)	5

10. Asigurați-vă că ați încărcat corect suporturile, vesela de laborator și reactivii.
11. Pe ecranul Pre-Spin Deck Verification (Verificare platformă precentrifugare) selectați **OK**.
12. Observați ML STAR la efectuarea etapelor automate.

13. Când o solicită Workflow Manager, asigurați-vă că platforma de încărcare ML STAR nu este obstrucționată, pentru a permite ca ML STAR să descarce suporturile.
14. Selectați **Unload** (Descărcare) pentru a descărca platforma.
15. Scoateți placa cu godeuri adânci pentru plasma intermediară după cum urmează.
 - a. Inspectați placa pentru a detecta dacă volumele sunt uniforme în fiecare godeu (fără erori de pipetare). Volumul scontat este de 1000 µl.
 - b. Notați orice inconsecvență și înregistrați-o când se încheie procedura de izolare a plasmei.
 - c. Sigilați placa, încărcăți cu greutate de echilibrare și centrifugați la 5600 × g timp de 10 minute cu frâna dezactivată sau activată la cea mai joasă setare.
16. Selectați **Yes** (Da) pentru a continua cu pregătirea plasmei finale.
17. Desigilați placa și încărcăți-o din nou pe suport.

Dimensiunea lotului de specimene	Suport Tip	Tract	Articol	Poziția locației
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Placă cu godeuri adânci pentru plasmă intermediară	5

18. Bifați caseta de validare **Intermediate Plasma plate has been spun** (Placa cu plasmă intermediară a fost centrifugată) și apoi selectați **OK**.
19. Observați ML STAR la efectuarea etapelor automate.
20. Când o solicită Workflow Manager, asigurați-vă că platforma de încărcare ML STAR nu este obstrucționată, pentru a permite ca ML STAR să descarce suporturile.
21. Selectați **Unload** (Descărcare) pentru a descărca platforma.
22. Când o solicită Workflow Manager, goliți suporturile și platforma.
23. Scoateți placa cu godeuri adânci pentru plasma finală.
24. Inspectați placa pentru următoarele erori:
 - Volume neuniforme în fiecare godeu. Volumul scontat este de 900 µl.
 - Pelete celulare vizibile.
 - Hemoliză excesivă.

Dacă observați pelete celulare vizibile sau hemoliză excesivă, invalidați specimenul afectat la finalul metodei de izolare a plasmei sau folosiți Batch Manager. Pentru mai multe informații despre Batch Manager, consultați *Ghid software pentru VeriSeq NIPT Solution v2 (nr. document 1000000067940)*.
25. Când o solicită Workflow Manager, selectați **OK**.
26. Introduceți comentarii despre godeurile afectate, iar apoi selectați **OK**.
27. Efectuați unul dintre următorii pași.
 - Pentru a trece la extracția de cfADN, selectați **Yes** (Da).
 - Pentru a vă opri, selectați **Exit** (Ieșire).

PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ

Dacă vă opriți, sigilați placa pentru plasmă finală și depozitați-o la 0 2 - 8°C timp de până la 7 zile.

Extragerea cfADN**Preparare**

1. Examinați vizual casetele de extracție și de accesorii pentru a confirma că kitul nu este expirat.
2. Preparați următorii reactivi. Etichetați eprubetele pentru rezervoare și rezervoarele pentru godeuri adânci cu numele reactivilor.

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni
Placă cu godeuri adânci pentru plasma finală	între 2°C și 8°C	Dacă a fost depozitată anterior, lăsați-o 30 de minute să ajungă la temperatura camerei. Centrifugați 20 de secunde la 1000 × g. Desigilați placa cu godeuri adânci pentru plasma finală înainte de utilizare.

3. Adăugați încet 3,75 ml de soluție tampon de proteinază în fiecare fiolă de proteinază K.

- Pregătiți 3 fiole pentru 24 și 48 de specimene.
- Pregătiți 4 fiole pentru 96 de specimene.

4. Puneți capacul fiole de proteinază K și agitați până la resuspensie.

**ATENȚIE**

Nu contaminați dopul de cauciuc. Dacă pe dopul de cauciuc ajung alte substanțe, speci­me­nele ulterioare pot fi contaminate.

5. Cumulați proteinaza K preparată din toate fiolele într-o eprubetă de reactiv și etichetați-o Proteinază K.
6. Adăugați 100 ml de EtOH 100% la fiecare flacon de reactiv cu soluție tampon de spălare II.
 - Pregătiți 1 flacon pentru 24 și 48 de specimene.
 - Pregătiți 2 flacoane pentru 96 de specimene.
7. Mixați flacoanele cu soluție tampon de spălare II prin răsturnare.
8. Bifați casetele de validare pe flacoanele cu soluție tampon de spălare II.
9. Etichetați 1 placă nouă cu bordură completă ca Intermediară și aplicați un cod de bare pentru placă.
10. Etichetați 1 placă nouă cu bordură completă ca Eluție pentru cfADN și aplicați un cod de bare pentru placă.
11. Etichetați 1 placă nouă cu godeuri adânci ca Intermediară pentru extracție și aplicați un cod de bare pentru placa cu godeuri adânci.
12. Aplicați un cod de bare pentru placă la placa de fixare a ADN-ului.
13. Sigilați cu folie godeurile neutilizate pentru loturile de 24 și 48 de specimene.

14. Pregătiți o soluție de curățare EtOH 70% (EtOH 70%, apă fără DNază/RNază 30%) pentru curățarea sistemului de vid.
15. Pregătiți sistemul de vid după cum urmează.
 - a. Demontați colectorul de vid și curățați cu EtOH 70%.
Evitați curățarea garniturii cu EtOH, deoarece materialul poate deveni friabil.
 - b. Goliți deșeurile aspirate.
 - c. Asigurați-vă că sistemul de vid ML STAR este pornit.

Procedură

1. Selectați **OK** pentru a începe extragerea cfADN.
2. Dacă nu este deja deschisă **VeriSeq NIPT Method** (Metoda VeriSeq NIPT):
 - a. Deschideți AppLauncher și selectați **VeriSeq NIPT Method** (Metoda VeriSeq NIPT).
 - b. Introduceți ID-ul de lot și numele utilizatorului și apoi selectați **OK**.
3. Încărcați vârfurile în suportul pentru vârfuri după cum urmează și apoi selectați **OK**.



ATENȚIE

Înainte de a iniția metoda pentru loturi de 24, 48 și 96 de specimene, adăugați un rastel de vârfuri pentru 8 canale.

Dimensiunea lotului de specimene	Tip de suport	Tract	Articol	Poziția locației
24	Sfat	1-6	Vârfuri de 1000 µl	1
		7-12	Vârfuri de 300 µl	1
48	Sfat	1-6	Vârfuri de 1000 µl	1, 2
		7-12	Vârfuri de 300 µl	1
96	Sfat	1-6	Vârfuri de 1000 µl	1, 2, 3, 4
		7-12	Vârfuri de 300 µl	1

4. Încărcați vârfurile contorzizate pe suportul de vârfuri după cum urmează.

Dimensiunea lotului de specimene	Tip de suport	Tract	Articol	Poziția locației
24, 48, 96	Sfat	49-54	Vârfuri de 1000 µl	1
			Vârfuri de 300 µl	2
			Vârfuri de 50 µl	3

5. Introduceți poziția primului și ultimului vârf pentru fiecare rastel de vârfuri, apoi selectați **OK**.

6. Scanați codurile de bare ale casetei de extracție.
7. Introduceți numele utilizatorului sau inițialele preparatorului reactivilor, apoi selectați **OK**.
8. Scanați codurile de bare ale casetei de accesorii.
9. Introduceți numele utilizatorului sau inițialele preparatorului reactivilor, apoi selectați **OK**.
10. Confirmați că sunt atașate codurile de bare.
11. Desigilați placa cu godeuri adânci pentru plasmă finală, după necesități.
12. Încărcați plăcile (cod de bare spre dreapta) pe suportul de plăci după cum urmează și apoi selectați **OK**.

Dimensiunea lotului de specimene	Tip de suport	Tract	Articol	Poziția locației
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Placă nouă cu bordură completă, intermediară, cu cod de bare	1
			Placă nouă cu bordură completă, eluare cfADN, cu cod de bare	2
			Placă nouă cu godeuri adânci, intermediară de extracție, cu cod de bare.	4
			Placă cu godeuri adânci pentru plasma finală, cu cod de bare	5

13. Confirmați că placa de fixare a ADN-ului are cod de bare, apoi selectați **OK**.
14. Pentru loturile cu plăci parțiale, aplicați o folie de sigilare tăiată la dimensiunea adecvată peste godeurile nefolosite (coloanele 4-12 pentru loturile de 24 de specimene și coloanele 1-12 pentru loturile de 48 de specimene).
15. Încărcați placa de fixare a ADN-ului în colectorul de vid cu codul de bare spre dreapta.
16. Înainte de plasarea plăcii de fixare pe colectorul BVS, inspectați vizual godeurile pentru eventuale obstrucții. Acestea pot împiedica curgerea reactivilor sub vid.
17. Dacă utilizați loturi de 24 sau 48 de specimene, acoperiți și sigilați cu folie godeurile neutilizate. Bifați caseta **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (Sunt sigilate coloanele plăcii de fixare a ADN-ului?), apoi selectați **OK**.

18. Încărcați eprubetele de reactiv pe suportul de reactivi după cum urmează și apoi selectați **OK**.

Dimensiunea lotului de specimene	Tip de suport	Tract	Articol	Poziția locației
24, 48	Reactiv	47	16 ml soluție tampon de eluare	1
			11 ml proteinază K	2
96	Reactiv	47	16 ml soluție tampon de eluare	1
			15 ml proteinază K	2

19. Transferați reactivii specificați în rezervoarele cu godeuri adânci și apoi încărcați-le pe suporturile cu godeuri adânci după cum urmează.

20. Selectați **OK**.

Dimensiunea lotului de specimene	Tip de suport	Tract	Articol	Poziția locației
24, 48	Godeu adânc	39–44	125 ml soluție tampon de spălare II	1
			125 ml soluție tampon de spălare II	2
			60 ml EtOH 100%	3
			100 ml soluție tampon de liză	4
			60 ml apă fără DNază/RNază	5
96	Godeu adânc	39–44	200 ml soluție tampon de spălare II	1
			125 ml soluție tampon de spălare II	2
			100 ml EtOH 100%	3
			100 ml soluție tampon de liză	4
			100 ml apă fără DNază/RNază	5

21. Așteptați să se finalizeze verificarea automată a volumului de reactivi.

22. Confirmați că sistemul de vid pentru deșeurii este gol (se recomandă să fie pe jumătate plin), apoi selectați **OK**.

23. Confirmați poziționarea tuturor suporturilor, echipamentelor de laborator și reactivilor și apoi selectați **OK** pe ecranul Extraction Deck Verification (Verificarea platformei de extracție).

24. Observați ML STAR în timpul etapelor automate.

**ATENȚIE**

Trebuie să invalidați manual excedentul de specimen nedetectat de sistem anterior contaminării godeurilor din apropiere.

25. După etapa de aspirație finală, scoateți placa de fixare a ADN-ului și curățați suprafața inferioară cu EtOH 70%.
26. Sigilați orice godeu neacoperit de pe placa de fixare a ADN-ului și puneți-o pe placa cu godeuri adânci pentru plasma finală goală.
27. Centrifugați ansamblul placă de fixare a ADN-ului/plasmă finală la 5600 × g timp de 10 minute, cu frâna acționată.
28. Selectați **OK**.
29. În timpul centrifugării plăcii de fixare a ADN-ului, finalizați curățarea cu vid:
 - a. Scoateți colectorul de vid și apoi selectați **OK**.
 - b. Așteptați să se încheie eliminarea automată a deșeurilor.
 - c. Curățați colectorul de vid și interiorul sistemului de vid cu EtOH 70% și apoi puneți la loc colectorul de vid.
 - d. Bifați caseta de validare **Manifold is on Vacuum** (Colectorul este pe vid) pentru a iniția transferul plăcii de eluare pe colectorul de vid și apoi selectați **OK**.
30. După centrifugare, desigilați godeurile cu specimene de pe placa de fixare a ADN-ului.
31. Plasați placa de fixare ADN peste placa de eluare pentru cfADN de pe colectorul de vid.
32. Încărcați placa de fixare a ADN-ului cu codul de bare spre dreapta, apoi selectați **OK**.
33. Observați ML STAR în timpul etapelor automate.
34. După pasul de incubare, bifați caseta de selectare **Plates are assembled as indicated** (Plăcile sunt asamblate conform indicațiilor). Confirmați că placa de fixare ADN/de eluare cfADN este plasată pe un suport (dacă o necesită centrifuga).
35. Sigilați godeurile neacoperite de pe placa de fixare a ADN-ului
36. Centrifugați la 5600 × g timp de 2 minute cu frâna acționată și apoi selectați **OK**.
37. Inspectați vizual placa de eluare pentru cfADN pentru a detecta dacă volumele sunt uniforme în fiecare godeu.
Volumul scontat este de aproximativ 55 µl.
38. Sigilați și păstrați placa de eluare pentru cfADN pentru pregătirea bibliotecii.
39. Când o solicită Workflow Manager, asigurați-vă că platforma de încărcare ML STAR nu este obstrucționată, pentru a permite ca ML STAR să descarce suporturile.
40. Selectați **Unload** (Descărcare) pentru a descărca platforma.
41. Descărcați toate suporturile și curățați platforma instrumentului ML STAR, iar apoi selectați **OK**.
42. Introduceți comentarii despre godeurile afectate, iar apoi selectați **OK**.
43. Efectuați unul dintre următorii pași:

- Pentru a continua cu Prepare Libraries (Pregătirea bibliotecilor), selectați **Yes** (Da).
- Pentru a vă opri, selectați **Exit** (Ieșire).

PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ

Dacă vă opriți, sigilați placa de eluțiune pentru ADN liber circulant și depozitați-o la o temperatură între -25°C și -15°C timp de până la 7 zile.

Pregătirea bibliotecilor

Preparare

1. Examinați vizual casetele de pregătire a bibliotecii și de accesorii pentru a confirma că kitul nu este expirat.
2. Preparați următorii reactivi. Etichetați eprubetele pentru rezervor și rezervoarele pentru godeuri adânci cu numele reactivilor.

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni
A-Tailing Mix	între -25°C și -15°C	Decongelați la temperatura ambiantă. Mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
Placă de eluare cfADN	între -25°C și -15°C	Dacă a fost depozitată anterior, confirmați că placa nu a fost depozitată mai mult de 7 zile și decongelați-o la temperatura camerei. Agitați 1 minut la 1500 rpm. Centrifugați 20 de secunde la 1000 × g.
Amestec de reparare capăt	între -25°C și -15°C	Decongelați la temperatura ambiantă. Mixați în agitator vortex.
Soluție tampon de hibridizare	între -25°C și -15°C	Decongelați la temperatura ambiantă. Mixați în agitator vortex. Redepozitați după utilizare.
Amestec de legare	între -25°C și -15°C	Decongelați la temperatura ambiantă. Mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
Placă adaptor ADN NIPT	între -25°C și -15°C	Decongelați la temperatura ambiantă. Mixați în agitator vortex. Centrifugați 20 de secunde la 1000 × g.
Soluție tampon de resuspendare	între 2°C și 8°C	Mixați în agitator vortex. Redepozitați după utilizare.
Bile de purificare specimen	între 2°C și 8°C	Lăsați 30 de minute pentru a ajunge la temperatura camerei. Mixați viguros în agitator vortex înainte de fiecare utilizare. Mixați în agitator vortex sau prin răsturnare până când toate bilele sunt suspendate și amestecul este omogen.

**ATENȚIE**

La desigilarea plăcii adaptor ADN NIPT, procedați cu extremă atenție pentru a evita contaminarea încrucișată între godeuri prin aerosolizare, care poate produce rezultate incorecte.

3. Dacă placa de eluare cfADN a fost depozitată la congelator, pregătiți-o după cum urmează.
 - a. Decongelați la temperatura ambiantă.
 - b. Agitați 1 minut la 1500 rpm.
 - c. Centrifugați 20 de secunde la 1000 × g.
4. Etichetați o placă nouă cu bordură completă ca Bibliotecă și aplicați un cod de bare pentru placă.
5. Pregătiți EtOH 80% din EtOH absolut. Combinați 40 ml EtOH 100% cu 10 ml apă fără DNază/RNază. Mixați prin răsturnare.
6. Asigurați-vă că este pornit controlul termic pentru ML STAR.

Diluarea enzimelor

1. Combinați A-Tailing Mix și soluția tampon de resuspendare într-o eprubetă cu capac filetat. Mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.

Dimensiunea lotului de specimene	A-Tailing Mix (μl)	Soluție tampon de resuspendare (μl)
24, 48	900	1200
96	1800	2400

2. Combinați Ligation Mix și soluția tampon de resuspendare într-o eprubetă cu capac filetat. Mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.

Dimensiunea lotului de specimene	Ligation Mix (μl)	Soluție tampon de resuspendare (μl)
24, 48	230	1713
96	440	3278

Procedură

1. Selectați **OK** pentru a porni Pregătirea bibliotecii. Dacă nu este deja deschisă VeriSeq NIPT Method (Metoda VeriSeq NIPT):
 - a. Deschideți AppLauncher și selectați **VeriSeq NIPT Method**.
 - b. Introduceți ID-ul de lot și numele utilizatorului și apoi selectați **OK**.
2. Confirmați că următoarele consumabile sunt pregătite așa cum se specifică pe ecranul Reagent Preparation (Pregătirea reactivilor):
 - A-Tailing Mix, amestec de legare și EtOH 80%.
 - Bile de purificare specimen, amestec de reparare capăt și placă adaptor ADN NIPT.
3. Bifați casetele de validare și apoi selectați **OK**.

4. Scanați codurile de bare ale casetei de pregătire a bibliotecii.
5. Introduceți numele de utilizator sau inițialele preparatorului reactivilor, apoi selectați **OK**.
6. Scanați codurile de bare ale casetei de accesorii.
7. Introduceți numele de utilizator sau inițialele preparatorului reactivilor, apoi selectați **OK**.
8. Încărcați vârfurile în suportul pentru vârfuri după cum urmează și apoi selectați **OK** pentru fiecare suport.

Dimensiunea lotului de specimene	Tip de suport	Tract	Articol	Poziția locației
24	Sfat	1-6	Vârfuri de 50 µl	1
		7-12	Vârfuri de 300 µl	1, 2
48	Sfat	1-6	Vârfuri de 50 µl	1, 2
		7-12	Vârfuri de 300 µl	1, 2, 3, 4
96	Sfat	1-6	Vârfuri de 50 µl	1, 2, 3, 4
		7-12	Vârfuri de 300 µl	1, 2, 3, 4, 5

9. Dacă ați oprit protocolul după procedura de extracție a cfADN, încărcați vârfurile contorzate pe suportul de vârfuri după cum urmează.

Dimensiunea lotului de specimene	Tip de suport	Tract	Articol	Poziția locației
24, 48, 96	Sfat	49-54	Vârfuri de 1000 µl	1
			Vârfuri de 300 µl	2
			Vârfuri de 50 µl	3

10. Introduceți poziția primului vârf pentru fiecare rastel de vârfuri, apoi selectați **OK**.
11. Confirmați că sunt aplicate codurile de bare și încărcați plăcile (cu codul de bare spre dreapta) pe suport, după cum urmează, și apoi selectați **OK**.

Dimensiunea lotului de specimene	Tip de suport	Tract	Articol	Poziția locației
24, 48, 96	Multiflex	19-24	Placă de eluare cfADN, cu cod de bare	1
			Placă adaptor ADN NIPT, cu cod de bare	2
			Placă nouă cu bordură completă și 96 de godeuri, bibliotecii, cu cod de bare	3
			Plăci noi cu bordură completă și 96 de godeuri	4, 5

12. Încărcați suportul cu godeuri adânci după cum urmează și selectați **OK**.

Dimensiunea lotului de specimene	Tip de suport	Tract	Articol	Poziția locației
24, 48, 96	Godeu adânc	39–44	50 ml EtOH 80% într-un rezervor pentru godeuri adânci	1
			Plăci noi cu bordură completă și 96 de godeuri	2, 3, 4, 5

13. Încărcați eprubetele de reactivi pe suportul de reactivi după cum urmează și apoi selectați **OK**.

Dimensiunea lotului de specimene	Tip de suport	Tract	Articol	Poziția locației
24, 48, 96	Reactiv	47	2,5 ml de amestec de reparare capăt	1
			A-Tailing Mix pregătit (volum total)	2
			Amestec de legare pregătit (volum total)	3
			Bile de purificare specimen 10 ml	4
			3 ml soluție tampon de hibridizare	5

14. Păstrați restul de 12 ml de soluție tampon de hibridizare (HT1) în container pentru cumulare.

15. Asigurați-vă că suporturile, vesela de laborator și reactivii sunt încărcăți corect și apoi selectați **OK** pe ecranul Library Deck Verification (Verificare platformă pentru bibliotecă).

16. Așteptați să se finalizeze verificarea automată a volumului de reactivi.

17. Observați ML STAR în timpul etapelor automate.

18. Când o impune Workflow Manager, asigurați-vă că platforma de încărcare ML STAR nu este obstrucționată, pentru a permite ca ML STAR să descarce suporturile.

19. Selectați **Unload (Descărcare)** pentru a descărca platforma.

20. Inspectați placa Bibliotecii pentru a detecta dacă volumele sunt uniforme în fiecare godeu.



ATENȚIE

Dacă volumele din godeuri sunt neuniforme, e posibil ca speciemele să eșueze la controlul automat al calității.

21. Dacă o depozitați, sigilați și păstrați placa Bibliotecii.

22. Descărcați suporturile, curățați platforma, iar apoi selectați **OK**.

23. Introduceți comentarii despre godeurile afectate, iar apoi selectați **OK**.

24. Efectuați unul dintre următorii pași:

- Pentru a continua cu Quantify Libraries (Cuantificarea bibliotecilor), selectați **Yes (Da)**.
- Pentru a vă opri, selectați **Exit (Ieșire)**.

PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ

Dacă vă opriți, sigilați placa Bibliotecii înainte de depozitare. Placa Bibliotecii este stabilă timp de până la 7 zile de la data pregătirii, la o temperatură între -25°C și -15°C.

Cuantificarea bibliotecilor

Preparare

1. Pregătiți următorii reactivi:

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni
Reactiv de cuantificare ADN	între 2°C și 8°C	Protejați de lumină. Decongelați 30-150-de minute la temperatura camerei. (Se recomandă eliminarea reactivului la începutul procedurii Pregătirea bibliotecilor.) Mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
Standard de cuantificare ADN	între 2°C și 8°C	Mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
Soluție tampon de resuspendare	între 2°C și 8°C	Mixați în agitator vortex.

2. Dacă placa pentru bibliotecii a fost depozitată la congelator, pregătiți-o după cum urmează.
 - a. Confirmați că placa nu a fost depozitată mai mult de 7 zile și decongelați-o la temperatura camerei.
 - b. Mixați în agitator vortex.
 - c. Centrifugați 1 minut la 280 x g.
3. Porniți fluorometrul cu 10 minute înainte de utilizare.
4. Aplicați un cod de bare pentru placă unei noi plăci cu 384 de godeuri.
5. Aplicați un cod de bare pentru placă unei noi plăci cu bordură completă.

Procedură

1. Selectați **OK** pentru a începe cuantificarea.
2. Dacă nu este deja deschisă VeriSeq NIPT Method (Metoda VeriSeq NIPT):
 - a. Deschideți AppLauncher și selectați **VeriSeq NIPT Method (Metoda VeriSeq NIPT)**.
 - b. Introduceți ID-ul de lot și numele utilizatorului și apoi selectați **OK**.
3. Scanați codurile de bare ale casetei de accesorii.

4. Introduceți numele de utilizator sau inițialele preparatorului reactivilor, apoi selectați **OK**.
5. Încărcați vârfurile în suport după cum urmează și apoi selectați **OK**.

Dimensiunea lotului de specimene	Suport Tip	Tract	Articol	Poziția locației
24, 48	Sfat	1-6	Rastel cu vârfuri de 300 µl	1
			Rastel cu vârfuri de 50 µl	2
96	Sfat	1-6	Rastel cu vârfuri de 300 µl	1
			Rastel cu vârfuri de 50 µl	2, 3

6. Confirmați că sunt atașate codurile de bare.
7. La nevoie, desigilați placa pentru bibliotecă.
8. Încărcați plăcile (cod de bare spre dreapta) pe suportul Multiflex după cum urmează și apoi selectați **OK**.

Dimensiunea lotului de specimene	Suport Tip	Tract	Articol	Poziția locației
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Plăci noi cu bordură completă, cu cod de bare	1
			Placă nouă cu 384 de godeuri, cu cod de bare	2
			Placă Bibliotecă, cu cod de bare	3
			Plăci noi cu bordură completă și 96 de godeuri	4, 5

9. Încărcați eprubetele de reactivi fără capace pe suportul de eprubete după cum urmează și apoi selectați **OK**.

Dimensiunea lotului de specimene	Suport Tip	Tract	Articol	Poziția locației
24, 48, 96	Eprubetă	46	Standard de cuantificare ADN	1
			Reactiv de cuantificare ADN	2

10. Încărcați eprubetele de reactivi pe suportul de reactivi după cum urmează și apoi selectați **OK**.

Dimensiunea lotului de specimene	Suport Tip	Tract	Articol	Poziția locației
24, 48, 96	Reactiv	47	Tub de reactiv nou (gol)	1
			16 ml soluție tampon de resuspendare	2

11. Dacă ați oprit protocolul după procedura de pregătire a bibliotecilor, încărcați vârfurile contorizate pe suportul de vârfuri după cum urmează.

Dimensiunea lotului de specimene	Suport Tip	Tract	Articol	Poziția locației
24, 48, 96	Sfat	49–54	Vârfuri de 1000 µl	1
			Vârfuri de 300 µl	2
			Vârfuri de 50 µl	3

12. Introduceți poziția primului vârf pentru fiecare rastel de vârfuri, apoi selectați **OK**.
13. Asigurați-vă că suporturile, vesela de laborator și reactivii sunt încărcați corect și apoi selectați **OK** pe ecranul Library Deck Verification (Verificare platformă pentru bibliotecă).
14. Așteptați să se finalizeze verificarea automată a volumului de reactivi.
15. Observați ML STAR în timpul etapelor automate.
16. Când o impune Workflow Manager, asigurați-vă că platforma de încărcare ML STAR nu este obstrucționată, pentru a permite ca ML STAR să descarce suporturile.
17. Selectați **Unload** (Descărcare) pentru a descărca platforma.
18. Descărcați placa Bibliotecii.
- Inspectați placa pentru a detecta dacă volumele sunt uniforme în fiecare godeu.
 - Sigilați placa Bibliotecii și depozitați la temperatura camerei până când se încheie analiza datelor fluorometrice.
19. Descărcați plăcile rămase cu 96 de godeuri și verificați dacă volumele sunt uniforme în toate godeurile. Erorile mari de volum pot indica o problemă cu pașii de pipetare
20. Descărcați placa cu 384 de godeuri și verificați dacă există lichid în godeurile corespunzătoare.
21. Sigilați placa cu o folie de sigilare.
22. Centrifugați 20 de secunde la 1000 × g.
23. Incubați 10 minute la temperatura camerei, ferită de lumină.
24. Descărcați toate suporturile
25. Curățați platforma instrumentului ML STAR, iar apoi selectați **OK**.



ATENȚIE

Nu eliminați reactivii de cuantificare înainte de obținerea datelor. Aveți nevoie de reactivi dacă doriți să efectuați o recuantificare.

26. După incubare, desigilați placa cu 384 de godeuri și încărcați-o în cititorul de microplăci. Asigurați-vă că ați utilizat placa adaptoare mov (cod piesă: 0310-4336) de la Molecular Devices sau una echivalentă, în funcție de instrumentul utilizat.
- Asigurați-vă că A1 este în colțul stânga sus la încărcare.
27. Faceți dublu clic pe șablonul VeriSeq NIPT pentru a-l deschide în SoftMax Pro.

28. Selectați **New Experiment** (Experiment nou) în fila Home (Pagină principală).
29. Selectați **Read** (Citire).
30. Exportați datele ca XML după cum urmează.
 - a. Faceți clic dreapta pe **Plate** (Placă), apoi selectați **Rename** (Redenumire).
 - b. Scanați codul de bare al plăcii Cuantificare, apoi selectați **OK**.
 - c. În colțul din stânga sus al ecranului, selectați pictograma placă, apoi selectați **Export** (Export) din meniu.
 - d. Bifați caseta de selectare **Expt name** (Nume export), setați opțiunea de dată a plăcii la raw (brută), setați formatul de ieșire la XML, apoi selectați **OK**.
 - e. Setați calea și numele fișierului de ieșire, apoi selectați **Save** (Salvare).Computerul Hamilton trebuie să poată accesa locația fișierului. Nu folosiți spații în numele sau calea fișierului.

Analiză

1. În ML STAR, pe ecranul Scanner Information (Informații scanner), introduceți un ID fluorometru.
2. Introduceți comentarii despre ciclul fluorometrului, iar apoi selectați **OK**.
3. Navigați la fișierul de cuantificare *.xml, care conține datele fluorometrice, și apoi selectați **OK**.
4. Analizați rezultatele analizei pentru curba și concentrația standard ale specimenului, apoi selectați **OK**.
5. Dacă trebuie să rescanați placa, selectați **Rescan** (Rescanare).

Specimenele sunt sensibile la lumină și au o durată de viață limitată. La nevoie, efectuați rescannerarea imediat.
6. Introduceți comentarii despre godeurile afectate, iar apoi selectați **OK**.
7. Evaluați rezultatele și continuați după cum urmează.
 - Dacă rezultatele corespund specificațiilor, treceți la [Cumularea bibliotecilor la pagina 38](#). Pentru specificații, consultați tabelul de cuantificare a valorilor și limitelor de control al calității din *Ghidul software pentru VeriSeq NIPT Solution v2 (nr. document 1000000067940)*.
 - Dacă rezultatele nu corespund specificațiilor, sistemul abandonează metoda. Repetați procedurile de cuantificare, începând cu [Preparare la pagina 34](#).
8. Efectuați unul dintre următorii pași:
 - Pentru a continua cu [Cumularea bibliotecilor la pagina 38](#) (Cumularea bibliotecilor), selectați **Yes** (Da).
 - Pentru a vă opri, selectați **Exit** (Ieșire).

PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ

Dacă vă opriți, sigilați placa Bibliotecii înainte de depozitare. Placa Bibliotecii este stabilă timp de până la 7 zile de depozitare cumulată, la o temperatură între -25°C și -15°C.

Cumularea bibliotecilor

Preparare

1. Pregătiți următorii reactivi:

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni
Soluție tampon de hibridizare	între -25°C și -15°C	Decongelați la temperatura ambiantă. Mixați în agitator vortex. Redepozitați după utilizare.

2. Dacă placa pentru bibliotecii a fost depozitată la congelator, pregătiți-o după cum urmează.
 - a. Confirmați că placa nu a fost depozitată mai mult de 7 zile și decongelați-o la temperatura camerei.
 - b. Agitați 1 minut la 1500 rpm.
 - c. Centrifugați 20 de secunde la 1000 × g.
 - d. Mixați prin pipetare.
3. Etichetați o eprubetă de cumulare goală cu Cumularea A. Pentru 96 de specimene, etichetați o a doua eprubetă de colectare cu Cumularea B.
4. Salvați următorul program de denaturare pe ciclul termic cu capac încălzit.
 - a. Alegeți opțiunea de capac preîncălzit și setați la 102°C.
 - b. Setați volumul de reacție la 50 µl.
 - c. Setați viteza rampă la maximum (≥ 2°C pe secundă).
 - d. Incubați 10 minute la 96°C și 5 secunde la 4°C .
 - e. Mențineți la 4°C.

Procedură

1. Plasați placa Bibliotecii pe ciclul termic preprogramat și rulați programul de denaturare. Nu denaturați placa Bibliotecii înainte de CC pentru valorile de cuantificare, deoarece există posibilitatea să fie necesară recuantificarea.
2. Centrifugați placa pentru bibliotecii 20 de secunde la 1000 × g.
3. Selectați **OK** pentru a inițializa cumularea bibliotecilor.
4. Dacă nu este deschisă VeriSeq NIPT Method:
 - a. Deschideți AppLauncher și selectați **VeriSeq NIPT Method** (Metoda VeriSeq NIPT).
 - b. Introduceți ID-ul de lot și numele utilizatorului și apoi selectați **OK**.
5. Selectați concentrația cumulării, apoi selectați **OK**. Densitatea țintă a clusterului este de 220-260 K/mm².

NOTĂ Concentrațiile și/sau volumele de cumulare pot să necesite sporirea pentru loturi de 24 de specimene pentru a menține densități similare cu ale clusterelor obținute din loturi de 48/96 de specimene.

6. Dacă o impune Workflow Manager, efectuați unul dintre următorii pași:

- Pentru a încărca o fișă de specimen, selectați fișa de specimen asociată lotului și apoi selectați **Load** (încărcare).
- Pentru a utiliza valorile implicite de sistem pentru restul tipurilor de specimen, raportarea sexului sau tipul de screening, selectați **Use Default** (Utilizare valori implicite) pentru fiecare setare. Pentru informații privind crearea unei fișe de specimen, consultați *Ghid software pentru VeriSeq NIPT Solution v2 (nr. document 1000000067940)*.

7. Selectați **Start** pentru a începe cronometrarea plăcii de denaturare.

8. Încărcați vârfurile în suportul pentru vârfuri după cum urmează.

Dimensiunea lotului de specimene	Suport Tip	Tract	Articol	Poziția locației
24, 48, 96	Sfat	7–12	Vârfuri de filtru de 50 µl	1

9. Încărcați placa Bibliotecă denaturată (cod de bare spre dreapta) pe suportul Multiflex după cum urmează și apoi selectați **OK**.

Dimensiunea lotului de specimene	Suport Tip	Tract	Articol	Poziția locației
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Placa Bibliotecă denaturată (cu cod de bare)	1

10. Încărcați eprubetele de cumulare pe suportul de eprubete după cum urmează și apoi selectați **OK**.

Dimensiunea lotului de specimene	Suport Tip	Tract	Articol	Poziția locației
24, 48	Eprubetă	46	Eprubetă de 2 ml nouă, Cumularea A	1
96	Eprubetă	46	Eprubetă de 2 ml nouă, Cumularea A	1
			Eprubetă de 2 ml nouă, Cumularea B	2

11. Încărcați eprubetele de reactivi pe suportul de reactivi după cum urmează și apoi selectați **OK**.

Dimensiunea lotului de specimene	Suport Tip	Tract	Articol	Poziția locației
24, 48, 96	Reactiv	47	3 ml soluție tampon de hibridizare	1

12. Încărcați vârfurile în suportul pentru vârfuri după cum urmează.

Dimensiunea lotului de specimene	Suport Tip	Tract	Articol	Poziția locației
24, 48, 96	Sfat	49–54	Vârfuri de filtru de 1000 µl	1
			Vârfuri de filtru de 300 µl	2
			Vârfuri de filtru de 50 µl	3

13. Introduceți poziția primului și ultimului vârf pentru fiecare rastel de vârfuri, apoi selectați **OK**.
14. Asigurați-vă că ați încărcat corect suporturile, vesela de laborator și reactivii, conform indicațiilor.
15. Pe ecranul Pooling Deck Verification (Verificare platformă cumulare) selectați **OK**.
16. Observați ML STAR în timpul etapelor automate.
17. Introduceți comentarii despre godeurile afectate, apoi selectați **OK**.
18. Când o impune Workflow Manager, asigurați-vă că platforma de încărcare ML STAR nu este obstrucționată, pentru a permite ca ML STAR să descarce suporturile.
19. Selectați **Unload** (Descărcare) pentru a descărca platforma.
20. Descărcați suportul pentru eprubete.
21. Închideți toate eprubetele de cumulare cu capacele, agitați și apoi centrifugați scurt.
22. Selectați **OK**.
23. Secvențiați bibliotecile cât mai curând posibil după cumulare. Sigilați placa pentru biblioteci și depozitați-o între -25°C și -15°C timp de cel mult 7 zile pentru a permite o nouă cumulare.

PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ

Dacă vă opriți, puneți capacul eprubetelor de cumulare și depozitați-le la o temperatură între -25°C și -15°C timp de până la 7 zile.

Pregătirea bibliotecilor cumulate pentru secvențiere

Preparare

1. Pregătiți următorii reactivi:

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni
Eprubete pentru cumulare	între -25°C și -15°C	Dacă au fost depozitate anterior, decongelați la temperatura camerei. Agitați scurt. Centrifugați scurt.

2. Pregătiți sistemul de secvențiere de ultimă generație finalizând următoarele câmpuri în modulul Local Run Manager VeriSeq NIPT Module:
 - a. Run Name (denumire ciclu)
 - b. [Opțional] Descriere
 - c. Pool Barcode (Cod de bare pentru grup)



ATENȚIE

Codul de bare pentru grup introdus în modulul Local Run Manager trebuie să fie identic cu codul de bare pentru grup introdus în Workflow Manager. Configurările incorecte ale ciclului sunt respinse de software-ul de analiză și pot impune resecvențierea.

Pentru mai multe informații privind utilizarea modulului Local Run Manager al VeriSeq NIPT, consultați *Ghid software pentru VeriSeq NIPT Solution v2 (nr. document 1000000067940)*.

Procedură

1. Adăugați următoarele consumabile în cartușul de reactivi, apoi mixați prin pipetare.
 - Soluție tampon de hibridizare (900 µl)
 - 450 µl Cumulare A (450 µl)
2. Pentru instrucțiuni privind secvențierea, consultați ghidul de referință pentru instrumentul de secvențiere de ultimă generație. Pentru NextSeq 550Dx, consultați *Ghid de referință pentru instrumentul NextSeq 550Dx (nr. document 1000000009513)* (sau prospectul aplicabil relevant de pe pagina de asistență Illumina, www.support.illumina.com).
3. Confirmați, la solicitarea software-ului, configurarea corectă a ciclului.
4. Dacă este necesar, repetați această procedură pentru Cumularea B.
 - Pentru a atinge intervalul de densitate țintă pentru cluster, placa bibliotecă se poate recumula la o altă concentrație de cumulare, cu Hamilton. Recumularea anulează validarea cumulării originale.
 - Alternativ, raportul de cumulare cu HT1 (450+900 µl) se poate modifica pentru a se obține intervalul de densitate țintă pentru cluster.

Secvențiere de ultimă generație

VeriSeq NIPT Solution v2 poate fi utilizată cu un sistem de secvențiere de generație nouă cu următoarele specificații:

- Capacitate: 2x36 citiri cu secvențiere la ambele capete.
- Compatibil cu adaptoarele de indexare din VeriSeq NIPT Sample Prep Kit.
- Analiză chimică pe canal dublu
- Creare automată de fișiere BCL (*.bcl) (date brute de la instrumentul de secvențiere).
- 400 de milioane de citiri cu secvențiere la ambele capete per ciclu
- Compatibil cu VeriSeq NIPT Assay Software v2

NextSeq 550Dx este compatibil cu VeriSeq NIPT Solution v2

Analiza datelor de secvențiere

După ce se încheie secvențierea, datele de secvențiere sunt trimise automat la VeriSeq NIPT Assay Software v2 pentru analiză și generarea unui raport. Raportul include clasificările pentru fiecare specimen din lot, precum și o evaluare a tuturor valorilor CC ale ciclului. Procesul de analiză de la finalizarea secvențierii la rezultatele finale durează aproximativ 4 ore pentru un lot de 48 de specimene. Pentru informații detaliate privind analiza datelor și fișierul rezultat, consultați *Ghid software pentru VeriSeq NIPT Solution v2 (nr. document 1000000067940)*.

Interpretarea rezultatelor

Algoritmul VeriSeq NIPT Solution v2 folosește un model statistic complex care combină mai multe tipuri diferite de informații din colecția de fragmente de bibliotecă cu secvențiere la ambele-capete. Acest model este utilizat pentru a detecta regiunile genomului care sunt sub sau suprareprezentate în biblioteca fiecărei specimene. Un aspect important este că acest model determină dacă gradul de sub sau suprareprezentare este în concordanță, din punct de vedere cantitativ, cu un eveniment de aneuploidie din genomul fetal la nivel de fracție fetală estimată pentru bibliotecă.

Pentru toți cromozomii, datele de secvențiere la ambele-capete sunt aliniate la genomul de referință (HG19). Citirile unice neduplicate sunt agregate în compartimente de 100 Kb. Contorizările corespunzătoare ale compartimentelor sunt ajustate pentru a lua în calcul decalajul GC și în conformitate cu acoperirea regiunii genomului stabilită anterior. Folosind contorizări de compartiment normalizate, scorurile statistice sunt derivate pentru fiecare autozom prin compararea regiunilor de acoperire care pot fi afectate de aneuploidie cu restul autozomilor. Se calculează o rată logaritmică a probabilității (log likelihood ratio – LLR) pentru fiecare specimen, luând în calcul aceste scoruri pe bază de acoperire și fracția fetală estimată. LLR este probabilitatea ca un specimen să fie afectat, luând în calcul acoperirea observată și fracția fetală, comparativ cu probabilitatea ca specimenul să fie neafectat, cu luarea în calcul a aceleiași acoperiri observată. Calcularea acestei rate ia în calcul și incertitudinea estimată privind fracția fetală. Pentru calculele ulterioare se folosește rata logaritmică naturală. Software-ul de testare evaluează LLR pentru fiecare cromozom țintă și fiecare specimen trebuie să furnizeze o determinare a aneuploidiei.

În timpul creării lotului, trebuie să definiți tipul de specimen (făt unic sau gemeni), tipul de screening (de bază sau genomic) și raportarea cromozomului sexual (da, nu și SCA) dorite pentru fiecare specimen. Împreună, aceste opțiuni determină informațiile raportate pentru fiecare specimen.

Pentru toate tipurile de specimene, tipul de screening determină ce anomalii autozomale sunt raportate. Pentru tipul de screening de bază se raportează doar evenimentele de trisomie a întregului cromozom care implică cromozomii 13, 18 și 21. Pentru tipul de screening genomic se raportează deleția sau duplicarea integrale ori parțiale ale tuturor cromozomilor autozomali. Lungimea celei mai mici deleții sau duplicări cromozomiale parțiale ce se poate raporta este de 7 Mb.

Pentru speciamele de la făt unic, puteți dezactiva raportarea cromozomului sexual. De asemenea, puteți configura să se raporteze aneuploidiile cromozomului sexual cu sau fără raportarea sexului speciamele euploide.

Pentru speciamele gemelare, dacă se selectează Yes (Da) pentru raportarea cromozomului sexual, rezultatul este limitat la raportarea prezenței sau absenței unui cromozom Y în bibliotecă. Aneuploidia cromozomului sexual nu se poate raporta pentru speciamele gemelare.

NOTĂ Când toate speciamele dintr-un lot au fost raportate cu același sex, se va emite o notificare e-mail/interfață web pentru mixarea accidentală/contaminarea speciamele. Lotul va fi devalidat, fără a se mai emite un raport. (Aplicabil pentru VeriSeq NIPT Solution v2, software server v2.2 și ulterioară).

Un rezultat ANOMALY DETECTED (Anomalie detectată) indică faptul că s-a detectat specimen pozitiv pentru una sau mai multe anomalii, în conformitate cu tipul de screening selectat și cu opțiunea de raportare a cromozomului sexual. Când se detectează o anomalie, raportul furnizează o descriere a anomaliilor în notație citogenică.

VeriSeq NIPT Assay Software v2 utilizează datele statistice generate în timpul secvențierii pentru a furniza o fracție fetală estimată (FFE) pentru fiecare specimen. FFE este componenta cfADN fetal estimată recuperată de test și raportată ca procentaj rotunjit pentru fiecare specimen. Abaterea standard medie a acestei estimări pentru toate speciamele este de 1,3%. Se interzice utilizarea FFE izolat, pentru a exclude speciamele la raportarea rezultatelor.

Pentru a obține citiri de reprezentare cromozomială, VeriSeq NIPT Assay Software v2 utilizează testul individualizat de încredere pentru aneuploidia fetală (iFACT), o valoare de prag dinamică, care indică dacă sistemul a generat o acoperire de secvențiere suficientă luând în calcul estimarea fracției fetale pentru fiecare specimen. Citirile negative sunt raportate doar dacă specimenul atinge pragul iFACT. Dacă specimenul nu atinge acest prag, evaluarea CC afișează FAILED iFACT (iFACT eşuat) și sistemul nu generează un rezultat.

Pe lângă iFACT, VeriSeq NIPT Assay Software v2 evaluează alte câteva valori CC în timpul analizei. Valorile suplimentare includ evaluarea uniformității acoperirii în regiunile genomice de referință și distribuția lungimilor fragmentelor de cfADN. Evaluarea CC afișează fie un marcaj CC, fie o eroare CC pentru orice valoare care nu se încadrează în intervalul acceptabil. În cazul unei erori CC, sistemul nu generează un rezultat pentru specimen. Dacă un specimen este neconform la CC, acesta poate fi reprocesat dacă există un volum suficient de plasmă în eprubeta pentru recoltarea de sânge.

VeriSeq NIPT Solution v2 generează date pentru utilizare într-un raport final. Nu generează un raport final pentru pacient. Clienții sunt responsabili de proiectarea și conținutul raportului final de furnizat medicului de la unitatea medicală. Illumina își declină răspunderea față de precizia formulării raportului final pentru clienți.

**ATENȚIE**

Verificați estimările fracției fetale ale tuturor specimenelor. Dacă fracțiile fetale estimate sunt similare pentru toate speciunile dintr-un ciclu, este posibil să se fi produs o amalgamare a specimenelor care a afectat rezultatele. Contactați departamentul de Asistență tehnică Illumina pentru ajutor cu depănarea.

Caracteristici de performanță

Următoarele date evidențiate în secțiunile referitoare la performanța clinică și analitică au fost generate de utilizarea protocoalelor și materialelor specificate în Instrucțiunile de utilizare începând cu plasma. Toate datele de secvențiere pentru această secțiune au fost generate pe un sistem de secvențiere NextSeq 500/550 sau un sistem de secvențiere NextSeq 550Dx în următoarele configurații:

	NextSeq 500/550	NextSeq 550Dx
Software-ul instrumentului	NextSeq Control Software 4.0	NextSeq Operating Software 1.3
Versiunea kitului de reactivi	NextSeq 500/550 High Output v2.5 (75 cycle) Reagent Kit	NextSeq 550Dx High Output v2.5 (75 cycle) Reagent Kit
Metodă de secvențiere	Secvențiere la ambele capete 2x36 în modul randament ridicat	Secvențiere la ambele capete 2x36 în modul randament ridicat

Studiu clinic

Acuratețea clinică pentru VeriSeq NIPT Solution v2 a fost demonstrată prin evaluarea specimenelor de plasmă de la femei gravide, cu sarcini cu făt unic și gemelare. Speciunile au fost obținute din speciune de plasmă anonimată stocate, prelucrate anterior din speciune de sânge periferic integral. Au fost avute în vedere peste 45.000 de speciune pentru includerea în studiu. Aceste speciune au fost supuse unui screening prenatal anterior pentru aneuploidiile cromozomiale fetale și delețiile și duplicările parțiale de 7 Mb sau mai mari. Toate speciunile din sarcini afectate și un set de speciune consecutive din sarcini neafectate au fost eligibile pentru testare dacă au fost disponibile rezultate clinice și s-au respectat criteriile de selecție a specimenelor. Setul de analiză pentru testare a inclus în total 2.335 de speciune. Din acest set, 2.328 de speciune au fost de la sarcini cu făt unic și șapte speciune au fost de la sarcini gemelare.

Din aceste speciune, 28 (1,2%, 28/2335) nu au îndeplinit CC pentru test la prima testare în timpul analizei datelor de secvențiere finalizate:

- 27 erori iFACT (un XO, 26 neafectate)
- O eroare pentru date în afara intervalului scontat

Caracteristici privind datele demografice și sarcina

Vârsta maternă, vârsta gestațională și trimestrul de sarcină sunt rezumate în [Tabel 7](#) pentru speci­mele din screeningul genomic, inclusiv cele cu mozaicism cunoscut. Majoritatea speci­menelor de testat reprezintă sarcini în primul trimestru.

Datele demografice au fost evaluate între cohorta de bază și cea genomică și nu au indicat nicio diferență statistică. Caracteristicile privind datele demografice și sarcina au fost similare, fie că au fost incluse sau excluse cazurile de mozaicism cunoscute.

Tabel 7 Caracteristici privind datele demografice și sarcina

Date statistice pe scurt	La nivel de genom (inclusiv cazuri de mozaicism cunoscute)
Număr de speci­mene	2307*
Vârsta maternă - ani	
Medie	35,08
Abatere standard	4,04
Mediană	34,95
Percentila 25, percentila 75	32,31, 37,79
Minim, maxim	20,22, 53,02
Vârsta gestațională la recoltarea de sânge - săptămâni	
Medie	10,93
Abatere standard	1,20
Mediană	10,57
Percentila 25, percentila 75	10,29, 11,14
Minim, maxim	10,00, 27,86
Trimestru de sarcină - n (%)	
< Primul (<14 săptămâni)	2.252 (98%)
Al doilea	54 (2%)
Al treilea (≥ 27 săptămâni)	1 (0%)

* Speci­mele finale prezentate au inclus 7 gemeni.

Performanța clinică

Rezultatele determinate cu VeriSeq NIPT Solution v2 au fost comparate cu rezultatele conforme cu standardul de referință clinic. Toate speci­me­nele din studiu au prezentat rezultate conforme cu standardul de referință clinic (veridicitate clinică) pentru starea aneuploidiei cromozomiale fetale și delețiile și duplicatele parțiale mai mari sau egale cu 7 Mb. Rezultatul conform cu standardul de referință clinic pentru speci­me­nele incluse în acest studiu a depins de analiza cromozomială sau examenul fizic al nou-născutului cu rezultat negativ la screeningul NIPT NGS. Clasificarea datelor standardului de referință clinic în conformitate cu documentul de codificare medicală primit de la sponsor a fost efectuată de personal de studiu calificat.

Metodele de analiză cromozomială au inclus cariotiparea, hibridizarea in situ cu fluorescență (FISH) sau micromatricea pentru hibridizare cromozomială genomică comparativă (CMA). Analiza cromozomială a fost efectuată pe sânge periferic sau salivă neonatologică sau de la sugari, speci­me­ne de produse ale concepției (POC), amniocite, vilii corionici, țesuturi placentare sau sânge recoltat postnatal din cordonul ombilical.

Mozaicismul este definit drept prezența a două sau mai multor linii celulare cu compoziție cromozomială diferită la același individ. Liniile celulare își au originea în același zigot. Tipul și nivelul de mozaicism diferă și depind de momentul evenimentelor de mozaicism din timpul embriogenezei și dezvoltării fetale. În diagnosticile prenatale apar diferite tipuri de mozaicism, în funcție de distribuția liniilor celulare anormale comparativ cu cele normale din citotrofoblast, mezenchim sau făt.¹⁰ Deși mozaicismul poate coexista cu orice anomalie cromozomială, este mai frecvent la trisomiile rare decât la trisomiile cromozomilor 21, 18 și 13 (T21, T18 și T13).¹¹ La evaluarea performanței, cazurile de mozaicism au fost incluse în analiza genomică, deoarece scopul acestui tip de screening pentru acest test este detectarea aneuploidiilor autozomale rare (RAA).

Performanța screeningului de bază

Pentru screeningul de bază, anomaliile includ T21, T18 și T13. În analiză a fost inclus un număr total de 2.243 de speci­me­ne de făt unic și gemeni. Toate cele șapte sarcini gemelare au fost detectate corect cu T21 și nu sunt raportate în tabelul următor.

Tabel 8 Sensibilitatea și specificitatea VeriSeq NIPT Solution v2 în detectarea trisomiilor 21, 18 și 13 în screening de bază pentru sarcinile cu făt unic (cu excepția cazurilor de mozaicism cunoscute)

	T21	T18	T13
Sensibilitate	> 99,9% (130/130)	> 99,9% (41/41)	> 99,9% (26/26)
Î 95% bilateral	97,1%, 100%	91,4%, 100%	87,1%, 100%
Specificitate	99,90% (1982/1984)	99,90% (1995/1997)	99,90% (2000/2002)
Î 95% bilateral	99,63%, 99,97%	99,64%, 99,97%	99,64%, 99,97%

Performanța testului pentru screening de bază, conform Tabel 8, este calculată excluzând un subset de 64 de specimene afectate de RAA, deleții sau duplicări parțiale autozomale sau cazuri de mozaicism cunoscute. Aceste 64 de specimene au inclus opt cazuri de mozaicism T21 și trei de mozaicism T18. Cinci dintre aceste 11 specimene au fost identificate ca afectate de anomalia detectată de VeriSeq NIPT Assay Software v2.

Performanța screeningului genomic

Pentru screeningul genomic, orice anomalie include trisomiile, monosomiile și delețiile sau duplicările parțiale mai mari sau egale cu 7 Mb. Specimenele pentru screeningul genomic au cuprins 36 de specimene cu cazuri de mozaicism cunoscute. Au fost testate un număr total de 2.307 de specimene de făt unic și gemeni. Toate cele șapte sarcini gemelare au fost detectate corect cu anomalie la nivelul cromozomului 21 și nu sunt raportate în tabelele următoare.

Performanța screeningului genomic pentru orice anomalie

Tabel 9 Sensibilitatea și specificitatea VeriSeq NIPT Solution v2 în detectarea oricărei anomalii în screeningul genomic (inclusiv cazurile de mozaicism cunoscute)

	Sensibilitate	Specificitate
Estimare % (n/N)	95,5% (318/333)	99,34% (1954/1967)
Î 95% bilateral	92,7%, 97,3%	98,87%, 99,61%

Performanța screeningului genomic pentru aneuploidia autozomală rară

Tabel 10 Sensibilitate și specificitatea VeriSeq NIPT Solution v2 pentru aneuploidia autozomală rară (RAA) în cadrul screeningului genomic (inclusiv cazurile de mozaicism cunoscute)

	Sensibilitate	Specificitate
Estimare % (n/N)	96,4% (27/28)	99,80% (2001/2005)
Î 95% bilateral	82,3%, 99,4%	99,49%, 99,92%

Performanța screeningului genomic pentru delețiile și duplicările parțiale

Tabel 11 Sensibilitate și specificitatea Soluției VeriSeq NIPT v2 pentru delețiile și duplicările parțiale mai mari sau egale cu 7 Mb în cadrul screeningului genomic (inclusiv cazurile de mozaicism cunoscute)

	Sensibilitate	Specificitate
Estimare % (n/N)	74,1% (20/27)	99,80% (2000/2004)
Î 95% bilateral	55,3%, 86,8%	99,49%, 99,92%

Diferențele de performanță între screeningul de bază și screeningul genomic

Metodologia de evaluare pentru trisomiile comune și aneuploidiile cromozomilor sexuali este aceeași pentru screeningul de bază și screeningul genomic. Screeningul de bază aplică algoritmul doar pentru T21, T18 și T13. Cu toate acestea, screeningul genomic dezvoltă această metodologie, pentru a evalua toate trisomiile și RAA și duplicările și delețiile parțiale.

Există două diferențe între raportarea performanței descrisă între screeningul de bază și screeningul genomic. Prima, pentru screeningul genomic, specițiile cu mozaicism cunoscut atât pentru trisomiile comune și RAA, cât și pentru deleții sau duplicări parțiale au fost incluse în parametrii de performanță. A doua, screeningul genomic poate raporta preferențial detecția unei deleții sau duplicări parțiale la o trisomie completă. Prezența unei trisomii complete în plus față de o deleție sau duplicare parțială poate fi observată prin referire la scorul LLR furnizat în raportul suplimentar.

Includerea mozaicurilor în screeningul genomic

Mozaicismul este enumerat ca o limitare a acestui test. Când mozaicismul este prezent, semnalul fetal al unei anomalii este redus și, prin urmare, poate fi mai dificil de detectat fără a compromite specificitatea de ansamblu a testului. Cu toate acestea, deoarece mozaicismul este mai relevant pentru conținutul extins, specițiile cu mozaicism au fost incluse în screeningul genomic.

Dintre cele 64 de speciții incluse în screeningul genomic, dar nu în screeningul de bază, 36 de speciții au fost identificate ca având mozaicism conform standardului de referință clinic. Dintre aceste 36 de speciții, 23 de definiții au corespuns standardului de referință clinic.

Deleția sau duplicarea parțială comparativ cu detectarea aneuploidiei cromozomiale complete

VeriSeq NIPT Solution v2 prezintă opțiuni în meniuri atât pentru screening de bază, cât și pentru screening genomic. În screeningul de bază, un rezultat ANOMALY DETECTED (anomalie detectată) este raportat doar dacă se detectează aneuploidie completă la cromozomii 21, 18 sau 13 și dacă se respectă toate valorile de control al calității. În screeningul genomic, sistemul detectează aneuploidia la toți autozomii și evenimentele de deleție și duplicare parțială de cel puțin 7 Mb.

La utilizarea screeningului genomic, în cazurile în care depășesc pragul LLR atât un eveniment cromozomial integral și CNV pentru același cromozom, sistemul raportează prioritar un eveniment de deleție sau duplicare parțială din determinarea cromozomială integrală dacă dimensiunea deleției sau duplicării parțiale acoperă cromozomul în care s-a detectat evenimentul în proporție mai mică sau egală cu 75%. Dacă regiunea cu deleție și duplicare parțială detectate este mai mare de 75% din dimensiunea cromozomului, evenimentul este raportat drept trisomie sau monosomie completă a întregului cromozom, dacă se depășește, concomitent și pragul LLR pentru întregul cromozom. Din acest motiv, delețiile și duplicările semnificative mai mici sau egale cu 75% din dimensiunea cromozomului pot să indice aneuploidie integrală a cromozomului.

În toate speciamentele, scorul LLR pentru clasificarea întregului cromozom este disponibil în raportul suplimentar. Scorul LLR trebuie analizat în raport cu valoarea limită specificată în [Figura 2](#) înainte de interpretarea rezultatului. De exemplu, o determinare CNV în care scorurile LLR la nivel de cromozom depășesc valoarea limită asigură dovezi suplimentare pentru interpretarea consecventă cu aneuploidia întregului cromozom; pentru exemple, consultați [Tabel 12](#).

În cadrul studiului clinic au existat două speciamente de sarcină cu făt unic cu duplicări semnificativ de mari (una pe cromozomul 21 și una pe cromozomul 18) care au reprezentat mai puțin de 75% din dimensiunea relativă a cromozomului (consultați [Tabel 12](#)). Ambele evenimente au fost raportate ca duplicări parțiale și nu trisomie completă pentru cromozomul respectiv. Scorurile LLR pentru aceste evenimente au fost peste valoarea limită, consecvente cu un rezultat de afectare cu trisomie completă. Pentru o duplicare parțială sau pentru o determinare de trisomie completă, gestionarea urmăririi pentru rezultat NIPT pozitiv îi asigură pacientului testarea de confirmare prin diagnostic prenatal.

Tabel 12 Exemple de evenimente de duplicare mari identificate în timpul screeningului genomic

	Veridicitate clinică	Rezultatul genomic al sistemului	Dimensiunea anomaliei (MB)	% din cromozom	Scoruri LLR
Specimenul 1	Trisomie 21, făt unic	Duplicare parțială la 21	22,50	48,9	19,43
Specimenul 2	Trisomie 18, făt unic	Duplicare parțială la 18	47,00	60,2	12,99

Consultați *Ghidul software pentru VeriSeq NIPT Solution v2 (nr. document 1000000067940)* pentru informații suplimentare privind valorile de control al calității folosite pentru raportarea rezultatelor pentru aneuploidie.

Cromozomii sexuali

Rezultatele privind cromozomii sexuali ai VeriSeq NIPT Solution v2 au fost comparate cu rezultatul conform standardului de referință clinic și sunt rezumate în tabelul următor. Concordanța procentuală a fost calculată pentru șase cromozomi sexuali, în cadrul fiecărui rezultat conform standardului de referință clinic. Concordanța procentuală a fost calculată drept numărul de speciamente în care definirea cromozomului sexual cu VeriSeq NIPT Solution v2 a corespuns cu clasificarea conform standardului de referință clinic, împărțit la numărul total de speciamente cu aceeași clasificare conform standardului de referință clinic.

Tabel 13 Concoranța procentuală pentru clasificarea în funcție de sexul fătului*

Clasificarea în funcție de sexul fătului		Fenotip din examenul fizic al nou-născutului		Rezultate citogenetice							
Detectate	Cario-tip	Feminin	Masculin	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY	Altele*	Absent
Anomalie nedetectată	XX	997	0	21	0	2	0	0	0	0	0
Anomalie nedetectată	XY	0	966	0	15	0	0	0	0	0	1
Anomalie detectată	XO	0	0	0	0	19	0	0	1	0	0
Anomalie detectată	XXX	0	0	0	0	0	17	0	0	1	0
Anomalie detectată	XXY	0	0	0	0	0	0	23	0	1	0
Anomalie detectată	XYY	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0
Total		997	966	21	15	21	17	23	12	2	1
Concor- danță procentuală		100	100	100	100	90,5	100	100	91,7	Nu se aplică	Nu se aplică

* Cinci sarcini gemelare au fost clasificate corect drept prezență Y. Două sarcini au fost clasificate corect drept lipsă prezență Y.

** Alte rezultate citogenetice au fost XXXXX și XYYY.

Valoarea predictivă pozitivă și valoarea predictivă negativă cu VeriSeq NIPT Solution v2

Valoarea predictivă pozitivă (PPV) și valoarea predictivă negativă (NPV) ale testului oferă informații privind capacitatea testului de a fundamenta deciziile clinice în funcție de sensibilitatea, specificitatea testului și probabilitatea ca un făt să fie afectat de trisomie (prevalența) rezultată din pretestare. Deoarece PPV și NPV depind de prevalență și prevalența acestor aneuploidii poate varia în funcție de diferitele populații de subiecți, PPV și NPV au fost calculate pentru o serie de valori plauzibile ale prevalenței, în funcție de valorile sensibilității și specificității observate la screeningul de bază (fără cazuri de mozaicism cunoscute) din studiul privind acuratețea clinică. [Tabel 17](#) se bazează pe screeningul genomic (cu cazuri de mozaicism cunoscute).

Tabel 14 Prevalență, trisomia 21, PPV și NPV în screeningul de bază (fără cazuri de mozaicism cunoscute)

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

Tabel 15 Prevalență, trisomia 18, PPV și NPV în screeningul de bază (fără cazuri de mozaicism cunoscute)

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

Tabel 16 Prevalență, trisomia 13, PPV și NPV în screeningul de bază (fără cazuri de mozaicism cunoscute)

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

Tabel 17 Orice prevalență a anomaliilor, PPV și NPV în screeningul genomic (cu cazuri de mozaicism cunoscute)

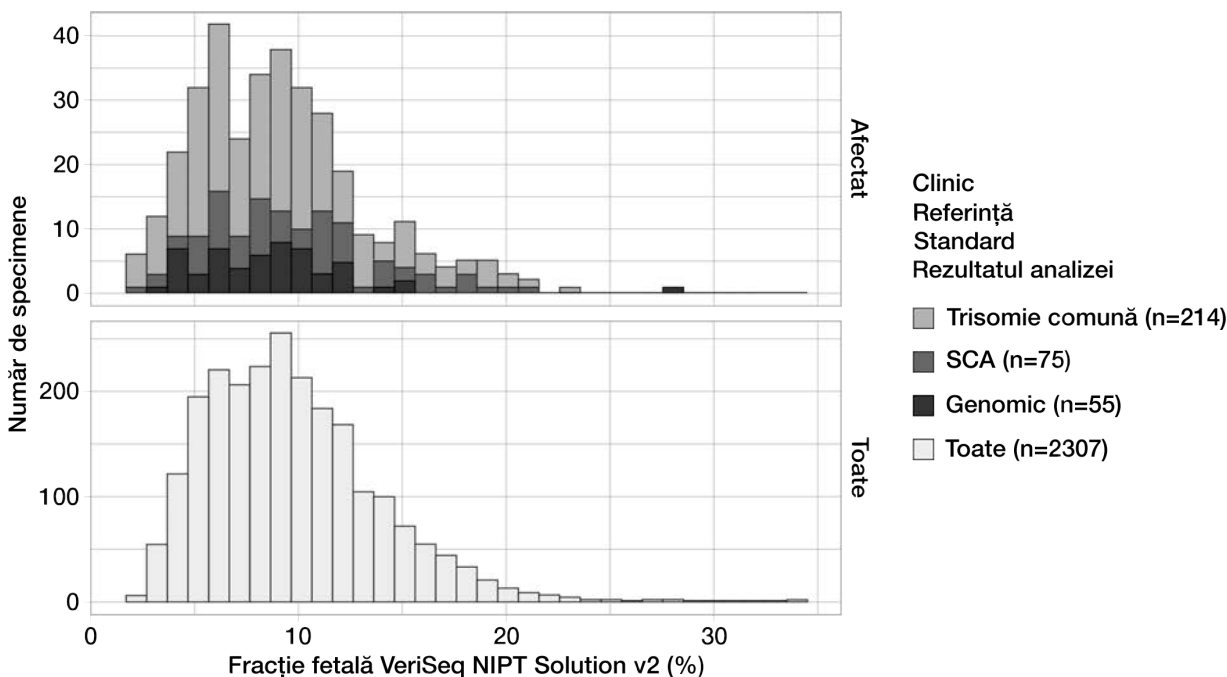
Prevalență (%)	PPV (%)	NPV (%)
0,01	1,42	> 99,99
0,02	2,81	> 99,99
0,05	6,74	> 99,99

Prevalență (%)	PPV (%)	NPV (%)
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

Distribuția fracției fetale

Estimările pentru distribuția fracției fetale (FF) pentru VeriSeq NIPT Solution v2 la screeningul genomic cu cazuri de mozaicism cunoscute sunt prezentate în categoria de rezultate conforme cu standardul de referință clinic, în [Figura 1](#).

Figura 1 Distribuția fracției fetale



5 specimene au prezentat anomalii în mai multe categorii.
Trisomia comună include speci­me­nele cu trisomia 21, 18 și/sau 13.
Nivelul de genom include speci­me­nele cu RAA sau deleții și/sau duc­p­l­icări parțiale.

Estimările FF au variat între 2% și 34% în total, cu o mediană de 9% și interval intercuartilic (IQ) între 6% și 12%. Estimarea medianei FF pentru trisomiile comune și evenimentele detectate de screeningul genomic este de 8%, în vreme ce SCA este de 9%. Intervalul estimărilor FF a fost constant pentru toate rezultatele. Nu există nicio modificare aparentă a distribuției FF între trisomiile comune, SCA, evenimentele detectate de screeningul genomic sau toate speci­me­nele din analiza genomică.

Performanța la sarcinile gemelare

Estimarea trisomiilor 13, 18 și 21 și performanța cromozomului Y în sarcinile gemelare

Datorită prevalenței reduse a trisomiilor 21, 18 și 13 în sarcinile gemelare, doar un număr mic de specimene gemelare afectate a fost disponibil pentru studiul clinic. Pentru a estima performanța VeriSeq NIPT Solution v2 în sarcinile gemelare, au fost utilizate pentru a simula populațiile de sarcini gemelare modele *in silico* bazate pe observațiile din speciamele clinice. Această simulare a fost în conformitate cu populația pentru utilizarea preconizată. Distribuția fracției fetale a fost determinată din aproximativ 4.500 de specimene gemelare și a fost comparată cu distribuția din aproximativ 120.000 de specimene cu făt unic. Distribuția fracției fetale condiționată de starea aneuploidiei a fost determinată din definițiile prezumtive pentru făt unic (1.044 trisomie 21, 307 trisomie 18 și 192 trisomie 13). Combinarea celor două distribuții a permis deducerea detectării aneuploidiei la gemeni. Au fost simulate seturi de gemeni dizigoți și monoziigoți și s-a luat în calcul la estimarea sensibilității o medie ponderată reprezentând prevalența acestora în populația pentru utilizarea preconizată (2 dizigoți:1 monozigot). Pentru specificitate s-au simulat seturi de gemeni neafecțați.

Fracția din fiecare specimen simulat afectată de trisomie (mai exact, fracția afectată) a fost calculată diferit pentru fiecare categorie de specimene:

- Pentru gemenii monoziigoți, fracția afectată din fiecare specimen a fost setată la 1,0, deoarece, în această situație, trisomia afectează ambii gemeni.
- Pentru gemenii dizigoți, s-a presupus că doar unul dintre gemeni a fost afectat (este extrem de rară situația când ambii gemeni dizigoți sunt afectați). Valorile fracției afectate au fost simulate folosind distribuția cunoscută a ratelor fracției fetale determinate pe baza speciameleor clinice gemelare de sexe diferite. S-a apelat la o abordare tradițională prin care s-a presupus că geamănul afectat are cea mai mică fracție fetală dintre cei doi gemeni. S-a aplicat un factor de corecție pentru fracțiile fetale care sunt mai mici, în medie, în sarcinile cu trisomie 13 și 18.
- Pentru gemenii neafecțați, s-a stabilit la zero fracția afectată din fiecare specimen.

Pentru gemenii afectați de trisomia 18 sau 13, s-a redus fracția fetală corespunzătoare fracției afectate a speciameului. Reducerea a fost proporțională cu reducerea medie a fracției fetale observate în datele clinice privind feți unici cu trisomie 18 sau 13 comparativ feți unici euploizi.

Au fost utilizate apoi atât fracția fetală totală, cât și fracția afectată pentru fiecare specimen simulat la calculul scorului pentru aneuploidie, folosind algoritmul VeriSeq NIPT Solution v2. Sensibilitatea s-a calculat determinând cât de des au fost scorurile pentru aneuploidie pentru gemenii afectați simulați peste valoarea limită corespunzătoare aneuploidiei. În consecință, sensibilitatea s-a calculat determinând cât de des au fost sub valoarea limită corespunzătoare aneuploidiei scorurile pentru aneuploidie pentru gemenii neafecțați simulați (Tabel 18). Intervalele de încredere de 95% au fost estimate pe baza numărului de specimene gemelare clinice reale din setul de date original, clasificate fie ca afectate, fie ca neafectate de trisomia în cauză.

Pentru a estima sensibilitatea cromozomului Y în speciamele gemelare au fost simulate seturi de gemeni XY/XY și XX/XY. S-a folosit o medie ponderată care reprezintă prevalența în populația de utilizare preconizată (1 XY/XY: 1 XX/XY). Pentru a estima specificitatea cromozomului Y la gemeni s-a simulat un set de gemeni XX/XX. Valorile totale pentru fracția fetală au fost simulate în conformitate cu distribuția cunoscută a fracției fetale în speciamele gemelare clinice.

Pentru gemenii XY/XY și XX/XY s-au estimat scorurile corespunzătoare ale cromozomului Y, folosind relația cunoscută dintre fracția fetală și scorurile cromozomului Y din speciamele cu făt unic clinice clasificate de sex masculin. Doar pentru gemenii XX/XY s-au simulat valorile fracției fetale afectate (mai exact de sex masculin), folosind distribuția cunoscută a ratelor fracției fetale observate comparativ între gemenii din aceeași sarcină, determinată la speciamele gemelare clinice de sexe diferite. S-a apelat la o abordare conservatoare, prin care fracția afectată a fost selectată astfel încât să corespundă celui mai mic dintre cei doi gemeni. Pentru fiecare specimen XX/XY simulat, scorul cromozomului Y a fost înmulțit cu fracția afectată.

Pentru gemenii XX/XX, scorurile cromozomului Y au fost preluate din scorurile observate la speciamele de făt unic clinice, clasificate de sex feminin. Scorul cromozomului Y și fracția fetală totală au fost apoi folosite pentru a clasifica fiecare specimen simulat ca având cromozom Y prezent sau cromozom Y absent, utilizând algoritmul standard din VeriSeq NIPT Solution v2.

Sensibilitatea a fost calculată determinând cât de des au fost clasificați corect drept având cromozom Y prezent gemenii simulați XY/XY sau XX/XY. Specificitatea a fost calculată determinând cât de des au fost clasificați corect drept având cromozom Y absent gemenii simulați XX/XX. Intervalele de încredere 95% au fost estimate în funcție de numărul de speciame gemelare clinice reale din setul de date original, care au fost clasificate cu cromozom Y prezent sau cromozom Y absent.

Tabel 18 Estimările pentru trisomia 21, 18 și 13 în populația simulată de sarcini gemelare

	Trisomia 21	Trisomia 18	Trisomia 13	Prezența cromozomului Y
Sensibilitate	96,4%	95,7%	93,6%	> 99,9%
Î 95% bilateral	(86,4%, 98,9%)	(68,3%, 99,4%)	(64,1%, 98,9%)	(99,9%, > 99,9%)
Specificitate	99,9%	> 99,9%	> 99,9%	> 99,9%
Î 95% bilateral	(99,8%, > 99,9%)	(99,9%, > 99,9%)	(99,9%, > 99,9%)	(99,7%, > 99,9%)

Tabel 18 prezintă estimările punctuale și intervalele de încredere de 95% pentru sensibilitatea și specificitatea VeriSeq NIPT Solution v2 în detectarea trisomiei 21, 18 și 13 și prezența cromozomului Y într-o populație simulată de sarcini gemelare conformă cu populația de utilizare preconizată. Intervalele de încredere au fost estimate pe baza numărului de controale de calitate la care s-au conformat speciamele gemelare clinice fie ca afectate, fie ca neafectate de trisomia respectivă. Calcularea sensibilității presupune că două treimi din sarcinile gemelare afectate sunt dizigote cu un geamăn afectat, în timp ce o treime din sarcinile gemelare afectate sunt monoizigote, cu ambii gemeni afectați.

Estimările prezentate în **Tabel 18** se referă doar la sarcinile gemelare. Din cauza prevalenței și mai reduse, datele pentru sarcinile cu număr superior de gemeni (cu tripleți sau număr mai mare) au fost insuficiente pentru a stabili modele statistice adecvate pentru estimarea preciziei detectării aneuploidiei.

Performanță analitică

Precizie

Pentru a evalua și cuantifica precizia testului s-a efectuat o nouă analiză a datelor din două studii anterioare privind Soluția VeriSeq NIPT, utilizând software-ul de flux de analiză VeriSeq NIPT Solution v2:

- Studiul multicentric privind reproductibilitatea, ce a cuprins trei cicluri efectuate de trei operatori din trei centre, pe un singur lot de reactiv, pentru un număr total de nouă cicluri.
- Studiul privind precizia intra-laborator, ce a cuprins 12 cicluri la un singur centru, cu două echipamente ML STAR, două sisteme de instrumente de secvențiere și trei loturi de reactivi de secvențiere.

Obiectivul studiului privind precizia a fost cuantificarea preciziei testului pentru trisomia 21 (T21) și cromozomul Y și estimarea variabilității între diferite instrumente, kituri de pregătire a bibliotecii și loturi de reactivi de secvențiere. Reproductibilitatea pentru condiții neenumerate mai sus nu a fost evaluată în cadrul studiilor.

S-a creat un grup T21 cu fracție fetală 5%, combinând cfADN extras din plasmă maternă de la femei însărcinate (cu făt afectat de T21) și cfADN extras din plasmă de la femei care nu sunt însărcinate. De asemenea, s-a creat un grup de cfADN matern-masculin (făt XY) cu fracție fetală 10%. Grupul de specimene pentru fiecare ciclu a inclus 4 replici pentru grupul de specimene afectate de T21 cu fracție fetală 5% și 20 de replici pentru grupul de cfADN matern-masculin cu fracție fetală 10%. Testarea s-a efectuat timp de 10 zile, cu un total de 21 de cicluri, pentru cele două studii, combinate.

T21 și prezența cromozomului Y au fost alese pentru evaluare în funcție de reprezentativitatea condițiilor clinice și complexitatea detectării anomaliei. Deoarece este cel mai mic autozom uman, dimensiunea cromozomului 21 are un impact direct asupra sensibilității detectării T21, în special la valori mici ale fracției fetale ca, de exemplu, cele utilizate în acest studiu. Cromozomul Y, în forma prezentă în plasma maternă, este de origine exclusiv fetală și, prin urmare, este mai ușor de detectat de către test.

Abaterile medii și standard observate pentru scorul LLR al cromozomului 21 și valorile cromozomiale normalizate (NCV - normalized chromosomal values) pentru cromozomul Y au indicat faptul că abaterea standard (SD - standard deviation) a replicii a fost cea mai mare sursă de variabilitate. Diferențele dintre centre, instrumente și loturi de reactiv au adăugat o variabilitate nesemnificativă, dovedită prin diferența dintre SD totală și SD pentru replici în [Tabel 19](#) și [Tabel 20](#).

Tabel 19 Rezumat, deviația standard (SD) în răspunsul la secvențiere efectuată multicentric (reproductibilitate)

Răspuns	N	Mediu	SD replică	SD pentru reproductibilitate totală*
Scor LLR cromozom 21	36	34,43	11,36	11,36
NCV cromozom Y	180	190,56	7,96	10,20

*Totalul include variabilitatea generată de centru, operator, rulare, zi și replică.

Tabel 20 Rezumat, precizia intra-laborator a răspunsului la secvențiere

Răspuns	N	Mediu	SD replică	SD totală intra-laborator*
Scor LLR cromozom 21	48	36,01	9,07	10,25
NCV cromozom Y	240	198,68	7,63	7,82

*Totalul include variabilitatea generată de instrumentul de secvențiere, lotul de reactiv, operator, rulare, zi și replică.

S-a efectuat un studiu suplimentar pentru a compara precizia de secvențiere a VeriSeq NIPT Solution v2 (abatere standard totală) cu Flow Cell versiunea 2.0, comparativ cu Flow Cell versiunea 2.5. Studiul a inclus două tipuri de Flow Cell (v2.0 și v2.5), trei loturi de kituri de secvențiere, patru sisteme de instrumente și două cicluri de secvențiere pentru un total de 48 de teste la un singur centru. Un grup de secvențiere a fost pregătit din plăcile cfADN pregătite manual. Grupul de specimene a inclus 4 replici pentru grupul de specimene afectate T21 cu fracție fetală 5% și 20 de replici pentru grupul cfADN matern-masculin (făt XY) cu fracție fetală 10%. Rezultatele studiului sunt prezentate în Tabel 21 și sprijină afirmația că nu există diferențe ale preciziilor de secvențiere între Flow Cell v2.0 și cu Flow Cell v2.5.

Tabel 21 Rezumat, precizia răspunsului la secvențiere, Flow Cell v2.0 comparativ cu Flow Cell v2.5

Răspuns	Număr de observații/versiune	SD totală v2.0*	SD totală v2.5*	Rezultat statistic**
Scor LLR cromozom 21	96	9,56	8,44	Echivalent statistic (valoarea-p = 0,25)
NCV cromozom Y	480	7,74	7,38	Echivalent statistic (valoarea-p = 0,38)

*Totalul include variabilitatea generată de instrumentul de secvențiere, lotul de reactiv, rulare, zi, replică

**Pe baza testului Fisher pentru egalizarea varianței (abateri standard la pătrat)

Contaminarea încrucișată

Contaminarea încrucișată a fost evaluată în fluxul de pregătire a specimenului pentru VeriSeq NIPT Solution. Grupele de plasmă de la femei neînsărcinate (XX) și bărbați adulți (XY) au fost testate pe 4 plăci, în model de tablă de șah, în formatul placă cu 96 de godeuri. N = câte 48/placă pentru speciemenele de la femei și bărbați, totalizând 192 de speciemenes de la femei și 192 de la bărbați. Niciunul dintre speciemenes de la femei nu a indicat prezență a cromozomului Y mai mare statistic decât baza estimată, ceea ce atestă că nu a existat contaminare încrucișată de la speciemenes de la bărbați de pe aceeași placă. În VeriSeq NIPT Solution nu s-a observat deloc contaminare încrucișată detectabilă.

Substanțe care pot interfera

Impactul substanțelor care pot interfera a fost evaluat în VeriSeq NIPT Solution prin evaluarea performanței testului în prezența unor astfel de substanțe.

Albumina, bilirubina, hemoglobina și trigliceridele (endogene) au fost adăugate treptat, în doze prestabilite, în grupele de plasmă maternă de la sarcini neafectate cu făt de sex feminin (făt XX). Au fost testate la două concentrații pentru fiecare substanță testată (n=16 pentru fiecare). Nu s-a observat nicio interferență în performanța testului.

Tabel 22 Substanțe care pot interfera (endogene)

Substanță testată	Concentrație testată redusă (mg/ml)	Concentrație testată ridicată (mg/ml)
Albumină	35	50
Bilirubină	0,01	0,15
Hemoglobină	100	200
Trigliceride	1,5	5

ADN-ul genomic matern (gDNA) prezent natural în plasmă poate, de asemenea, să interfereze cu performanța testului, deoarece poate fi extras împreună cu cfADN fetal. Nivelurile de ADN genomic la 1,6, 3,3 și 4,9 ng per specimen (corespunzând abaterilor standard 1, 2 și 3 peste concentrațiile de gDNA medii scontate după 7 zile de stocare a sângelui integral¹²) au fost adăugate la cfADN extras din plasma maternă de la sarcini neafectate cu făt de sex feminin (făt XX). Specimenele au fost apoi testate în VeriSeq NIPT Solution (n=16 pentru fiecare concentrație). Nu s-a observat nicio interferență în performanța testului în prezența nivelurilor ridicate de gDNA.

Douăzeci de substanțe medicamentoase care pot interfera (exogene), folosite sau prescrise frecvent în timpul sarcinii, au fost testate în conformitate cu EP7-A2 (Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline-Second Edition). Cele 20 de substanțe care pot interfera au fost combinate în patru grupuri, adăugate treptat, în doze prestabilite, în plasma maternă de la femeii neafectate cu făt de sex feminin (făt XX) și au fost testate cu VeriSeq NIPT Solution (n=16 pentru fiecare grup). Nu s-a observat nicio interferență în performanța testului în prezența acestor substanțe exogene.

Tabel 23 Substanțe care pot interfera (exogene)

Grupul 1	Grupul 2	Grupul 3	Grupul 4
Acetaminofen	Difenhidramină	Albuterol	Cetirizină
Acetilcisteină	Eritromicină	Bupropionă	Dextrometorfan
Bisoprolol	Guaifenesină	Cafeină	Acid L-ascorbic
Citalopram	Heparină	Sertralină	Metoprolol
Desloratadină	Lidocaină	Fluorură de sodiu	Nadolol

Limita de detecție

Limita de detecție (LOD) este definită drept nivelul fracției fetale care corespunde probabilității de 95% de detecție a unei boli de interes, ca, de exemplu, T21. Pentru a evalua LOD pentru VeriSeq NIPT Solution v2 pentru diferite afecțiuni frecvente s-au efectuat studii și analize statistice.

Probabilitatea detectării unei boli de interes într-un specimen afectat, procesat de VeriSeq NIPT Solution v2, depinde, în principal, de trei factori:

- Frație fetală
- Profunzimea secvențierii
- Dimensiunea și complexitatea regiunii genomice de interes

În ipoteza că profunzimea secvențierii este constantă, o aberație dată este mai ușor de detectat într-un specimen cu procentaj de fracție fetală mai mare decât într-unul cu procentaj de fracție fetală mai mic. În schimb, în ipoteza că fracția fetală este constantă, o anumită aberație este mai ușor de detectat într-un specimen cu profunzime a secvențierii mai mare decât într-un specimen cu profunzime a secvențierii mai mică. În ultimul rând, aberațiile din zonele genomice mai mici sau mai complexe sunt mai greu de detectat decât aberațiile din zonele genomice mai mari sau mai puțin complexe, în ipoteza unei fracții fetale și a unei profunzimi a secvențierii constante.

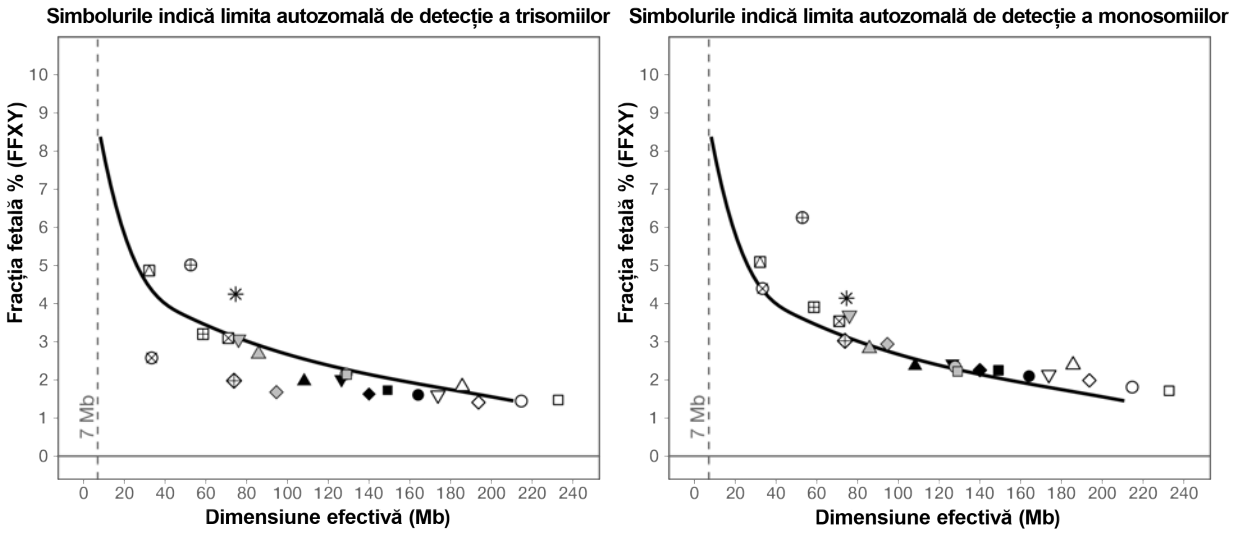
Pentru a determina LOD pentru detectarea T21 s-au analizat specimene T21 cumulate și specimene neafectate cumulate. Cele două tipuri de analit au fost mixate într-o serie de titrări, pentru a crea un set de fracții fetale cu șapte niveluri (0, 2, 3, 4, 5, 6 și 10%). Fiecare nivel a fost reprezentat de un număr total de 10 replici.

Pentru a crește și mai mult rezoluția grilei fracției fetale pentru analiza LOD, datele din studiu au fost adăugate la datele obținute dintr-o diluție in silico. Efectele diluției și titrării experimentale au fost simulate prin combinarea controlată a datelor de secvențiere. Datele din această titrare in silico au acoperit un set de fracții fetale cu 14 niveluri (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 și 4,50%) cu 32 de replici pentru fiecare nivel. S-a aplicat o analiză a regresiiilor probit la datele rezultate pentru a se determina LOD pentru T21.

Independent, s-a dezvoltat un model statistic care utilizează fracția fetală, profunzimea secvențierii și dimensiunea/complexitatea genomică pentru a prognoza probabilitatea de detectare a oricărei aberații din orice specimen. Acest model a fost determinat pe baza datelor corespunzătoare unui set de 1.405 specimene XY. S-a determinat că LOD pentru T21 prognozată prin acest model este conformă estimării pe bază de regresie probit susmenționate. Acest model statistic a fost utilizat pentru a estima valorile LOD pentru aneuploidii la toți autozomii și pentru delețiile și duplicările parțiale.

Figura 2 prezintă probabilitatea de detecție de 95% pentru zonele medii, în funcție de dimensiuni și de limitele de detecție autozomale pentru toate trisomiile și monosomiile. Valoare-limită CNV LLR 15,1.

Figura 2 Probabilitățile de detecție de 95% pentru zonele medii, în funcție de dimensiuni, pentru VeriSeq NIPT Solution v2



Chr	Simbol	Trisomie		Monosomie	
		Oprire LLR	LoD (%)	Oprire LLR	LoD (%)
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	Simbol	Trisomie		Monosomie	
		Oprire LLR	LoD (%)	Oprire LLR	LoD (%)
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

Depanare

VeriSeq NIPT Solution v2 – Depanare

Mod eroare	Rezultat posibil	Interpretare	Acțiune recomandată	Comentarii
Plasmă introdusă insuficientă	Eroare CC pentru specimen	Volum de plasmă insuficient.	Nouă recoltare	Pe baza inspectării vizuale a volumului de plasmă.
Eroare eprubetă de sânge	Sângele nu este separat în straturi	Specimenul nu a fost centrifugat.	Asigurați-vă că centrifuga este pornită și că forța de centrifugare aplicată eprubetei a fost corectă. Recoltați din nou specimen.	
		Depozitare sau transport impropriu al specimenului (hemolizarea specimenului).	Recoltați din nou specimen.	Specimenele congelate nu se separă. Condițiile de transport sau depozitare improprie pot duce la hemolizarea specimenelor.

Mod eroare	Rezultat posibil	Interpretare	Acțiune recomandată	Comentarii
Colmatarea specimenului/debit lent	Contaminarea plasmei	Specimenele individuale pot colmata placa de fixare dacă există contaminare semnificativă a specimenului de plasmă.	Inspectați specimenul. Dacă plasma rămasă în eprubetă este roșie sau lăptoasă, anulați specimenul și solicitați o nouă recoltare. Dacă specimenul pare normal, retestați-l.	
	Specimen în exces	Inspecție vizuală inadecvată a fiecărei eprubete pentru corectitudinea specimenului.	Invalidați toate speciamele din godeurile din apropiere afectate de excesul de specimen.	Poate indica transportul și depozitarea incorecte ale speciamelelor înainte de procesare. Exclueți de la procesare speciamele inadecvate.
	Defecțiune de hardware	Digerare inadecvată a materialului în timpul extracției	Testați din nou specimenul. Dacă problema persistă în locația godeului cu alte speciame, contactați departamentul de Asistență tehnică Illumina.	

Mod eroare	Rezultat posibil	Interpretare	Acțiune recomandată	Comentarii
Eroare de CC la analiza specimenului individual	Eroare CC la secvențiere	<p>Potențialele cauze sunt:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Insuficient material genetic introdus • Transfer incorect la manipularea specimenului • Reactiv de secvențiere defect 	<p>Verificați adnotarea specimenului. Verificați dacă există performanță similară la speciamele anterioare în poziția corespunzătoare pe placă. Testați din nou specimenul.</p>	<p>Indică o cantitate de specimen introdusă insuficientă, fie un transfer greșit pe ML STAR. Materialul genetic insuficient se poate datora ADN-ului acelular insuficient din plasmă sau ADN-ului celular care determină supradiluarea specimenului pentru secvențiere.</p>
	Număr FF redus sau centre neexcluse (NES)	Date insuficiente generate pentru raportare exactă	Testați din nou din plasmă.	

Mod eroare	Rezultat posibil	Interpretare	Acțiune recomandată	Comentarii
Eroare CC la cuantificare	Ciclu de cuantificare eşuat. Mediana lotului sub valoarea minimă	Randament insuficient al procesului	Repetăți cuantificarea. Dacă și repetarea eşuează, contactați departamentul de Asistență tehnică Illumina.	Neîntrunirea valorilor curbei standard indică fie probleme la pregătirea bibliotecii (utilizarea de etanol care nu e de uz biologic) sau probleme în procesul de cuantificare.
	Ciclu de cuantificare eşuat	Eroare de curbă standard.	Repetăți cuantificarea. Dacă și repetarea eşuează, contactați departamentul de Asistență tehnică Illumina.	
Eroare de grupare	Nu s-a putut finaliza gruparea specimenului	Analiza grupării nu poate calcula volumele de grup corecte.	Reevaluați concentrația grupului țintă. Reluați analiza pe grup.	

Depanarea VeriSeq NIPT Microlab STAR

Etapă de proces	Cod de eroare	Dialog de eroare	Descriere	Soluția pentru utilizator
Crearea unui lot	EM0044	The Batch ID entered contains forbidden characters. (ID lot introdus conține caractere interzise.)	VeriSeq NIPT Solution v2 acceptă doar numere, litere, caractere de subliniere și cratime pentru toate câmpurile de date.	Redenumiți lotul folosind un nume care nu conține niciun caracter special.

Etapă de proces	Cod de eroare	Dialog de eroare	Descriere	Soluția pentru utilizator
Crearea unui lot	EM0051	The Batch ID is greater than 36 characters in length. (ID lot este mai lung de 36 de caractere.)	VeriSeq NIPT Solution v2 limitează lungimea numelor de lot la maximum 36 de caractere.	Redenumiți lotul folosind un nume care să aibă mai puțin de 36 de caractere.
Crearea unui lot	EM0076	Unable to connect to VeriSeq Onsite Server v2 (Imposibil de conectat la serverul local VeriSeq v2)	Serverul local VeriSeq v2 nu răspunde la solicitările de date primite de la Workflow Manager.	<ol style="list-style-type: none"> Asigurați-vă că ML STAR este conectat la rețea. Asigurați-vă că serverul local VeriSeq v2 este pornit. Verificați dacă ML STAR se poate conecta la serverul local VeriSeq v2 (prin solicitare ping). Dacă pașii de mai sus nu rezolvă problema, contactați departamentul de Asistență tehnică Illumina.
Crearea unui lot	EM0118	This batch has been failed and cannot be further processed. (Acest lot a eșuat și nu poate fi procesat mai departe.)	Lotul specificat a eșuat deja și nu mai poate fi procesat mai departe.	Registrul de lot de pe serverul local VeriSeq v2 indică faptul că lotul selectat a eșuat. Nu este permisă procesarea în continuare. Creați un alt lot cu speciamele necesare.
Crearea unui lot	Nu se aplică	This batch has already completed processing. Would you like to repool? (Acest lot a încheiat deja procesarea. Doriți să reluați cumularea?)	Lotul indicat a fost procesat prin cumulare. Singura procesare permisă este o nouă cumulare.	<p>Refaceți cumularea după cum urmează.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Selectați Re-Pool (Recumulare). • Abandonați metoda și asigurați-vă, înainte de recumulare, că numele de lot este corect.

Etapă de proces	Cod de eroare	Dialog de eroare	Descriere	Soluția pentru utilizator
Izolarea plasmei	WP0087	Duplicate sample barcodes loaded. (S-au încărcat coduri de bare duplicat pentru specimen.)	În sistem s-au încărcat specimene cu coduri de bare identice.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Urmați indicațiile Workflow Manager pentru a identifica specimenele duplicate. 2. Eliminați duplicatele și reetichetați-le ori înlocuiți-le. 3. Reîncărcați specimenele.
Izolarea plasmei	EP0102	Samples specified in the Sample Sheet were not loaded. (Specimenele din fișa de specimen nu au fost încărcate.)	Specimenele din fișa de specimen nu au fost incluse în codurile de bare încărcate.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Urmați indicațiile Workflow Manager pentru a identifica specimenele lipsă. 2. Selectați una dintre următoarele opțiuni. <ul style="list-style-type: none"> • Adăugați specimenele lipsă din lot și reîncărcați-le • Abandonați metoda, modificați după cum este necesar fișa de specimen. Reporniți metoda
Încărcătura plăcii	Nu se aplică	Venus Barcode Mask Error (Eroare mască pentru cod de bare Venus)	Workflow Manager impune asocierea corectă placă/lot, cu măști pentru cod de bare Venus.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Verificați poziționarea plăcii pentru a confirma dacă organizarea plăcii este corectă. 2. Asigurați-vă că placa încărcată este placa corectă pentru lotul indicat.

Etapă de proces	Cod de eroare	Dialog de eroare	Descriere	Soluția pentru utilizator
Extragerea cfADN (ADN liber circulant)	WE0150	Pressure in the vacuum chamber is too low. (Presiunea din camera de vid este prea joasă).	Workflow Manager nu va continua dacă presiunea detectată pe conducta de vid în repaus este < 400 Torr.	<ol style="list-style-type: none">1. Verificați să nu existe îndoituri sau alte obstrucții pe conducta de vid.2. Deschideți clemele de pe conducta de evacuare a deșeurilor, lăsați să se depresurizeze și apoi închideți complet clemele de pe conducta de evacuare.3. Asigurați-vă că sunt pornite controlerul și pompa de vid.4. Verificați recipientul de evacuare a deșeurilor prin vidare. Dacă recipientul de deșeuri este mai mult de jumătate plin, goliți-l.5. Dacă problema persistă, contactați departamentul de Asistență tehnică Illumina.
Extragerea cfADN (ADN liber circulant)	WE0153	Pressure in the vacuum chamber is too high. (Presiunea din camera de vid este prea ridicată).	Dacă presiunea măsurată a vidului este prea ridicată înainte de a se iniția controlul presiunii, este posibil ca sistemul să funcționeze defectuos.	Verificați cuplarea corectă a tuturor fittingurilor și conductelor de vid la panoul dorsal al controlerului.

Etapă de proces	Cod de eroare	Dialog de eroare	Descriere	Soluția pentru utilizator
Extragerea cfADN (ADN liber circulant)	WE0996	Vacuum failed to seal.	The seal failure must be resolved before continuing. (Sistem de vid neetanș. Trebuie rezolvată neetanșeitaea înainte de a continua.)	Verificați dacă neetanșeitaea a fost rezolvată înainte de a selecta OK . 1. Asigurați-vă că placa de fixare este la același nivel cu colectorul de vid. Cu mâna înmănușată, forțați prin apăsare placa de fixare. 2. Ascultați dacă se aude bâzâitul pompei de vid și observați debitul apei prin placa de fixare. 3. Deschideți vizualizarea urmării pe Workflow Manager. După ce valoarea reală a presiunii ajunge cu cel puțin 50 de unități de presiune sub presiunea ambiantă, selectați OK pentru a trece la extracția cfADN. 4. Dacă valoarea necesară a presiunii nu s-a atins în timpul alocat, selectați OK pentru a continua cu prima încărcătură de lizat. 5. Puneți metoda în pauză după dispensarea lizatului pe placa de fixare. Reamplasați și forțați prin apăsare pe placa de fixare. 6. Dacă lizatul nu curge în toată placa, contactați Asistența tehnică Illumina.

Etapă de proces	Cod de eroare	Dialog de eroare	Descriere	Soluția pentru utilizator
Extragerea cfADN (ADN liber circulant)	WM0219	If Vacuum is on, manually rest the pump. (Dacă vidul este pornit, treceți manual pompa în repaus.)	Vidul poate rămâne activat după abandonarea unei metode în timpul extragerii.	<ol style="list-style-type: none"> Pe controlerul sistemului de vid, apăsați butonul de pornire pentru a decupla vidarea. Așteptați 10 secunde, apoi apăsați din nou butonul de pornire pentru a activa vidarea.
Extragerea cfADN (ADN liber circulant)	EE0477	An error has occurred while moving a plate. (iSWAP error) (A intervenit o eroare la deplasarea unei plăci. (Eroare iSWAP))	Dacă apare o eroare iSWAP (căderea plăcii, preluare eșuată etc.), sistemul îi va solicita utilizatorului să finalizeze manual deplasarea plăcii.	<p>Asigurați-vă că placa se poate recupera (nu există material vărsat).</p> <ul style="list-style-type: none"> Dacă placa nu poate fi recuperată, abandonați ciclul. Dacă placa poate fi recuperată, urmați instrucțiunile afișate pentru a finaliza manual transferul plăcii.
Extragerea cfADN (ADN liber circulant)	EE0519	Scanned barcode does not match binding plate barcode on record. (Codul de bare scanat nu corespunde codului de bare al plăcii de fixare din evidențe.)	Placa de fixare încărcată nu corespunde codului de bare al plăcii scoase.	Asigurați-vă că placa încărcată corespunde codului de bare înregistrat (consultați jurnalul de urmărire pentru a vedea codul de bare prevăzut).

Etapă de proces	Cod de eroare	Dialog de eroare	Descriere	Soluția pentru utilizator
API	EA0372	Unable to connect to the data server. (Conectarea la serverul de date imposibilă.)	Serverul local VeriSeq v2 nu răspunde la solicitările de date primite de la Workflow Manager.	1. Asigurați-vă că ML STAR este conectat la rețea. 2. Asigurați-vă că serverul local VeriSeq v2 este pornit. 3. Verificați dacă ML STAR se poate conecta la serverul local VeriSeq v2 (prin solicitare ping).
	EA0774	Connection Error (Eroare de conexiune) Conexiunea la serverul API nu a fost validată.	Serverul local VeriSeq v2 nu mai răspunde la solicitările de date de la Workflow Manager.	Asigurați-vă că: 1. Asigurați-vă că ML STAR este conectat la rețea. 2. Verificați dacă ML STAR se poate conecta la serverul local VeriSeq v2 (prin solicitare ping). 3. Asigurați-vă că serverul local VeriSeq v2 este pornit.
	EA0780	403: Invalid Request (Solicitare nevalidă) Tranzacția curentă nu este validă.	Datele trimise încalcă logica fluxului de lucru al sistemului.	Consultați detaliile erorii pentru mai multe informații. Cauzele frecvente implică intrări prea lungi sau care nu respectă lista de caractere permisă.

Referințe

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.

Istoricul reviziilor

Document	Data	Descrierea modificării
Nr. document 1000000078751 v05	Aprilie 2024	<p>Eliminări</p> <ul style="list-style-type: none"> • Piesă nr. 20030577, uzură morală. • Cerință de capacitate maximă a eprubetelor pentru centrifuga pentru eprubete de recoltare de sânge. <p>Adăugiri</p> <ul style="list-style-type: none"> • Piesă nr. 20101927 nouă, pentru serverul local VeriSeq v2. • Unitatea de dimensiune pentru eprubetele de recoltare de sânge de 10 ml. • Clarificare a versiunilor SoftMax Pro compatibile • Notă de clarificare pentru obligația de utilizare de produse din plastic compatibil pentru a asigura interschimbabilitatea xu VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Notă privind contaminarea prin amestec accidental al speciemenelor în secțiunea Interpretarea rezultatelor. • Atenționare: nu congelați speciemenele din sânge integral colectate în BCT pentru ADN acellular Streck. • Atenționare: evitați expunerea speciemenelor la temperaturi ridicate. • Clarificare privind limitările testului și condițiile pentru reproductibilitate. • Clarificare pentru valoarea-limită LLR CNV în Figura 2 din secțiunea Limita de detecție. <p>Actualizări</p> <ul style="list-style-type: none"> • Referința pentru casetă de reactivi compatibilă de la Roche Reagent Tub și adăugire a unui nou nr. piesă. • Thermo Fisher Multifuge X4 Pro-MD, nr. de catalog piesă actualizat la 75016034. • Atenționare: volumele neuniforme în godeuri pot duce la eșecul CC automat. • Referință pentru prospectele instrumentelor.
Nr. document 1000000078751 v05	August 2022	<p>Actualizare a numărului de piesă pentru fluxul de lucru</p> <p>Eliminarea instrucțiunii de mixare prin pipetare dacă placa a fost congelată anterior.</p>

Document	Data	Descrierea modificării
Nr. document 1000000078751 v05	Mai 2022	<p>Împărțirea secțiunii Limitările procedurii în Raportare VeriSeq NIPT Solution v2 cu includerea primelor două elemente din listă și Limitările testului (restul textului).</p> <p>Eliminări</p> <ul style="list-style-type: none"> • VeriSeq la toate etichetele pentru reactivi. • Aplicați cod de bare de placă pe placa adaptor VeriSeq NIPT în procesul de pregătire a bibliotecilor. <p>Adăugiri</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cuvântul „certificată” în sintagma apă certificată fără ADNază/ARNază. • Unul din următoarele cititoare de microplăci sau cititor echivalent, SpectraMax M2, M3, M4, M5 și nota. • În secțiunea VeriSeq NIPT Microlab STAR, explicație pentru măsurile de adoptat în cadrul unui eveniment de procesare a unei erori. • Notă privind inspectarea vizuală a godeurilor. • Instrucțiuni privind loturile de 24 și 48 de specimene în toate secțiunile protocolului. • Pași privind momentele de utilizare a adaptorului de plăci mov sau a unuia echivalent. • Text privind includerea rezultatelor pentru sarcinile în primul trimestru în secțiunea Date demografice și caracteristici ale sarcinii. • Un element pe lista cu specificațiile plăcilor cu godeuri adânci incluzând specificația „rezistent la torsiune”. <p>Actualizări</p>
		<ul style="list-style-type: none"> • Text privind numele unice de loturi pentru claritate cu includerea unui exemplu. • Simboluri și formatare pentru Note, Atenționări și Avertizări. • Rezultate pentru sublistele testului. • Modificarea tiocianatului de guanidină în hidroclorură de guanidină. • Modificarea CVS în BVS (Basic Vacuum System/sistem de vid de bază) • Text privind utilizarea screeningului genomic și a scorului LLR. • Specificații: Specificații privind caseta de reactivi, plăci cu godeuri adânci, plăci cu 384 de godeuri, plăci cu 96 de godeuri

Document	Data	Descrierea modificării
Nr. document 1000000078751 v06	August 2021	Actualizare, adresa Reprezentantului autorizat în UE.
Nr. document 1000000078751 v05	Decembrie 2020	<p>Actualizarea secțiunilor Principiile procedurii, Avertizări și precauții și Etichetarea produsului cu clarificări suplimentare, pentru respectarea cerințelor de reglementare.</p> <p>Actualizări minore ale conținutului din protocol, pentru a corespunde stilului și organizării Illumina curente.</p> <p>Corectarea descrierii cromozomului 21, din „cel de-al doilea cel mai mic autozom uman” în „cel mai mic autozom uman” în secțiunea Precizie din Performanța analitică.</p> <p>Adăugarea de atenționări privind utilizarea necorespunzătoare a rezervoarelor și riscurile de mixare accidentală a speciemenelor în secțiunile Izolarea plasmei, Pregătire și Interpretarea rezultatelor.</p> <p>Adăugarea de noi numere de piesă pentru server și software, pentru lansarea noului model de server și actualizările numerelor de piesă pentru software.</p> <p>Adăugarea de atenționări la informațiile despre protocol și depanare, privind excedentul de specimen.</p> <p>Actualizarea ingredientelor active din reactivul standard de cuantificare ADN din caseta de accesorii, pentru armonizarea cu Fișa cu date de securitate.</p> <p>Actualizarea convențiilor de denumire ale modulului Local Run Manager al VeriSeq NIPT, pentru consecvența cu alte documentații.</p> <p>Adăugarea istoricului reviziilor.</p>
Nr. document 1000000078751 v04	Octombrie 2020	Corecturi minore.
Nr. document 1000000078751 v03	Septembrie 2020	Actualizarea listei de materiale pentru a prezenta specificațiile veselei de laborator, împreună cu opțiunile compatibile cunoscute.

Document	Data	Descrierea modificării
Nr. document 1000000078751 v02	Februarie 2020	<p>Actualizarea prezentării informațiilor din secțiunea Performanța clinică, pentru a reda mai bine diferențele dintre tipurile de screening de bază și genomic.</p> <p>Adăugarea noii secțiuni Diferențe de performanță între screeningul de bază și screeningul genomic.</p> <p>Eliminarea informațiilor contradictorii despre caracterul opțional al raportului suplimentar din secțiunea Principiile procedurii.</p> <p>Actualizarea convenției de denumire pentru software-ul VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 în întregul document, pentru consecvență stilistică.</p> <p>Actualizarea etichetării adreselor pentru Illumina din Australia și Țările de Jos, pentru a reflecta schimbări recente.</p>
Nr. document 1000000078751 v01	August 2019	Eliminarea pasului dublat din Extragerea cfADN, cauzat de o eroare a software-ului de publicare.
Nr. document 1000000078751 v00	Mai 2019	Versiunea inițială.

Brevete și mărci comerciale

Prezentul document și conținutul său constituie proprietatea Illumina, Inc. și a afiliaților săi (Illumina), fiind destinate exclusiv utilizării contractuale de către client, în legătură cu folosirea produsului sau produselor descrise în prezentul document, utilizarea lor în orice alt scop fiind interzisă. Se interzic utilizarea sau distribuirea prezentului document și a conținutului său în orice alt scop, precum și/sau comunicarea, dezvăluirea sau reproducerea acestuia fără acordul prealabil al Illumina. Illumina nu transferă prin prezentul document nicio licență brevetată de Illumina, nicio marcă comercială, niciun drept de autor sau alte drepturi civile și niciun alt drept al vreunui terț.

Este obligatorie respectarea cu strictețe și explicită a instrucțiunilor cuprinse în prezentul document de personal calificat și corespunzător instruit, pentru a asigura utilizarea corespunzătoare și în siguranță a produsului(lor) descrise în acesta. Sunt obligatorii citirea integrală și înțelegerea deplină a conținutului prezentului document înainte de utilizarea produsului(lor) respective.

NECITIREA INTEGRALĂ ȘI NEÎNȚEGEREA DEPLINĂ A TUTUROR INSTRUCȚIUNILOR DIN PREZENTUL DOCUMENT POT DUCE LA DEFECTAREA PRODUSULUI SAU PRODUSELOR, VĂTĂMAREA PERSOANELOR, INCLUSIV A UTILIZATORILOR ȘI A ALTORA, DETERIORAREA ALTOR BUNURI, DUCÂND, TOTODATĂ, LA ANULAREA ORICĂREI GARANȚII APLICABILE PRODUSULUI(LOR).

ILLUMINA ÎȘI DECLINĂ RĂSPUNDEREA PENTRU ORICE EVENIMENT REZULTAT DIN UTILIZAREA INADECVATĂ A PRODUSULUI(LOR) DESCRIS(E) ÎN PREZENTUL DOCUMENT (INCLUSIV A PIESELOR ACESTORA SAU A SOFTWARE-ULUI AFERENT).

© 2023 Illumina, Inc. Toate drepturile rezervate.

Toate mărcile comerciale sunt proprietatea Illumina, Inc. sau a titularilor respectivi. Pentru informații specifice privind mărcile comerciale, consultați www.illumina.com/company/legal.html.

Informații de contact



Illumina, Inc.

5200 Illumina Way

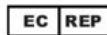
San Diego, California 92122 S.U.A.

+1.800.809.ILMN (4566)

+1.858.202.4566 (în afara Americii de Nord)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com



Illumina Netherlands B. V.
Steenoven 19
5626 DK Eindhoven
Țările de Jos

Sponsor australian

Illumina Australia Pty Ltd

Nursing Association Building

Level 3, 535 Elizabeth Street

Melbourne, VIC 3000

Australia

Etichetarea produsului

Pentru referințe complete privind simbolurile de pe ambalajele și etichetele produselor, consultați legenda simbolurilor pentru setul dvs. la adresa support.illumina.com, fila *Documentation (Documentație)*.

Un rezumat privind siguranța și performanțele (SSP) este disponibil la <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>, după lansarea Bazei de date europene privind dispozitivele medicale (Eudamed). Acesta este asociat cu Basic UDI-DI (00816270020132).