

Листовка

ЗА ИН ВИТРО ДИАГНОСТИЧНА УПОТРЕБА

Предназначение

VeriSeq™ NIPT Solution v2 е *in vitro* диагностичен тест, предназначен за използване като скринингов тест за откриване на пълногеномни фетални генетични аномалии в проби от майчина периферна цяла кръв при бременни жени след 10 гестационна седмица от бременността. VeriSeq NIPT Solution v2 използва пълно геномно секвениране за откриване на частични дупликации и делеции за всички автозоми и състояние на анеуплоидия за всички хромозоми. Тестът предлага възможност да се поиска докладване на анеуплоидия на половите хромозоми (SCA). Този продукт не трябва да се използва като единствена основа за диагностика и управление на други решения, касаещи бременността.

VeriSeq NIPT Solution v2 включва: VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 за VeriSeq NIPT Microlab STAR, VeriSeq NIPT Sample Prep и VeriSeq Onsite Server v2 с VeriSeq NIPT Assay Software v2. VeriSeq NIPT Solution v2 е предназначен за използване със секвенсер от следващо поколение.

Обобщение и обяснение на анализа

Хромозомните аномалии на плода, по-специално анеуплоидията, която представлява анормален брой хромозоми, са честа причина за репродуктивни неуспехи, вродени аномалии, забавяне на развитието и интелектуални затруднения. Анеуплоидията засяга приблизително 1 на 300 живородени деца, като процентът на абортите и мъртвите раждания е много по-висок.^{1,2} Доскоро съществуваха два вида пренатални тестове за тези нарушения: диагностични тестове или скрининг. Диагностичните тестове включват инвазивни процедури, като амниоцентеза или вземане на проби от хорионните вили. Тези методи на изследване се считат за златен стандарт за откриване на анеуплоидия на плода. Въпреки това те са свързани с риск от загуба на бременност между 0,11% и 0,22%.³ Конвенционалните скрининги с множество маркери не носят риск от загуба на бременност, тъй като са неинвазивни, но са по-малко точни от диагностичните тестове. Процентът на откриваемост на тризомия 21 варира между 69 – 96% в зависимост от конкретния скрининг, възрастта на майката и гестационната възраст при изследването.⁴ Важно е да се отбележи, че процентът на фалшиво положителните резултати при тях е около 5%, което може да доведе до инвазивни диагностични тестове за потвърждаване и по този начин до риск от загуба на бременността, свързан с процедурата.⁴ Ултразвуковите скрининги също могат да открият хромозомни аномалии, но това става с още по-малка сигурност от тези други методи.

Анеуплоидията на фетуса по отношение на хромозоми 21, 18, 13, X и Y може да бъде открита с висока степен на точност чрез неинвазивно пренатално тестване (NIPT), като се използва секвениране на целия геном на безклетъчна ДНК (cfDNA), получена от майчина плазма в 10-а гестационна седмица или по-късно. В скорошен метаанализ на множество клинични проучвания се съобщават следните претеглени пулирани проценти на откриваемост и специфичност за тризомия 21 и тризомия 18 при едноплодна

бременност: тризомия 21 99,7% и 99,96% и тризомия 18 съответно 97,9% и 99,96%.⁵ Едно проучване показва, че използването на NIPT като първичен скрининг при всички бременности може да доведе до 89% намаляване на броя на потвърдителните инвазивни процедури.⁶

Като се има предвид значителното намаляване на процента на фалшиво положителните резултати при NIPT в сравнение с конвенционалния скрининг с множество маркери, многобройни професионални медицински организации са издали становища в подкрепа на няколко показания за използване на NIPT.

По-конкретно, Международното дружество за пренатална диагностика, Американският колеж на акушерите и гинеколозите (ACOG)/Сдружението за майчина и фетална медицина (SMFM), Американският колеж по медицинска генетика и геномика (ACMG) и Европейското дружество по човешка генетика/Американското дружество по човешка генетика подкрепят предлагането на NIPT на всички бременни жени.^{7,8,9} Препоръчва се предварително консултиране, информирано съгласие и диагностично изследване за потвърждаване на положителен резултат от скрининга за cfDNA.⁴

VeriSeq NIPT Solution v2 е неинвазивен *in vitro* диагностичен (IVD) тест, който използва секвениране на целия геном на фрагменти от cfDNA, получени от проби от майчина периферна кръв от бременни жени на поне 10 г.с. Тестът предлага две опции за видове скрининг: основен и пълногеномен. Основният скрининг предоставя информация за състоянието на анеуплоидия само на хромозоми 21, 18, 13, X и Y. Пълногеномният скрининг предоставя частични делеции и дупликации за всички автозоми и състояние на анеуплоидия за всички хромозоми. И двата вида скрининг предоставят възможност за отчитане на анеуплоидиите на половите хромозоми (SCA) със или без отчитане на пола на плода. Опцията за отчитане на SCA може да бъде изключена. Ако опцията за отчитане за SCA е изключена, полът на плода също не се отчита. За повече информация относно опциите за отчитане на пола направете справка в *Ръководството за софтуера на VeriSeq NIPT Solution v2 (документ № 1000000067940)*.

Принципи на процедурата

VeriSeq NIPT Solution v2 е автоматизирано решение за лабораторно NIPT изследване, което се състои от автоматизирана подготовка на пробата и анализ на данните от секвенирането. VeriSeq NIPT Sample Prep са специализирани реактиви за еднократна употреба, които се използват заедно с VeriSeq NIPT MicroLab STAR за подготовка на партиди от 24, 48 или 96 проби за секвениране от следващо поколение. Данните от секвенирането на целия геном сдвоени краища се анализират със специализиран софтуер – VeriSeq NIPT Assay Software v2, и се генерира отчет, който предоставя качествени резултати.

Работният процес се състои от следните процедури: събиране на проби, изолиране на плазма, екстракция на cfDNA, подготовка на библиотеки, количествено определяне на библиотеки, пулиране на библиотеки, секвениране и анализ, които са описани по-подробно:

- **Вземане на проба** – 7 – 10 ml цяла периферна кръв на майката се събират в епруветка за събиране на ДНК на Streck (BCT), която предотвратява клетъчния лизис и геномното замърсяване и стабилизира цялата кръв.

- **Изолиране на плазма** – в рамките на 5 дни след вземането на кръв плазмата се изолира от цялата периферна кръв на майката, като се използват стандартни техники за центрофугиране. VeriSeq NIPT Microlab STAR аспирира и разпределя плазмата в 96-ямкова плака с дълбоки ямки за последваща обработка. В случай че е необходимо повторно тестване, пробите след обработката могат да бъдат повторно затворени и съхранявани при 4°C за още 5 дни (общо до 10 дни след вземането на кръвта).

**ВНИМАНИЕ**

Превишаването на гореспоменатите срокове за съхранение може да окаже отрицателно въздействие върху процента на неизправност на отделните проби.

- **Екстракция на cfDNA** – пречистването на cfDNA от плазмата се постига чрез адсорбция върху свързваща плака, промиване на свързващата плака за отстраняване на замърсителите и елуиране.
- **Подготовка на библиотека** – пречистените фрагменти на cfDNA се подлагат на процес на крайно възстановяване, за да се превърнат 5' и 3' надвесите в тъпи краища. След това към 3' края се добавя дезоксиаденозинов нуклеотид, за да се създаде еднобазов надвес. След това върху обработените фрагменти на cfDNA се лигират индексирани адаптери, съдържащи еднобазов 3' дезокситимидинов надвес. Лигираната ДНК се пречиства с помощта на топчета за обратна имобилизация на твърда фаза. Всяка проба в комплект от 24, 48 или 96 проби получава уникален индексирани адаптер. Адаптерите служат за 2 цели:

**ВНИМАНИЕ**

Внимавайте много, за да избегнете кръстосано замърсяване на индексите, което може да доведе до неправилни резултати.

- Индексите позволяват идентифициране на пробата при последващо секвениране.
- Индексните адаптери съдържат последователности, които позволяват улавянето на библиотеката върху твърдата повърхност на секвениращата поточна клетка за генериране на клъстери и последващо секвениране.
- **Количествена оценка** – библиотечният продукт се определя количествено с помощта на флуоресцентно багрило, като концентрацията се определя чрез сравнение със стандартна крива на ДНК.
- **Пулиране на библиотеки и секвениране** – библиотеките с проби се пулират заедно в пулове от 24 или 48 проби в адаптирани количества, за да се сведат до минимум разликите в покритието. След това всеки пул се секвенира с помощта на система за секвениране от следващо поколение.
- VeriSeq NIPT Solution v2 не включва оборудване и консумативи за секвениране.
- **Анализ** – за всяка проба анализът се състои от следното:
 - Идентифициране на библиотечни фрагменти по индексна последователност и подравняване на чифтовете от сдвоени краища с човешки референтен геном.

- Оценка на феталната фракция на библиотеката чрез комбиниране на информация от разпределението както на дължините, така и на геномните координати на библиотечните фрагменти.
- След отчитане на известни отклонения статистическият модел открива региони на генома, които са под или са свръхпредставени в библиотеката по начин, съобразен с аномалия при очакваното ниво на фетална фракция.
- Докладът NIPT предоставя обобщени резултати за избраното тестово меню, където е ОТКРИТА АНОМАЛИЯ или НЕ Е ОТКРИТА АНОМАЛИЯ, заедно с оценка на феталната фракция за проби, преминаващи качествен контрол.
- Допълнителният доклад предоставя количествени показатели, които характеризират всяка открита аномалия.

Ограничения на процедурата

Ограничения на анализа

- Доказателствата, подкрепящи чувствителността и специфичността на теста, обхващат едноплодна и двуплодна бременност. Тези инструкции за употреба не предоставят данни за чувствителност или специфичност за триплодни бременности или бременности от по-висок ред.
- VeriSeq NIPT Solution v2 не е предназначен за откриване на полиплоидия, например триплоидия.
- VeriSeq NIPT Solution v2 не е предназначен за откриване на балансирани хромозомни пренареждания.
- Анализът изисква проби от майчина периферна кръв от бременни жени на поне 10 гестационни седмици.
- При основните скрининги тестът VeriSeq NIPT Solution v2 търси специфични хромозомни аномалии. Резултатите, отчетени като NO ANOMALY DETECTED (Не е открита аномалия), не изключват възможността за хромозомни аномалии на изследваните хромозоми. Отрицателният резултат не изключва възможността бременността да има други хромозомни аномалии, генетични състояния или вродени дефекти (напр. открит дефект на невралната тръба).
- При пълногеномните скрининги големите делеции и дупликации, които са по-малко от 75% от размера на хромозома, могат да бъдат показателни за анеуплоидия на цялата хромозома.
- При пълногеномните скрининги определени региони се изключват от анализа. Списък на такива региони е достъпен на уеб сайта за поддръжка на Illumina. Откриването на геномни аномалии се извършва само в неизключените региони.
- Доклад за пола на плода не е наличен във всички региони поради местните разпоредби, регулиращи съобщаването на пола.

- На базата на данните от литературата резултатите за скрининг за безклетъчна ДНК могат да бъдат объркани от определени майчини и фетални фактори. Някои от тях са изброени по-долу, но не се ограничават до следните:
 - Скорошно преливане на кръв на майката
 - Предходно трансплантиране на орган на майката/трансплантиране на стволови клетки
 - Автоимунно заболяване на майката
 - Неоплазми при майката (доброкачествени и злокачествени)
 - Мозаицизъм при майката
 - Вариации в броя копия при майката
 - Фетоплацентарен мозаицизъм/ограничен плацентен мозаицизъм
 - Смърт на фетуса/изчезващ близък

Отчитане на VeriSeq NIPT Solution v2

- VeriSeq NIPT Solution v2 е скринингов тест и не бива да се разглежда изолирано от други клинични находки и резултати от тестове. Заключениета за състоянието на плода и решенията за управление на бременността не трябва да се основават само на резултатите от NIPT скрининга.⁷
- VeriSeq NIPT Solution v2 отчита следното:
 - Основни скринингови тестове за свръхпредставяне на хромозоми 13, 18 и 21.
 - Пълногеномният скрининг тества недостатъчно и свръхпредставяне на всички автозоми, включително частични делеции и дупликации с размер най-малко 7 Mb.
 - При едноплодна бременност, при която като опция за отчитане на пола е избрано Yes (Да) или SCA, следните полови хромозомни аномалии: XO, XXX, XXY и XYY.
 - При едноплодна бременност с избрана опция за съобщаване на пола Yes (Да) се съобщава полът на плода.
 - Наличие на Y хромозома при двуплодна бременност.

Компоненти на продукта

VeriSeq NIPT Solution v2 (част № 20030577) се състои от следните комплекти за подготовка на проби:

- VeriSeq NIPT Sample Prep (24 проби) (част № 20025895)
- VeriSeq NIPT Sample Prep(48 проби) (част № 15066801)
- VeriSeq NIPT Sample Prep (96 проби) (част № 15066802)

VeriSeq NIPT Solution v2 (част № 20030577) се състои от следните софтуерни компоненти:

- VeriSeq NIPT Assay Software v2 (част № 20047024), предварително инсталиран на VeriSeq Onsite Server v2

- VeriSeq Onsite Server v2 (част № 20028403 или 20047000) или наличен VeriSeq Onsite Server (част № 15076164 или № 20016240), надстроен до v2
- VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 (част № 20044988), предварително инсталиран на VeriSeq NIPT Microlab STAR
 - VeriSeq NIPT Microlab STAR (част № Hamilton Company Reno: 95475-01 (115 V) и 95475-02 (230 V), Hamilton Company Bonaduz: 806288)
- Модул Local Run Manager VeriSeq NIPT (част № 20044989)

Реагенти

Предоставени реагенти

Illumina предоставя следните реагенти: VeriSeq NIPT Sample Prep (24 проби) (част № 20025895), VeriSeq NIPT Sample Prep (48 проби) (част № 15066801) и VeriSeq NIPT Sample Prep (96 проби) (част № 15066802). VeriSeq NIPT Sample Prep са конфигурирани за използване с VeriSeq NIPT Microlab STAR (ML STAR) (част № 95475-01, 95475-02 или 806288), които се предоставят от компанията Hamilton.

VeriSeq NIPT, кутия за екстракция, подготовка на проби

Таблица 1 VeriSeq NIPT, кутия за екстракция (24) и (48), част № 20025869 и 15066803

Име на реагента върху етикета	Брой контейнери в комплекта	Активни съставки	Съхранение
Буфер за лизис	1	Гуанидинов хидрохлорид в буфериран воден разтвор	15°C до 30°C
Промивен буфер I	1	Гуанидинов хидрохлорид и 2-пропанол в буфериран воден разтвор	15°C до 30°C
Промивен буфер II	1	Буфериран воден разтвор, съдържащ соли	15°C до 30°C
Буфер за елуиране	1	Буфериран воден разтвор	15°C до 30°C
Протеиназен буфер	1	Глицерол в буфериран воден разтвор	15°C до 30°C
Протеиназа К	3	Лиофилизирана протеиназа К	15°C до 30°C

Таблица 2 VeriSeq NIPT, кутия за екстракция (96), част № 15066807

Име на реагента върху етикета	Брой контейнери в комплекта	Активни съставки	Съхранение
Буфер за лизис	1	Гуанидинов хидрохлорид в буфериран воден разтвор	15°C до 30°C
Промивен буфер I	1	Гуанидинов хидрохлорид и 2-пропанол в буфериран воден разтвор	15°C до 30°C
Промивен буфер II	2	Буфериран воден разтвор, съдържащ соли	15°C до 30°C
Буфер за елуиране	1	Буфериран воден разтвор	15°C до 30°C
Протеиназен буфер	1	Глицерол в буфериран воден разтвор	15°C до 30°C
Протеиназа К	4	Лиофилизирана протеиназа К	15°C до 30°C

VeriSeq NIPT – кутия за подготовка на библиотеки, подготовка на проби

Таблица 3 Кутия за подготовка на библиотеки VeriSeq NIPT (24) и (48), част № 20026030 и 15066809

Име на реагента върху етикета	Брой контейнери в комплекта	Активни съставки	Съхранение
Смес за крайно възстановяване	1	ДНК полимераза и dNTPs в буфериран воден разтвор	-25°C до -15°C
Смес от А-връзки	1	ДНК полимераза и dATP в буфериран воден разтвор	-25°C до -15°C
Лигираща смес	1	ДНК лигаза в буфериран воден разтвор	-25°C до -15°C
Буфер за хибридизация	1	Буфериран воден разтвор	-25°C до -15°C
ДНК адаптерна плака NIPT	1	Олигонуклеотиди в буфериран воден разтвор	-25°C до -15°C

Таблица 4 Кутия за подготовка на библиотеки VeriSeq NIPT (96), част № 15066810

Име на реагента върху етикета	Брой контейнери в комплекта	Активни съставки	Съхранение
Смес за крайно възстановяване	1	ДНК полимераза и dNTPs в буфериран воден разтвор	-25°C до -15°C
Смес от А-връзки	2	ДНК полимераза и dATP в буфериран воден разтвор	-25°C до -15°C
Лигираща смес	2	ДНК лигаза в буфериран воден разтвор	-25°C до -15°C
Буфер за хибридизация	1	Буфериран воден разтвор	-25°C до -15°C
ДНК адаптерна плака NIPT	1	Олигонуклеотиди в буфериран воден разтвор	-25°C до -15°C

VeriSeq NIPT Sample Prep (подготовка на проби), кутия с принадлежности

Таблица 5 VeriSeq NIPT, кутия с принадлежности, част № 15066811

Име на реагента върху етикета	Брой контейнери в комплекта	Активни съставки	Съхранение
Плака за свързване на ДНК	1	Пропиленова микроплака с модифицирана силиконова мембрана	2°C до 8°C
Ресуспензионен буфер	1	Буфериран воден разтвор	2°C до 8°C
Топчета за пречистване на проби	1	Твърдофазни парамагнитни топчета в буфериран воден разтвор	2°C до 8°C
Реагент за количествено определяне на ДНК	1	ДНК интеркалиращо багрило в DMSO (диметилсулфоксид)	2°C до 8°C
Стандарт за количествено определяне на ДНК	1	dsDNA стандартна, неспецифична ДНК и натриев азид в буфериран воден разтвор	2°C до 8°C

VeriSeq NIPT Sample Prep, работни епруветки и етикети

Таблица 6 Работни епруветки и етикети, част № 15071543

Наименование на артикула върху етикета	Брой на елементите в комплекта	Съхранение
Етикет (LBL) – баркод на плаката	9	15°C до 30°C
Етикет (LBL) – баркод на плаката с дълбоки ямки	12	15°C до 30°C
Епруветка (TB) – празна епруветка за пулиране	5	15°C до 30°C

Реагенти, които не са предоставени**Необходими реагенти, които не са предоставени**

- Реагенти за секвениране и консумативи, необходими за системата за секвениране от следващо поколение (NGS)
- Сертифицирана вода без DNase/RNase
- Етанол, 100% (200 proof) за молекулярно-биологичен клас

ЗАБЕЛЕЖКА Етанолът, който не е от клас за молекулярна биология, може да окаже потенциално отрицателно въздействие върху работата на анализа.

Реагенти по избор, не са предоставени

- Фосфатно-буфериран солен разтвор на Dulbecco (DPBS) за контрол без шаблон (NTC)

Съхранение и обработка

1. Стайната температура се определя като температура между 15°C и 30°C.
2. Всички реагенти са само за еднократна употреба. След като реагентите са подготвени за употреба, те трябва да се използват незабавно.
3. Ако някоя от опаковките или съдържанието на компонентите на VeriSeq NIPT Solution са повредени или компрометирани, се свържете с отдела за обслужване на клиенти на Illumina.
4. Реагентите са стабилни, когато се съхраняват, както е посочено, до посочения срок на годност върху етикетите на комплектите. За условията на съхранение вижте колоната „Съхранение“ в таблиците в [Реагенти на страница 6](#). Не използвайте реагенти с изтекъл срок.

5. Промените във физическия вид на предоставените реагенти могат да показват влошаване на качеството на материалите. Ако настъпят промени във физическия вид (напр. очевидни промени в цвета на реагента или помътняване, което е очевидно при микробно замърсяване), не използвайте реагентите.
6. Спазвайте следните най-добри практики при работа с топчета за пречистване на проби:
 - Никога не замразявайте топчетата.
 - Преди употреба оставете топчетата да достигнат стайна температура.
 - Непосредствено преди употреба разбъркайте топчетата, докато се суспендират добре и цветът стане хомогенен.
7. Буферът за лизис, промивният буфер I, промивният буфер II, буферът за елуиране и протеиназният буфер могат да образуват видими утайки или кристали. Преди употреба разбъркайте енергично и след това проверете визуално дали няма утайки.
8. Никога не замразявайте цяла кръв след вземането ѝ.
9. Секвенирайте библиотеките възможно най-скоро след пулиране. Пулираните библиотеки са стабилни до седем дни при -25°C до 15°C. Не е необходима допълнителна денатурация, ако се съхранява за този период от време при тези условия.

Оборудване и материали

Необходимо оборудване и материали, които не са предоставени

Необходимо оборудване, което не е предоставено

Оборудване	Доставчик
<p>Система за секвениране от следващо поколение (NGS) със следните възможности:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 2 x 36 bp секвениране по двойки • Съвместим с двойноиндексните адаптери на VeriSeq NIPT Sample Prep • Автоматично създаване на BCL файлове • Двуканална химия • 400 млн. чифта крайни четения на серия • Съвместимо с VeriSeq NIPT Assay Software v2 или система за секвениране NextSeq 550Dx. 	Доставчик на инструменти или Illumina, част № 20005715

Оборудване	Доставчик
Фризер, от -25°C до -15°C	Общ лабораторен доставчик
Микроцентрифуга	Общ лабораторен доставчик
Помощни пипети	Общ лабораторен доставчик
Хладилник, от 2°C до 8°C	Общ лабораторен доставчик
20 µl едноканални пипети	Общ лабораторен доставчик
200 µl едноканални пипети	Общ лабораторен доставчик
1000 µl едноканални пипети	Общ лабораторен доставчик
Завихрящ миксер	Общ лабораторен доставчик
Центрофуга и ротор за епруветки за вземане на кръв	
<p>Еквивалентно:</p> <ul style="list-style-type: none"> Хладилна центрофуга с капацитет 1600 x g с опция за работа без спиралки Ротор с люлеещи се кофички Вложки за кофички, капацитет 24, 48 или 96 епруветки, 76 mm минимална дълбочина Адаптерни вложки за поставяне на 16 x 100 mm епруветки за вземане на кръв <p>Препоръчано:</p> <ul style="list-style-type: none"> Центрофуга от серия Allegra X12R, 1600 g Центрофуга Allegra GN-3.8 ротор с кофички Капази за кофички на центрофуга Allegra, комплект за две Адаптер за центрофуга Allegra, 16 mm, комплект от четири 	<p>Общ лабораторен доставчик</p> <p>Beckman Coulter, артикул № 392304 (120 V или 230 V)</p> <p>Beckman Coulter, артикул № 369704</p> <p>Beckman Coulter, артикул № 392805</p> <p>Beckman Coulter, артикул № 359150</p>

Центрофуга и ротор за микроплаки

Оборудване	Доставчик
<p>Еквивалентно:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Центрофуга с капацитет 5600 x g • Ротор с въртящи се плочи с 96-ямкови плаки, минимална дълбочина 76,5 mm • Multifuge X4 Pro-MD 120V TX-1000BT • Центрофуга Sorvall Legend XTR <ul style="list-style-type: none"> • Ротор за микроплаки HIGHPlate 6000 • Висока плака на ротор 6000 <p>Опорна основа за микроплаки</p> <ul style="list-style-type: none"> • Препоръчано: <ul style="list-style-type: none"> • Опорна основа за MicroAmp 96-ямкова • 96-ямков носач на PCR плаки 	<p>Общ лабораторен доставчик</p> <p>Thermo Scientific VWR, каталожен номер 76326-254 Thermo Fisher Scientific, каталожен № 75004521 (120 V) или каталожен № 75004520 (230 V)</p> <p>Thermo Fisher Scientific, каталожен № 75003606 Thermo Scientific VWR, каталожен номер 97040-244</p> <p>Thermo Fisher Scientific, каталожен № 4379590 Thermo Fisher Scientific, каталожен № AB-0563/1000</p>
<p>Един от следните четци за микроплаки или еквивалент (флуорометър) със SoftMax Pro v6.2.2 или по-нова версия:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gemini XPS • SpectraMax M2, M3, M4 и M5. <ul style="list-style-type: none"> • Лилавата вложка е включена с четец за микроплаки за използване в работния процес. 	<p>Molecular Devices, част № XPS Molecular Devices, част № M2, M3, M4 и M5</p>
<p>SpectraMax високоскоростно USB, сериен адаптер</p>	<p>Molecular Devices, част № 9000-0938</p>
<p>Термоциклер със следните спецификации:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Затоплящ се капак • температурен диапазон от 4°C до 98°C • ±2°C температурна точност • 2°C в секунда минимална скорост на нарастване • Съвместим с Twin.tec PCR плака 96-ямкова, с цяла пола 	<p>Общ лабораторен доставчик</p>
<p>VeriSeq NIPT Microlab STAR</p>	<p>Hamilton, част № 95475-01 (115 V), част № 95475-02 (230 V), или част № 806288 (за Hamilton Company Bonaduz)</p>
<p>VeriSeq Onsite Server v2 или ъпгрейдван VeriSeq Onsite Server</p>	<p>Illumina, част № 20028403 или 20047000 (v2), или №15076164, или № 20016240 (надстроена)</p>

Оборудване	Доставчик
Ако използвате система за секвениране NextSeq 550Dx: <ul style="list-style-type: none"> NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 цикъла) 	Illumina, част № 20028870

Незадължително оборудване, което не е доставено

Оборудване	Доставчик
Pluggo Decapper System	LGP Consulting, част № 4600 4450
SpectraMax SpectraTest FL1 флуоресцентна валидираща плака	Molecular Devices, част № 0200-5060
Револвер/ротатор за епруветки, 15 ml, 40 об/мин, 100-240V	Thermo Scientific, каталожен № 88881001 (САЩ) или каталожен № 88881002 (ЕС)

Необходими материали, не се предоставят

Консуматив	Доставчик
1000 µl проводими нестерилни филтърни накрайници	Hamilton, част № 235905
300 µl проводими нестерилни филтърни накрайници	Hamilton, част № 235903
50 µl проводими нестерилни филтърни накрайници	Hamilton, част № 235948
Резервоар с дълбоки ямки със следните спецификации: <ul style="list-style-type: none"> Микроплака SLAS 1-2004 с 96 ямки с конично или пирамидално дъно и минимална вместимост 240 ml. Полипропилен с предпочитание за ниско свързване на ДНК за всички контактни повърхности на пробата. Вътрешните размери (ниво на течността) са съвместими с автоматизираните стъпки на аспириране и дозиране на VeriSeq NIPT Microlab STAR. Размерите на височината са съвместими с автоматизираните движения на VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	Общ лабораторен доставчик Съвместими резервоари: <ul style="list-style-type: none"> Corning Axygen, продукт № RES-SW96-HP-SI Agilent, продукт № 201246-100

Консуматив	Доставчик
<p>Ваничка за реагенти със следните спецификации:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ваничка, която се поставя стабилно, но не принудително в носача на VeriSeq NIPT Microlab STAR, с конусовидно дъно и минимален капацитет 20 ml. • Полипропилен, който не съдържа RNase-/DNase. • Вътрешните размери (ниво на течността) на резервоара генерират нива на течност чрез обеми с реагент за анализ, които са съвместими с автоматизираните стъпки на аспириране и дозиране на VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Размерите на височината са съвместими с автоматизираните движения на VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	<p>Общ лабораторен доставчик</p> <p>Съвместими ванички:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Roche, продукт № 03004058001
<p>Плаки с дълбоки ямки със следните спецификации:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Микроплаки SLAS 1-2004, 3-2004, и 4-2004 с 96 ямки с конично или пирамидално дъно и минимална вместимост на ямката 2 ml. • Прозрачен полипропилен с предпочитание за материал с ниско свързване на ДНК за всички контактни повърхности на пробата. • Размерите на ямките за генериране на ниво на течността са съвместими с автоматизираните стъпки на аспириране и дозиране на VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Закриване на плаки, което позволява поставяне на баркодове на плаки, за да изисква позициониране с добра адхезия към плоска повърхност. • Рамката, устойчива на въртене, позволява издържане на минимум 5600 x g. • Височината на плаките е съвместима с автоматичните движения на VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	<p>Общ лабораторен доставчик</p> <p>Съвместими плаки:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, част № 0030505301 • Eppendorf, част № 30502302 • USA Scientific, част № 1896-2000

Консуматив	Доставчик
<p>384-ямкова плака със следните спецификации:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 384-ямкова микроплака, оптимизирана за ниски обеми, с минимална вместимост на ямката 50 µl. • Черен непрозрачен полистирен с блокиране на светлината и ниско ниво на свързване на ДНК за всички контактни повърхности на пробата. • Размерите на ямките за генериране на ниво на течността са съвместими с автоматизираните стъпки на аспириране и дозиране на VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Височината на плаките е съвместима с автоматизираните движения на VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Закриване на плаки, което позволява поставяне на баркодове на плаки, за да изисква позициониране с добра адхезия към плоска повърхност. 	<p>Общ лабораторен доставчик</p> <p>Съвместими плаки:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Corning, продукт № 3820
<p>96-ямкова плака със следните спецификации:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Микроплака с устойчива на усукване рамка, издържаща 5600 x g, и 96 прозрачни ямки с конусовидно дъно, повдигнати ръбове и минимална вместимост на ямката 150 µl. • Полипропилен, който не съдържа RNase/DNase и има ниско ниво на свързване на ДНК за всички контактни повърхности на пробата. • Размерите на ямките за генериране на ниво на течността са съвместими с автоматизираните стъпки на аспириране и дозиране на VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Височината на плаките е съвместима с автоматизираните движения на VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Закриване на плаки, което позволява поставяне на баркодове на плаки, за да изисква позициониране с добра адхезия към плоска повърхност. • Съвместимо с термоциклери за денатуриране. 	<p>Общ лабораторен доставчик</p> <p>Съвместими плаки:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, част № 0030129512 • Eppendorf, част № 30129580 • Eppendorf, част № 30129598 • Eppendorf, част № 30129660 • Eppendorf, част № 30129679 • Bio-Rad, част № HSP9601
<p>Едно от следните запечатвания:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Фолио Microseal 'F' • Запечатвания с фолио 	<p>Bio-Rad, каталожен номер MSF1001 Beckman Coulter, позиция № 538619</p>

Консуматив	Доставчик
cfDNA BCT CE	Streck, каталожен номер 218997
Капачки с притискане	Sarstedt, заявка № 65.802
Епруветки 2 ml с капачки на винт	Общ лабораторен доставчик
Филтърни крайници от 20 µl за пипетор от 20 µl	Общ лабораторен доставчик
Филтърни крайници от 200 µl за пипетор от 200 µl	Общ лабораторен доставчик
Филтърни крайници от 1000 µl за пипетор от 1000 µl	Общ лабораторен доставчик
Еквивалентно:	Общ лабораторен доставчик
<ul style="list-style-type: none"> • Спрей за бърза дезинфекция на алкохолна основа • Разтвор на дезинфекциращ препарат 	
Препоръчано:	
<ul style="list-style-type: none"> • Дейонизирана вода и 70% етанол 	

Незадължителни материали, не се предоставят

Консуматив	Доставчик
Фосфатно-буфериран солен разтвор на Дюлбеко (DPBS) за контрол без шаблон (NTC)	Общ лабораторен доставчик
Епруветка с винтова капачка, 10 ml (само за контролни проби)	Sarstedt, заявка № 60.551
Епруветка, капачка с винт, 50 ml	Общ лабораторен доставчик
Серологични пипети от 25 ml	Общ лабораторен доставчик
Серологични пипети от 10 ml	Общ лабораторен доставчик

Събиране, транспортиране и съхранение на спесимени



ВНИМАНИЕ

Работете с всички спесимени така, сякаш са потенциално инфекциозни агенти.

- Спесимени на цяла кръв от 7 – 10 ml трябва да се събират в Streck Cell-Free DNA BCT.
- Транспортирането на цяла кръв трябва да отговаря на всички приложими разпоредби за транспортиране на етиологични агенти. Препоръчват се методи за ускорена доставка/транспорт.

- По време на транспортиране съхранявайте при температура между 4°C и 30°C. След получаване на пробите съхранявайте при температура от 2°C до 8°C до готовност за работа. Времето между вземането на кръв и първоначалното изолиране на плазмата не трябва да надвишава 5 дни.
- В случай че е необходимо повторно тестване, пробите след обработката могат да бъдат повторно затворени и съхранявани при 4°C за още 5 дни (общо до 10 дни след вземането на кръвта).

**ВНИМАНИЕ**

Превишаването на гореспоменатите срокове за съхранение може да окаже отрицателно въздействие върху процента на неизправност на отделните проби.

Предупреждения и предпазни мерки

- Този анализ съдържа протеиназа К. Телесни наранявания могат да настъпят при вдишване, поглъщане, контакт с кожата и очите. Използвайте на добре проветриво място, носете защитно облекло, избягвайте вдишването на прах и изхвърляйте всички контейнери и неизползваното съдържание в съответствие с приложимите държавни стандарти за безопасност.
- Този анализ съдържа гуанидин хлорид. Може да възникнат телесни наранявания при вдишване, поглъщане, контакт с кожата и контакт с очите. Използвайте на добре проветриво място, носете защитно облекло и изхвърляйте всички контейнери и неизползваното съдържание в съответствие с приложимите местни държавни стандарти за безопасност.
- Този анализ съдържа 2-пропанол – запалим химикал. Да се пази от топлина и открит огън. Може да възникнат телесни наранявания при вдишване, поглъщане, контакт с кожата и контакт с очите. Използвайте на добре проветриво място, носете защитно облекло и изхвърляйте всички контейнери и неизползваното съдържание в съответствие с приложимите местни държавни стандарти за безопасност.
- Този анализ съдържа диметилсулфоксид – корозивна и запалима течност. Може да възникнат телесни наранявания при вдишване, поглъщане, контакт с кожата и контакт с очите. Използвайте на добре проветриво място, носете защитно облекло и изхвърляйте всички контейнери и неизползваното съдържание в съответствие с приложимите местни държавни стандарти за безопасност.
- За да се предотврати образуването на вредни газове, не изхвърляйте отпадъците от екстракцията на cfDNA (съдържат гуанидин хидрохлорид) с отпадъци, съдържащи белина (натриев хипохлорит).
- Работете с всички проби така, сякаш съдържат потенциално инфекциозни агенти.
- Използвайте обичайните лабораторни предпазни мерки. Не пипетирайте с уста. Не яжте, не пийте и не пушете в определените работни зони. Носете ръкавици за еднократна употреба и лабораторни престилки при работа с проби и реагенти за анализ. Измийте внимателно ръцете си след работа с проби и реагенти за анализ.

- Не използвайте никакви компоненти за анализ след изтичане на срока им на годност, посочен на етикета на кутията за анализ. Не разменяйте компоненти за анализ от различни партии за анализ. Партидите на анализа са посочени върху етикета на кутията на анализа. Съхранявайте компонентите на анализа при определената температура.
- За да се предотврати разграждането на пробата или реагента, се уверете, че всички изпарения от почистването с натриев хипохлорит са се разсеяли напълно, преди да започнете протокола.
- Неспазването на описаните процедури може да доведе до грешни резултати или до значително влошаване на качеството на пробата.
- Незабавно докладвайте за всички сериозни инциденти, свързани с този продукт, на Illumina и на компетентните органи на държавите членки, в които са се установили потребителят и пациентът.
- За информация относно околната среда, здравето и безопасността вижте информационните листове за безопасност (ИЛБ) на адрес support.illumina.com/sds.html.

Процедурни бележки

Избягване на замърсяване

- Използвайте нови крайници и нови лабораторни консумативи.
- Използвайте устойчиви на аерозоли крайници за намаляване риска от пренасяне и кръстосано замърсяване между пробите.
- Използвайте устойчиви на аерозоли крайници, за да намалите риска от пренасяне и кръстосано замърсяване между пробите. Не разплисквайте съдържанието. Центрофугирайте след всеки етап на завихряне.
- Спазвайте приложимите регламенти за правилна лабораторна практика и хигиена при работа с кръв и кръвни производни.
- Не използвайте аерозолни спрейове за избелване при подготовка на библиотеката. Следи от замърсяване с белина могат да доведат до неуспешен анализ.
- При отваряне на плаки поставяйте внимателно плаките на равна, плоска повърхност, като държите плаката здраво. Внимателно премахнете уплътнението, като се уверите, че уплътнението няма контакт с откритите ямки. Не докосвайте и не променяйте съдържанието на откритите ямки. Кръстосано замърсяване между ямките може да доведе до неправилни резултати.

Почистване на плочата на VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Инспектирайте чистотата на плочата преди употреба. Поне веднъж седмично извършвайте ежеседмична поддръжка и следвайте следните инструкции за почистване.

- Извадете всички незареждащи се носители, почистете ги със спрей за бърза дезинфекция на алкохолна основа дейонизирана вода и 70% етанол и ги оставете да изсъхнат. Ако са силно замърсени, след това ги накиснете в разтвор на дезинфекциращ препарат, изплакнете с дезинфектант на алкохолна основа и ги оставете да изсъхнат.
- Отворете предния капак и изтрийте плочата с кърпа, напоена с дейонизирана вода и 70% етанол. По-специално трябва да проверите чистотата на плъзгащите се блокове.
- Свалете колектора на базовата вакуумна система (BVS) и почистете колектора, уплътнението и вътрешните отделения на BVS с кърпа. Избягвайте да почиствате уплътнението с етанол, тъй като това може да доведе до крехкост на материала.
- Почистете отпадъците от крайници за главата CORE 96 и независимия канал.
- Свалете плочата за изхвърляне на крайници с независим канал на станцията за отпадъци и я почистете: пръснете дейонизирана вода и 70% етанол директно върху повърхността и избършете. Издърпайте нова найлонова торбичка върху рамката и я закрепете отново. Поставете плочата за изваждане на чисти крайници обратно на мястото ѝ.
- Пръснете дейонизирана вода и 70% етанол директно върху повърхността на кутията за отпадъци и улея за глави CORE 96 и избършете.
 - Ако е трудно да се отстранят натрупванията от отпадъците на крайниците, избършете с кърпа, намокрена с вода без DNase/RNase, докато се отстранят натрупванията. Изхвърлете кърпата по подходящ начин. Продължете да стерилизирате с дезинфектант на алкохолна основа.
- Намокрете кърпа без власинки или памучен тампон със 70% етанол. Почистете прозорчето на лазерния скенер на баркод четеца. Със същата кърпа или тампон почистете всяка ямка на адаптера за плаки CPAC. Ако използвате кърпа, натиснете кърпата във всяка ямка на адаптера с обратната страна на химикалката, за да се уверите, че вътрешността на ямката е добре почистена.
- Почистете независимите канали:
 - При независимите канали почистете ръкава за изхвърляне на крайници (външната част на каналите за пипетиране) с кърпа без власинки, напоена с дейонизирана вода и 70% етанол. (Вижте *справочното ръководство за Hamilton Microlab STAR № 15070074.*)
 - Почистете спирателния диск и O-пръстените на главата за пипетиране (външната част на каналите за пипетиране) с кърпа без власинки, напоена с дейонизирана вода и 70% етанол.
- Почистете главата CORE 96:
 - С помощта на същата кърпа без власинки, напоена с дейонизирана вода и 70% етанол, почистете корпуса на главата 96 и долната част на спирателните дискове.
 - Като използвате същата кърпа или откъсната от нея лента, напоена с дейонизирана вода и 70% етанол, прокарайте кърпата по страните на пипетните канали на главата 96, за да почистите O-пръстените. Повторете тази процедура за всеки пипетиран канал на главата 96.
- Напръскайте предния и страничния капак с дейонизирана вода и 70% етанол и избършете до подсушаване.

- Почистете защитната лента Autoload с кърпа, напоена с дейонизирана вода и 70% етанол, и избършете, без да упражнявате натиск.
- Когато плочата и компонентите са напълно сухи, поставете носачите на мястото им.

ЗАБЕЛЕЖКА Неправилното почистване и поддръжка на ML STAR може да доведе до кръстосано замърсяване и незадоволително изпълнение на анализа.

Качествен контрол

Контролен материал с известни експлоатационни характеристики може да бъде оценен, за да се открият разлики в обработката и техническите процедури в лабораторията.

Извършването на контролна проба или без контролен шаблон намалява общия брой на неизвестните майчини проби, които могат да бъдат обработени с всеки комплект за подготовка на проби.

Не превишавайте две NTC проби на партида от 24 или 48 проби или четири NTC проби на партида от 96 проби.

Инструкции за употреба

Съвети и техники

Освен ако в протокола не бъде посочена безопасна точка на спиране, продължете незабавно със следващата стъпка.

Плаки за поставяне на баркод

- Баркодовете за плаки с цял борд започват с PL.
- Баркодовете за плаки с дълбоки ямки започват с DW.
- Нанесете баркодовете върху плаките с цял борд и върху плаките с дълбоки ямки от страната до колона 12.
- Зареждайте плаките с баркод, обърнат надясно, за да се даде възможност за автоматизирано сканиране.

Запечатване и разпечатване на плаката

- Внимавайте много, за да избегнете кръстосано замърсяване – не трябва да има видима течност отдолу на уплътнението.
 - Уверете се, че откритата долна страна на уплътнението няма контакт с откритите ямки.
 - Не докосвайте откритите ямки.
- Винаги запечатвайте 96-ямковата плака преди следващите стъпки в протокола:
 - Стъпки на центрофугата.

- Стъпки на термоциклера.
- За да запечатате плаката, поставете запечатващото фолио върху плаката и след това запечатайте. Уверете се, че по цялата плака се прилага налягане, и че уплътнението е плътно във всяка индивидуална ямка.
- Преди разпечатване на плаката направете следното:
 - Центрофугирайте за кратко 96-ямковата плака при 1000 × g за 20 секунди.
 - Поставете плаката върху равна повърхност, след което бавно отстранете уплътнението.

VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Преди употреба извършете и документируйте необходимата поддръжка в съответствие с инструкциите на производителя.
- Наблюдавайте ML STAR по време на автоматизираните стъпки. Наблюдавайте интерфейса на софтуера VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 за подкани и инструкции за оператора.
- По време на работа дръжте предния капак на мястото му.
- По време на работа поддържайте плочата свободна от всички предмети.
- Ако се предостави бутон за опция **Exclude** (Изключване) по време на събитие за обработка на грешка, не избирайте тази опция при никакви обстоятелства. Ако методът не може да продължи след събитието за обработка на грешка и имате ограничени опции за обработка на грешка, прекратете изпълняването.
- По време на етапите на вакуумиране на плаката, ако това се изисква от VeriSeq NIPT Workflow Manager v2, ръчно помогнете за формиране на уплътнението между плаката и вакуумния колектор.
- Позволете на системата автоматично да изхвърля крайниците от адаптера. Не премахвайте ръчно крайниците, освен ако софтуерът не ви подкани да сторите това.
- Отстранете изразходваните реагенти и използваните консумативи, както е указано от мениджъра на работния процес (Workflow Manager).
- Ежедневно изпразвайте вакуумните бутилки за отпадъци. Първата бутилка не трябва да се пълни повече от ½. Преливането на вакуумни отпадъци може да повреди вакуумната помпа и да намали прилагания вакуум в системата.
- За партии с 24, 48 и 96 проби заредете първия стелаж с индивидуално изброени 8-канални крайници преди стартиране на метода.

Обработка на проби

Процедура

1. Изпълнете следните стъпки за всяка аликвотна част:
 - a. Центрофугирайте обозначените с баркод проби при 1600 × g за 10 минути при 4°C с изключена спирачка.

b. Когато центрофугата напълно спре, извадете епруветките с пробите.

След центрофугиране започнете изолирането на плазмата в рамките на 15 минути. Ако изминат повече от 15 минути, центрофугирайте отново.

2. Прегледайте всяка епруветка за пригодност на пробата, като потвърдите следните изисквания:
 - Обемът на пробата е според очакванията.
 - Ясно се вижда разделянето между слоевете с червени кръвни клетки и плазма на пробите след центрофугиране.
 - Нивото на плазмата е поне 1,5 ml над буферираната обвивка.
 - Пробата не е силно хемолизирана (т. е. плазмата не е тъмночервена на вид).
 - Пробата не е липемична (напр. плазмата не е мътнобяла или млечнонепрозрачна на вид).
 - Пробата не се съсирва.



ВНИМАНИЕ

Пробите, които са били неправилно съхранявани или обработвани, могат да станат негодни. Ако през работния процес се обработват неподходящи проби, те могат да запушат свързващата плака по време на екстракцията, което води до преливане на пробата в съседните ямки.

3. Отстранете капачките на епруветките и ги поставете в контейнерите за епруветки. Заредете всички проби и всички плазмени контроли за партидата.



ВНИМАНИЕ

По време на събитие за обработка на грешка, ако получите възможност Exclude (Изключване), не я избирайте. Ако методът не може да продължи след събитието за обработка на грешка и имате ограничени опции за обработка на грешка, прекратете изпълняването.

Изолиране на плазма

Подготовка

1. Етикетирайте 1 нова дълбокоямкова плака междинна плазма и нанесете баркода.
2. Етикетирайте 1 нова дълбокоямкова плака крайна плазма и нанесете баркода.
3. За партиди с 24, 48 и 96 проби, заредете първия стелаж с индивидуално изброени 8-канални крайници преди стартиране на метода.



ВНИМАНИЕ

Уверете се, че използвате правилния тип плака за междинната плазма и крайната плазма. Използването на резервоар с дълбоки ямки вместо плака с дълбоки ямки води до обединяване на пробите и може да доведе до неправилни резултати.

Процедура

1. Отворете AppLauncher и след това изберете **VeriSeq NIPT Method**.
2. Въведете уникален идентификатор на партидата и потребителското име, след което изберете **OK**. ИД на партида може да съдържа ≤ 26 знака. Можете да използвате само цифри, букви, долни черти () или тирета (-). Например: 2025-10-16_Batch3.
ИД на партида не разпознава главни и малки букви. ИД на партиди, които разпознават малки и големи букви, не се смятат за уникални.
Имената на партиди трябва да са уникални и да не се различават само по главни и малки букви. Например имена на партиди Batch01 и batch01 не са уникални. Това правило се отнася и за именуването на ИД на проба.
3. Изберете **New Batch** (Нова партида).
4. След стартирането, изберете **OK**, за да започнете изолиране на плазмата.
5. Изпълнете една от следните стъпки:
 - За да заредите съществуващ лист с проби, изберете бланка за проби, свързан с партидата, и след това изберете **OK**.
 - За да продължите, без да избирате съществуваща бланка за проби, изберете **No Sample Sheet** (Няма бланка за проба).

За информация относно създаването на бланка за проби вижте Ръководството за *VeriSeq NIPT Solution v2 Software* (документ № 1000000067940).

ЗАБЕЛЕЖКА Типът проба – едноплодна или двуплодна, трябва да бъде точно записан за всяка проба, за да се осигури правилен анализ на данните. Ако изберете **No Sample Sheet** (Няма бланка за проба), се уверете, че сте задали примерни стойности по подразбиране в инструментите за обслужване на мениджъра на работния процес (Workflow Manager). Направете справка в *Ръководството за VeriSeq NIPT Solution v2 Software* (документ № 1000000067940) за повече информация.

6. Изберете размера на партидата, след което изберете **OK**.
7. Изберете броя на контролите без шаблон (NTC), след което изберете **OK**.
NTC слотовете винаги се избират последни. Например с два NTC в 24 проби, позиции 23 и 24 са NTC.
8. Потвърдете, че всички баркодове са поставени, след което заредете пробите, крайниците и плаките в носача (баркодът да сочи надясно).

9. Изберете **ОК** след всеки ред зареждане.

Размер на партидата на пробата	Носач Тип	Проследяване	Артикул	Позиция на мястото
24, 48, 96	Накрайник	7 – 12	Накрайници 1000 µl	5
			Накрайници 1000 µl (само 96 партиди)	4, 5
	Епруветка	15	Подготвени епруветки за кръвни проби 1 – 24 (за всички размери на партидите)	1 – 24
	Епруветка	16	Подготвени епруветки за кръвни проби 25 – 48 (само за размери на партидите от 48 и 96)	25 – 48
	Епруветка	17	Подготвени епруветки за кръвни проби 49 – 72 (само за размери на партидите от 96)	49 – 72
	Епруветка	18	Подготвени епруветки за кръвни проби 73 – 96 (само за размери на партидите от 96)	73 – 96
	Multiflex	19 – 24	Празна плака с дълбоки ямки, крайна плазма – с баркод	4
	Multiflex	19 – 24	Празна плака с дълбоки ямки, междинна плазма – с баркод	5
	Реагент	47	(Незадължително) Фосфатно-буфериран солен разтвор на Дюлбеко (DPBS) – използван за контроли без шаблон (NTC)	5

- Уверете се, че носачите, лабораторните инструменти и реагентите са заредени правилно.
- На екрана Pre-Spin Deck Verification (Потвърждаване на плоча преди въртене) изберете **ОК**.
- Наблюдавайте как ML STAR изпълнява автоматизираните стъпки.
- Когато бъдете подканени от мениджъра на работния процес (Workflow Manager), се уверете, че зареждащата плоча на ML STAR няма никакви препятствия, за да позволи на ML STAR да разтовари носачите.
- Изберете **Unload** (Разтоварване) за разтоварване на плочата.
- Отстранете плаката с дълбоки ямки за междинна плазма, както следва.
 - Проверете плаката за постоянни обеми във всяка ямка (без грешки с пипета). Очакваният обем е 1000 µl.

- b. Запишете всички несъответствия, когато процедурата за изолиране на плазмата приключи.
 - c. Запечатайте плочата, поставете баланс и центрофугирайте при 5600 × g за 10 минути с изключена спиратка или поставена на най-ниска степен.
16. Изберете **Yes** (Да), за да продължите към финалния етап на приготвяне на плазмата.
 17. Отстранете запечатването на плаката и поставете отново плаката върху носача.

Размер на партидата на пробата	Носач Тип	Проследяване	Артикул	Позиция на мястото
24, 48, 96	Multiflex	19 – 24	Плака с дълбоки ямки за междинна плазма.	5

18. Поставете отметка в **квадратчето Intermediate Plasma plate has been spun** (Междинната плазмена плоча е завъртяна) и след това изберете **OK**.
19. Наблюдавайте как ML STAR изпълнява автоматизираните стъпки.
20. Когато бъдете подканени от мениджъра на работния процес (Workflow Manager), се уверете, че зареждащата плоча на ML STAR няма никакви препятствия, за да позволи на ML STAR да разтовари носачите.
21. Изберете **Unload** (Разтоварване) за разтоварване на плочата.
22. Когато мениджърът на работния процес (Workflow Manager) ви подкани, изпразнете носачите и плочата.
23. Извадете плаката с дълбоки ямки за крайна плазма.
24. Прегледайте плаката за следните грешки:
 - Несъвместими обеми във всяка ямка. Очакваният обем е 900 µl.
 - Видими клетъчни гранули.
 - Прекомерна хемолиза.
 Ако забележите абнормални видими клетъчни гранули или прекомерна хемолиза, анулирайте засегнатата проба в края на метода за изолиране на плазма (Plasma Isolation) или използвайте мениджъра на партиди (Batch Manager). За повече информация относно мениджъра на партиди (Batch Manager) вижте *VeriSeq NIPT Solution v2 Software Guide (документ № 1000000067940)*.
25. При подкана от мениджъра на работния процес (Workflow Manager) изберете **OK**.
26. Въведете коментари за засегнатите ямки и след това изберете **OK**.
27. Изпълнете една от следните стъпки:
 - За да продължите към cfDNA Extraction (Екстракция на cfDNA), изберете **Yes** (Да).
 - За да спрете, изберете **Exit** (Изход).

БЕЗОПАСНА ТОЧКА ЗА СПИРАНЕ

Ако спирате, запечатайте плаката с финална плазма и я съхранявайте при температура от 2°C до 8°C за период до 7 дни.

Екстракция на cfDNA

Подготовка

1. Прегледайте визуално кутиите за екстракция и аксесоари, за да потвърдите, че срокът на годност на комплекта не е изтекъл.
2. Подгответе следните реагенти: Етикетирайте ваничките на резервоара с дълбоки ямки с името на реагентите.

Реагент	Съхранение	Инструкции
Плака за крайна плазма с дълбоки ямки	2°C до 8°C	Ако са били съхранявани преди това, оставете ги да престоят 30 минути, за да достигнат стайна температура. Центрофугирайте при 1000 x g за 20 секунди. Преди употреба разпечатайте дълбокоямковата плака за крайна плазма.

3. Бавно добавете 3,75 ml протеиназен буфер към всеки флакон за реагент с протеиназа К.
 - Подгответе 3 флакона за 24 и за 48 проби.
 - Подгответе 4 флакона за 96 проби.
4. Затворете флаконите с протеиназа К и разбъркайте със завихряне, докато се ресуспендират.



ВНИМАНИЕ

Не замърсявайте гумената запушалка. Попадането на други вещества върху гумената запушалка може да доведе до замърсяване на бъдещите проби.

5. Пулирайте приготвената протеиназа К от всички флакони във ваничка за реагенти и я етикетирайте като протеиназа К.
6. Добавете по 100 ml 100% EtOH към всяка бутилка с реактив за промивен буфер II.
 - Подгответе 1 бутилка за 24 и 48 проби.
 - Подгответе 2 флакона за 96 проби.
7. Обърнете бутилките с промивен буфер II, за да се смесят.
8. Маркирайте квадратчетата за отметка в бутилките с промивен буфер II.
9. Етикетирайте 1 нова плака с цял борд Intermediate и нанесете баркода на плаката.
10. Етикетирайте 1 нова плака с цял борд cfDNA Elution и нанесете баркода на плаката.
11. Етикетирайте 1 нова дълбокоямкова плака Extraction Intermediate и нанесете баркода на дълбокоямковата плака.
12. Нанесете баркода на плаката за свързване на ДНК.
13. Поставете фолио за запечатване върху неизползваните ямки за ваничките за 24 и 48 проби.

14. Пригответе почистващ разтвор на 70% EtOH (70% EtOH, 30% вода без DNase/RNase) за почистване на вакуумната система.
15. Подгответе вакуумната система, както следва.
 - a. Свалете вакуумния колектор и го почистете със 70% EtOH.
Избягвайте да почиствате уплътнението с EtOH, тъй като това може да доведе до крехкост на материала.
 - b. Изхвърлете вакуумния отпадък.
 - c. Уверете се, че вакуумната система ML STAR е включена.

Процедура

1. Изберете **OK** и започнете извличането на cfDNA.
2. Ако методът **VeriSeq NIPT** не е отворен:
 - a. Отворете AppLauncher и след това изберете **VeriSeq NIPT Method**.
 - b. Въведете идентификатора на партидата и потребителското име, след което изберете **OK**.
3. Заредете крайници в носачите за крайници, както следва, и след това изберете **OK**.



ВНИМАНИЕ

Преди да започнете метода за партидите с 24, 48 и 96 проби, поставете пълен стелаж с 8-канални крайници.

Размер на партидата на пробата	Носач Тип	Проследяване	Артикул	Позиция на мястото
24	Накрайник	1 – 6	Накрайници 1000 µl	1
		7 – 12	Накрайници 300 µl	1
48	Накрайник	1 – 6	Накрайници 1000 µl	1, 2
		7 – 12	Накрайници 300 µl	1
96	Накрайник	1 – 6	Накрайници 1000 µl	1, 2, 3, 4
		7 – 12	Накрайници 300 µl	1

4. Заредете преброените накрайници в носачите, както следва.

Размер на партидата на пробата	Носач Тип	Проследяване	Артикул	Позиция на мястото
24, 48, 96	Накрайник	49 – 54	Накрайници 1000 µl	1
			Накрайници 300 µl	2
			Накрайници 50 µl	3

5. Въведете местоположението на първия и последния накрайник за всяка стойка за накрайници и след това изберете **ОК**.
6. Сканирайте баркодовете на кутиите за извличане.
7. Въведете потребителското име или инициалите на лицето, приготвило реагента, след което изберете **ОК**.
8. Сканирайте баркодовете на кутиите за принадлежности.
9. Въведете потребителското име или инициалите на лицето, приготвило реагента, след което изберете **ОК**.
10. Потвърдете, че баркодовете са поставени.
11. Ако е необходимо, разпечатайте дълбокоямковата плака за крайна плазма.
12. Заредете плаките (с баркод, обърнат надясно) върху носача за плаки, както следва, и след това изберете **ОК**.

Размер на партидата на пробата	Носач Тип	Проследяване	Артикул	Позиция на мястото
24, 48, 96	Multiflex	19 – 24	Нова плака с цял борд, Intermediate – с баркод	1
			Нова плака с цял борд, cfDNA Elution – с баркод	2
			Нова плака с дълбоки ямки, Extraction Intermediate – с баркод	4
			Плака за крайна плазма с дълбоки ямки – с баркод	5

13. Потвърдете, че плаката за свързване на ДНК е с баркод, след което изберете **ОК**.
14. За частични партиди от плаки запечатайте неизползваните кладенци (колони 4 – 12 за партиди с 24 проби и колони 7 – 12 за партиди с 48 проби).
15. Заредете плаката за свързване на ДНК върху вакуумния колектор с баркода, обърнат надясно.

16. Преди да поставите плака за свързване върху BVS колектора, визуално огледайте ямките за възможни запушвания.

Това може да повлияе потока от реагенти под вакуум.

17. Ако се използват партиди с 24 или 48 проби, покрийте неизползваните ямки и запечатете с фолио. Изберете полето за отметка **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (Запечатани ли са колоните на плака за свързване на ДНК?) и след това изберете **ОК**.

18. Заредете ваничките с реагенти върху носача за реагенти, както следва, и след това изберете **ОК**.

Размер на партидата на пробата	Носач Тип	Проследяване	Артикул	Позиция на мястото
24, 48	Реагент	47	16 ml буфер за елуиране	1
			11 ml протеиназа К	2
96	Реагент	47	16 ml буфер за елуиране	1
			15 ml протеиназа К	2

19. Прехвърлете посочените реагенти в резервоарите за дълбоки ямки и след това заредете резервоарите върху носачите на дълбоки ямки, както следва.

20. Изберете **ОК**.

Размер на партидата на пробата	Носач Тип	Проследяване	Артикул	Позиция на мястото
24, 48	Дълбока ямка	39 – 44	125 ml промивен буфер II	1
			125 ml промивен буфер I	2
			60 ml 100% EtOH	3
			100 ml лизиращ буфер	4
			60 ml вода без DNase/RNase	5
96	Дълбока ямка	39 – 44	200 ml промивен буфер II	1
			125 ml промивен буфер I	2
			100 ml 100% EtOH	3
			100 ml лизиращ буфер	4
			100 ml вода без DNase/RNase	5

21. Изчакайте автоматизираната проверка на обема на реагента да завърши.

22. Уверете се, че вакуумните отпадъци са празни (препоръчително е наполовина пълно), и след това изберете **ОК**.
23. Потвърдете разположението на всички носачи, лабораторни съдове и реагенти и след това изберете **ОК** на екрана за проверка на екстракционната плоча.
24. Наблюдавайте ML STAR по време на автоматизираните стъпки.



Трябва да предотвратите ръчно преливането на проби, което не е установено от системата, преди замърсяването на близките ямки.

25. След последния етап на вакуумиране, отстранете ДНК свързващата плака и почистете долната повърхност със 70% EtOH.
26. Запечатайте всички непокрити ямки върху плаката за свързване на ДНК и след това поставете плаката за свързване на ДНК върху празната плака с дълбоки ямки за крайна плазма.
27. Центрофугирайте ДНК свързващата плоча/модул за крайна плазма при 5600 × g за 10 минути с включена спирачка.
28. Изберете **ОК**.
29. По време на центрофугирането на плаката за свързване на ДНК, завършете вакуумното почистване:
 - a. Отстранете вакуумния колектор и след това изберете **ОК**.
 - b. Изчакайте автоматизираното изхвърляне на отпадъците да завърши.
 - c. Почистете вакуумния колектор и във вътрешността на вакуумната система със 70% EtOH и след това сменете вакуумния колектор.
 - d. Поставете отметка в квадратчето **Manifold is on Vacuum** (Колекторът е на вакуум), за да стартирате прехвърлянето на елуиращата плака върху вакуумния колектор, след което изберете **ОК**.
30. След центрофугиране отпечатайте ямките, съдържащи проби, върху плаката за свързване на ДНК.
31. Поставете плаката за свързване на ДНК отгоре на плаката за елуиране на cfDNA, която е на вакуумния колектор.
32. Заредете плочата за свързване на ДНК с баркода вдясно и след това изберете **ОК**.
33. Наблюдавайте ML STAR по време на автоматизираните стъпки.
34. След стъпката за инкубиране изберете полето за отметка **Plates are assembled as indicated** (Плаките се сглобяват, както е посочено). Потвърдете, че модулът за свързване на ДНК/плаката cfDNA Elution е върху опорната основа (ако се изисква от центрофугата).
35. Запечатайте непокритите ямки върху ДНК свързващата плака.
36. Центрофугирайте при 5600 × g за 2 минути с включена спирачка, след което изберете **ОК**.
37. Инспектирайте визуално плаката cfDNA Elution за консистентност на обемите във всяка ямка. Очакваният обем е около 55 µl.
38. Запечатайте и запазете плаката cfDNA Elution за подготовка на библиотеката.

39. Когато бъдете подканени от мениджъра на работния процес (Workflow Manager), се уверете, че зареждащата плоча на ML STAR няма никакви препятствия, за да позволи на ML STAR да разтовари носачите.
40. Изберете **Unload** (Разтоварване) за разтоварване на плочата.
41. Разтоварете всички носачи и почистете плочата ML STAR, след което изберете **OK**.
42. Въведете коментари за засегнатите ямки и след това изберете **OK**.
43. Изпълнете една от следните стъпки:
- За да продължите да подготвяте библиотеки, изберете **Yes** (Да).
 - За да спрете, изберете **Exit** (Изход).

БЕЗОПАСНА ТОЧКА ЗА СПИРАНЕ

Ако спирате, запечатайте плаката за елуиране на cfDNA и я съхранявайте при -25°C до -15°C за период до 7 дни.

Приготвяне на библиотеки

Подготовка

1. Прегледайте визуално кутиите за подготовка на библиотеката и принадлежностите, за да потвърдите, че срокът на годност на комплектите не е изтекъл.
2. Подгответе следните реагенти: Етикетирайте ваничките на резервоарите и резервоарите с дълбоки ямки с името на реагентите.

Реагент	Съхранение	Инструкции
Смес от А-връзки	-25°C до -15°C	Размразете на стайна температура. Разбъркайте чрез завихряне, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
Плака за елуиране на cfDNA	-25°C до -15°C	Ако е съхранявана преди това, потвърдете, че плаката не е съхранявана повече от 7 дни, и я размразете на стайна температура. Разбъркайте чрез завихряне на 1500 об./мин за 1 минута. Центрофугирайте при 1000 × g за 20 секунди.
Смес за крайно възстановяване	-25°C до -15°C	Размразете на стайна температура. Разбъркайте със завихряне, за да се смесят.
Буфер за хибридизация	-25°C до -15°C	Размразете на стайна температура. Разбъркайте със завихряне, за да се смесят. Върнете на съхранение след употреба.
Лигираща смес	-25°C до -15°C	Размразете на стайна температура. Разбъркайте чрез завихряне, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
ДНК адаптерна плака NIPT	-25°C до -15°C	Размразете на стайна температура. Разбъркайте със завихряне, за да се смесят. Центрофугирайте при 1000 × g за 20 секунди.
Ресуспензионен буфер	2°C до 8°C	Разбъркайте със завихряне, за да се смесят. Върнете на съхранение след употреба.
Топчета за пречистване на проби	2°C до 8°C	Оставете ги да престоят 30 минути, за да достигнат стайна температура. Разбъркайте с енергично завихряне преди всяка употреба. Разбъркайте чрез завихряне или обръщане, докато всички топчета се окажат в суспензия и сместа стане хомогенна.

**ВНИМАНИЕ**

Когато разпечатвате ДНК адаптерна плака NIPT, внимавайте много, за да избегнете кръстосано замърсяване с аерозол между ямките, което може да доведе до неточни резултати.

3. Ако плаката cfDNA Elution е съхранена в замразен вид, подгответе я, както следва.
 - a. Размразете на стайна температура.
 - b. Разбъркайте чрез завихряне на 1500 об./мин за 1 минута.
 - c. Центрофугирайте при 1000 × g за 20 секунди.
4. Етикетирайте една нова плака с цял борд, библиотеки и поставете баркод на плаката.
5. Подгответе 80% EtOH от абсолютен EtOH. Комбинирайте 40 ml 100% EtOH и 10 ml вода без DNase/RNase. Обърнете, за да се смеси.
6. Уверете се, че терморегулаторът ML STAR е включен.

Разреждане на ензими

1. Комбинирайте смес от А-връзки и ресуспензионен буфер в епруветка с винтова капачка. Разбъркайте чрез завихряне, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.

Размер на партидата на пробата	Смес от А-връзки (µl)	Ресуспензионен буфер (µl)
24, 48	900	1200
96	1800	2400

2. Комбинирайте лигираща смес и ресуспензионен буфер в епруветка с винтова капачка. Разбъркайте чрез завихряне, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.

Размер на партидата на пробата	Лигираща смес (µl)	Ресуспензионен буфер (µl)
24, 48	230	1713
96	440	3278

Процедура

1. Изберете **OK**, за да започнете подготовка на библиотека. Ако **VeriSeq NIPT Method** (Метод VeriSeq NIPT) още не е отворен:
 - a. Отворете AppLauncher и изберете **VeriSeq NIPT Method** (Метод VeriSeq NIPT).
 - b. Въведете идентификатора на партидата и потребителското име, след което изберете **OK**.
2. Уверете се, че следните консумативи са подготвени, както е посочено на екрана за подготовка на реагенти:
 - Смес от А-връзки, лигираща смес и 80% EtOH.

- Топчета за пречистване на проби, смес за крайно възстановяване и ДНК адаптерна плака NIPT.
3. Поставете отметка в квадратчетата за отметка, след което изберете **OK**.
 4. Сканирайте баркодовете на кутията за подготовка на библиотеки.
 5. Въведете потребителското име или инициалите на лицето, приготвило реагента, след което изберете **OK**.
 6. Сканирайте баркодовете на кутиите за принадлежности.
 7. Въведете потребителското име или инициалите на лицето, приготвило реагента, след което изберете **OK**.
 8. Заредете накрайниците в носачите за накрайници, както следва, и след това изберете **OK** за всеки носач.

Размер на партидата на пробата	Тип носач	Проследяване	Артикул	Позиция на мястото
24	Накрайник	1 – 6	Накрайници 50 µl	1
		7 – 12	Накрайници 300 µl	1, 2
48	Накрайник	1 – 6	Накрайници 50 µl	1, 2
		7 – 12	Накрайници 300 µl	1, 2, 3, 4
96	Накрайник	1 – 6	Накрайници 50 µl	1, 2, 3, 4
		7 – 12	Накрайници 300 µl	1, 2, 3, 4, 5

9. Ако сте спрели протокола след процедурата за екстракция на cfDNA, заредете изброените накрайници в носачите, както следва.

Размер на партидата на пробата	Тип носач	Проследяване	Артикул	Позиция на мястото
24, 48, 96	Накрайник	49 – 54	Накрайници 1000 µl	1
			Накрайници 300 µl	2
			Накрайници 50 µl	3

10. Въведете местоположението на първия накрайник за всеки тип стойка за накрайници и след това изберете **OK**.

11. Потвърдете, че баркодовете са поставени, и заредете плаките (баркод, обърнат надясно) върху носача на плаката, както следва, и след това изберете **ОК**.

Размер на партидата на пробата	Тип носач	Проследяване	Артикул	Позиция на мястото
24, 48, 96	Multiflex	19 – 24	Плака за елуиране на cfDNA – с баркод	1
			ДНК адаптерна плака – с баркод	2
			Нова 96-ямкова плака с цял борд, библиотеки – с баркод	3
			Нови 96-ямкови плаки с цял борд	4, 5

12. Заредете носача за дълбоки ямки, както следва, и след това изберете **ОК**.

Размер на партидата на пробата	Тип носач	Проследяване	Артикул	Позиция на мястото
24, 48, 96	Дълбока ямка	39 – 44	50 ml 80% EtOH в резервоар с дълбоки ямки	1
			Нови 96-ямкови плаки с цял борд	2, 3, 4, 5

13. Заредете ваничките с реагенти върху носача за реагенти, както следва, и след това изберете **ОК**.

Размер на партидата на пробата	Тип носач	Проследяване	Артикул	Позиция на мястото
24, 48, 96	Реагент	47	2,5 ml смес за крайно възстановяване	1
			Подготвена смес за А-връзки (общ обем)	2
			Подготвена лигираща смес (общ обем)	3
			10 ml топчета за пречистване на проби	4
			12 ml буфер за хибридизация	5

14. Запазете остатъка от 12 ml буфер за хибридизация (HT1) в контейнера за обединяване.

15. Уверете се, че носачите, лабораторният инвентар и реагентите са заредени правилно, и след това изберете **OK** на екрана за проверка Library Deck Verification (Проверка на плочата за библиотеки).
16. Изчакайте автоматизираната проверка на обема на реагента да завърши.
17. Наблюдавайте ML STAR по време на автоматизираните стъпки.
18. Когато бъдете подканени от мениджъра на работния процес (Workflow Manager), се уверете, че зареждащата плоча на ML STAR няма никакви препятствия, за да позволи на ML STAR да разтовари носачите.
19. Изберете **Unload** (Разтоварване) за разтоварване на плочата.
20. Инспектирайте плаката за библиотеки за консистентност на обемите във всяка ямка.



ВНИМАНИЕ

Ако обемите на ямките покажат несъответствие, пробите могат да дадат неправилни резултати.

21. Ако съхранявате, запечатайте и запазете плаката за библиотеки.
22. Разтоварете носачите, почистете плочата и след това изберете **OK**.
23. Въведете коментари за засегнатите ямки и след това изберете **OK**.
24. Изпълнете една от следните стъпки:
 - За да продължите към Quantify Libraries (Количествено определяне на библиотеки), изберете **Yes** (Да).
 - За да спрете, изберете **Exit** (Изход).

БЕЗОПАСНА ТОЧКА ЗА СПИРАНЕ

Ако спирате, запечатайте плаката за библиотеки преди съхранение. Плаката с библиотеки е стабилна до 7 дни от датата на приготвяне при -25°C до -15°C.

Количествено определяне на библиотеки

Подготовка

1. Подгответе следните реагенти:

Реагент	Съхранение	Инструкции
Реагент за количествено определяне на ДНК	2°C до 8°C	Пазете от светлина. Размразете на стайна температура в продължение на 30 – 150 минути. (Препоръчва се отстраняване на реагента в началото на процедурата за подготовка на библиотеки.) Разбъркайте чрез завихряне, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.

Реагент	Съхранение	Инструкции
Стандарт за количествено определяне на ДНК	2°C до 8°C	Разбъркайте чрез завихряне, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
Ресуспензионен буфер	2°C до 8°C	Разбъркайте със завихряне, за да се смесят.

2. Ако плаката с библиотеки е съхранена в замразен вид, подгответе я, както следва.
 - a. Потвърдете, че плаката не е съхранявана повече от 7 дни, и я размразете на стайна температура.
 - b. Вортексирайте, за да се смесят.
 - c. Центрофугирайте при 1000 × g в продължение на 1 минута.
3. Включете флуорометъра 10 минути преди употреба.
4. Нанесете баркод на плаката върху нова 384-ямкова плака.
5. Нанесете баркод на плаката върху нова плака с цял борд.

Процедура

1. Изберете **OK**, за да стартирате количественото определяне.
2. Ако методът VeriSeq NIPT още не е отворен:
 - a. Отворете AppLauncher и изберете **VeriSeq NIPT Method** (Метод VeriSeq NIPT).
 - b. Въведете идентификатора на партидата и потребителското име, след което изберете **OK**.
3. Сканирайте баркодовете на кутиите за принадлежности.
4. Въведете потребителското име или инициалите на лицето, приготвило реагента, след което изберете **OK**.
5. Заредете накрайниците в носача за накрайници, както следва, и след това изберете **OK**.

Размер на партидата на пробата	Тип носач	Проследяване	Артикул	Позиция на мястото
24, 48	Накрайник	1 – 6	Стойка за накрайници 300 µl	1
			Стойка за накрайници 50 µl	2
96	Накрайник	1 – 6	Стойка за накрайници 300 µl	1
			Стойка за накрайници 50 µl	2, 3

6. Потвърдете, че барковете са поставени.
7. Ако е необходимо, разпечатете плаката с библиотеки.
8. Заредете плаките (с баркод, обърнат надясно) върху носача Multiflex, както следва, и след това изберете **ОК**.

Размер на партидата на пробата	Тип носач	Проследяване	Артикул	Позиция на мястото
24, 48, 96	Multiflex	19 – 24	Нови плаки с цял борд – с баркод	1
			Нова 384-ямкова плака – с баркод	2
			Плака за библиотеки – с баркод	3
			Нови 96-ямкови плаки с цял борд	4, 5

9. Заредете епруветките с реагенти без капачки в носача за епруветки, както следва, и след това изберете **ОК**.

Размер на партидата на пробата	Тип носач	Проследяване	Артикул	Позиция на мястото
24, 48, 96	Епруветка	46	Стандарт за количествено определяне на ДНК	1
			Реагент за количествено определяне на ДНК	2

10. Заредете ваничките с реагенти върху носача за реагенти, както следва, и след това изберете **ОК**.

Размер на партидата на пробата	Тип носач	Проследяване	Артикул	Позиция на мястото
24, 48, 96	Реагент	47	Нова вана за реагенти (празна)	1
			16 ml ресуспензионен буфер	2

11. Ако сте спрели протокола след процедурата за подготовка на библиотека, заредете изброените крайници в носачите за крайници, както следва.

Размер на партидата на пробата	Тип носач	Проследяване	Артикул	Позиция на мястото
24, 48, 96	Крайник	49 – 54	Крайници 1000 µl	1
			Крайници 300 µl	2
			Крайници 50 µl	3

12. Въведете местоположението на първия и последния крайник за всяка стойка за крайници и след това изберете **OK**.
13. Уверете се, че носачите, лабораторният инвентар и реагентите са заредени правилно, и след това изберете **OK** на екрана за проверка Quant Deck Verification (Проверка на плочата за колич. опред.).
14. Изчакайте автоматизираната проверка на обема на реагента да завърши.
15. Наблюдавайте ML STAR по време на автоматизираните стъпки.
16. Когато бъдете подканени от мениджъра на работния процес (Workflow Manager), се уверете, че зареждащата плоча на ML STAR няма никакви препятствия, за да позволи на ML STAR да разтовари носачите.
17. Изберете **Unload** (Разтоварване) за разтоварване на плочата.
18. Разтоварете плаката за библиотеки.
- Инспектирайте плаката за консистентност на обемите във всяка ямка.
 - Запечатайте плаката за библиотеки и я съхранявайте на стайна температура до приключване на флуорометричния анализ на данните.
19. Разтоварете останалите 96-ямкови плаки и проверете дали обемите са еднакви във всяка ямка. Грубите грешки в обема могат да означават проблем със стъпките на пипетиране.
20. Разтоварете 384-ямковата плака и проверете дали има течност в съответните ямки.
21. Запечатайте плаката със запечатващо фолио.
22. Центрофугирайте при 1000 × g за 20 секунди.
23. Инкубирайте при стайна температура за 10 минути при защитени от светлина условия.
24. Извадете всички носачи.
25. Почистете плочата ML STAR, след което изберете **OK**.



ВНИМАНИЕ

Не извърляйте реагентите за количествено определяне, докато не получите данни. Реагентите ще са ви необходими, ако трябва да извършите повторно количествено определяне.

26. След инкубацията отстранете запечатващото фолио и заредете 384-ямковата плака в четеща на микроплаки. Уверете се, че използвате лилавата адаптерна плака (номер на част: 0310-4336), предоставена от молекулни устройства или еквивалент, ако е приложимо на използвания инструмент.
 - Уверете се, че при зареждане A1 се намира в горния ляв ъгъл.
27. Изберете шаблона VeriSeq NIPT, за да го отворите в SoftMax Pro.
28. Изберете **New Experiment** (Нов експеримент) в раздела Home (Начало).
29. Изберете **Read** (Четене).
30. Експортирайте данните като XML, както следва.
 - a. Изберете с десния бутон на мишката върху **Plate** (Плака), след което изберете **Rename** (Преименуване).
 - b. Сканирайте баркода на плаката за количествено определяне и изберете **OK**.
 - c. В горния ляв ъгъл на екрана изберете иконата на плаката, след което изберете **Export** (Експортиране) от менюто.
 - d. Поставете отметка в квадратчето **Expt name** (Име на експ.), задайте опцията за дата на плаката като raw (необработена), задайте изходящия формат на XML и след това изберете **OK**.
 - e. Задайте пътя и името на изходния файл, след което изберете **Save** (Запис).
Компютърът Hamilton трябва да има достъп до местоположението на файла. Не използвайте интервали в името на файла или пътеката до него.

Анализ

1. В ML STAR, на екрана Scanner Information (Информация за скенера) въведете идентификатор на флуорометъра.
2. Въведете коментари за работата на флуорометъра, след което изберете **OK**.
3. Навигирайте до *.xml файла за количествено определяне, който съдържа флуорометричните данни, и след това изберете **OK**.
4. Прегледайте резултатите от анализа на кривата на стандартите и концентрацията на пробата, след което изберете **OK**.
5. Ако трябва да сканирате отново плаката, изберете **Rescan** (Повторно сканиране).
Пробите са чувствителни към времето и светлината. Когато е необходимо, незабавно извършете повторно сканиране.
6. Въведете коментари за засегнатите ямки и след това изберете **OK**.

7. Оценете резултатите и продължете по описания по-долу начин.
- Ако резултатите отговарят на спецификацията, преминете към [Библиотеки с пулове на страница 41](#). За спецификациите вижте таблицата с количествени метрики за качествен контрол и граници в Ръководството за *VeriSeq NIPT Solution v2 Software* (документ №1000000067940).
 - Ако резултатите не отговарят на спецификацията, системата прекъсва метода. Повторете процедурите за количествено определяне, като започнете от [Подготовка на страница 36](#).
8. Изпълнете една от следните стъпки:
- За да продължите към [Библиотеки с пулове на страница 41](#), изберете **Yes** (Да).
 - За да спрете, изберете **Exit** (Изход).

БЕЗОПАСНА ТОЧКА ЗА СПИРАНЕ

Ако спирате, запечатайте плаката за библиотеки преди съхранение. Плаката за библиотеки е стабилна до 7 дни кумулативно съхранение от датата на приготвяне при -25°C до -15°C.

Библиотеки с пулове

Подготовка

1. Подгответе следните реагенти:

Реагент	Съхранение	Инструкции
Буфер за хибридизация	-25°C до -15°C	Размразете на стайна температура. Разбъркайте със завихряне, за да се смесят. Върнете на съхранение след употреба.

2. Ако плаката с библиотеки е съхранена в замразен вид, подгответе я, както следва.
- Потвърдете, че плаката не е съхранявана повече от 7 дни, и я размразете на стайна температура.
 - Разбъркайте чрез завихряне на 1500 об./мин за 1 минута.
 - Центрофугирайте при 1000 x g за 20 секунди.
 - Пипетирайте, за да се смеси.
3. Етикетирайте празна епруветка за пулиране А. За 96 проби поставете етикет на втора празна епруветка за пулиране В.
4. Запишете следната програма за денатуриране на термоциклера с нагрят капак.
- Изберете опцията за предварително нагрят капак и задайте 102°C.
 - Настройте обема на реакцията на 50 µl.
 - Задайте максимална скорост на изменение ($\geq 2^\circ\text{C}$ в секунда).
 - Инкубирайте при 96°C за 10 минути, а след това при 4°C за 5 секунди.
 - Съхранявайте при 4°C.

Процедура

1. Поставете плаката за библиотеки върху предварително програмирания термоциклер и стартирайте програмата за денатуриране.
Не денатурирайте плаката за библиотеки, преди количественото определяне да е преминало качествен контрол, тъй като може да искате да извършите повторно количествено определяне.
2. Центрофугирайте плаката за библиотеки при 1000 × g за 20 секунди.
3. Изберете **OK**, за да стартирате библиотеките за обединяване.
4. Ако методът VeriSeq NIPT не е отворен:
 - a. Отворете AppLauncher и изберете **VeriSeq NIPT Method**.
 - b. Въведете идентификатора на партидата и потребителското име, след което изберете **OK**.
5. Изберете концентрацията на пула, след което изберете **OK**.
Целевата плътност на клъстер е 220 – 260 K/mm².

ЗАБЕЛЕЖКА Концентрациите на обединяване и/или обемите на обединяване може да трябва да се увеличат за партиди от по 24 проби, за да се поддържат подобни плътности на клъстер, получени с партиди с 48/96 проби.

6. Ако мениджърът на работния процес (Workflow Manager) ви подкани, извършете една от следните стъпки:
 - За да заредите лист с проби, изберете листа с проби, свързан с партидата, и след това изберете **Load** (Зареждане).
 - За да използвате системните стойности по подразбиране за останалите типове проби, отчитането на пола или типа на екрана, изберете **Use Default** (Използване на стойности по подразбиране) за всяка настройка.
За информация относно създаването на бланка за проби вижте Ръководството за VeriSeq NIPT Solution v2 Software (документ № 1000000067940).
7. Изберете **Start** (Стартиране), за да започнете да измервате времето на денатуриращата плака.
8. Заредете накрайници в носачите за накрайници, както следва.

Размер на партидата на пробата	Тип носач	Проследяване	Артикул	Позиция на мястото
24, 48, 96	Накрайник	7 – 12	50 µl филтърни накрайници	1

9. Заредете денатурираната плака за библиотека (с баркод, обърнат надясно) върху носача Multiflex, както следва, и след това изберете **OK**.

Размер на партидата на пробата	Тип носач	Проследяване	Артикул	Позиция на мястото
24, 48, 96	Multiflex	19 – 24	Денатурирана плака за библиотека (с баркод)	1

10. Заредете епруветките за пулиране в носача за епруветки, както следва, и след това изберете **OK**.

Размер на партидата на пробата	Тип носач	Проследяване	Артикул	Позиция на мястото
24, 48	Епруветка	46	Нова епруветка от 2 ml, пул А	1
96	Епруветка	46	Нова епруветка от 2 ml, пул А	1
			Нова епруветка от 2 ml, пул В	2

11. Заредете ваничките с реагенти върху носача за реагенти, както следва, и след това изберете **OK**.

Размер на партидата на пробата	Тип носач	Проследяване	Артикул	Позиция на мястото
24, 48, 96	Реагент	47	3 ml буфер за хибридизация	1

12. Заредете накрайници в носачите за накрайници, както следва.

Размер на партидата на пробата	Тип носач	Проследяване	Артикул	Позиция на мястото
24, 48, 96	Накрайник	49 – 54	1000 µl филтърни накрайници	1
			300 µl филтърни накрайници	2
			50 µl филтърни накрайници	3

13. Въведете местоположението на първия и последния накрайник за всяка стойка за накрайници и след това изберете **OK**.

14. Уверете се, че носачите, лабораторните инструменти и реагентите са заредени, както е посочено.

15. На екрана Pooling Deck Verification (Потвърждаване на плоча при обединяване) изберете **OK**.

16. Наблюдавайте ML STAR по време на автоматизираните стъпки.

17. Въведете коментари за засегнатите ямки и след това изберете **OK**.

18. Когато бъдете подканени от мениджъра на работния процес (Workflow Manager), се уверете, че зареждащата плоча на ML STAR няма никакви препятствия, за да позволи на ML STAR да разтовари носачите.

19. Изберете **Unload** (Разтоварване) за разтоварване на плочата.
20. Разтоварете носача на епруветки.
21. Затворете всяка епруветка за пулиране, разбъркайте и след това центрофугируйте за кратко.
22. Изберете **OK**.
23. Секвенирайте библиотеките възможно най-скоро след пулиране. Запечатайте плаката за библиотеки и я съхранявайте при температура от -25°C до -15°C в продължение на до 7 дни, за да се даде възможност за повторно обединяване.

БЕЗОПАСНА ТОЧКА ЗА СПИРАНЕ

Ако спирате, затворете епруветките за пулиране и ги съхранявайте при -25°C до -15°C за период до 7 дни.

Приготвяне на пулирани библиотеки за секвениране

Подготовка

1. Подгответе следните реагенти:

Реагент	Съхранение	Инструкции
Епруветки за пулиране	-25°C до -15°C	Ако са били съхранявани преди това, размразете ги на стайна температура. Разбъркайте за кратко чрез завихряне. Центрофугируйте за кратко.

2. Подгответе системата за секвениране от следващо поколение, като попълните следните полета в модула Local Run Manager VeriSeq NIPT:
 - a. Run Name (Име на изпълняването)
 - b. **[Незадължително]** Описание на изпълняването
 - c. Баркод на обединяването



ВНИМАНИЕ

Баркодът на обединяването, въведен в модула LRM, трябва да съвпада с баркода на обединяването, въведен в Workflow Manager (Мениджър на работния поток). Неправилните конфигурации за изпълнение се отхвърлят от софтуера за анализ и може да се наложи повторно секвениране.

За повече информация относно използването на модула Local Run Manager VeriSeq NIPT вижте *ръководството за VeriSeq NIPT Solution v2 Software (документ №1000000067940)*.

Процедура

1. Комбинирайте следните обеми към касетата с реагент и след това разбъркайте с пипета.
 - Буфер за хибридизация (900 µl)
 - 450 µl обединяване А (450 µl)
2. Пристъпете към секвениране със система за секвениране от следващо поколение, като следвате ръководството на системата.
справочно ръководство за вашия инструмент за секвениране от следващо поколение. За NextSeq 550Dx направете справка в *справочното ръководство за инструмента NextSeq 550Dx (документ № 1000000009513)* или в *листовката за инструмента NextSeq 550Dx (документ № 1000000043133)*.
3. Потвърдете правилната конфигурация на изпълняването при запитване.
4. Ако е необходимо, повторете тази процедура за пул В.
 - За да се постигне целевият диапазон на плътност на клъстерите, плаката за библиотека може да се пулира повторно, като се използва различна концентрация за пулиране на Hamilton. Повторното пулиране обезсилва първоначалния пул.
 - Алтернативно, съотношението на обединяването към HT1 (450 + 900 µl) може да се промени, за да се постигне целевият диапазон на плътност на клъстерите.

Секвениране от следващо поколение

VeriSeq NIPT Solution v2 може да се използва със система за секвениране от следващо поколение със следните спецификации:

- с възможност за четене на 2x36 сдвоени краища;
- съвместимост с индексните адаптери на приготвяне на проби VeriSeq NIPT Sample Prep.
- двуканална химия;
- автоматично създаване на .BCL файлове (необработени данни от инструмента за секвениране);
- 400 млн. четения на сдвоени краища на серия;
- съвместим с VeriSeq NIPT Assay Software v2.

NextSeq 550Dx е съвместим с VeriSeq NIPT Solution v2.

Анализ на данните за секвениране

След приключване на секвенирането данните от секвенирането автоматично се изпращат в софтуера VeriSeq NIPT Assay Software v2 за анализ и генериране на отчети. Отчетът включва класификации за всяка проба в партидата, както и оценка на всички показатели за качествен контрол на пробите. Процесът на анализ от завършването на секвенирането до крайните резултати отнема приблизително 4 часа за партида от 48 проби. За подробна информация относно анализа на данните и изходящия файл вижте ръководството за VeriSeq NIPT Solution v2 Software (документ № 1000000067940).

Интерпретиране на резултатите

Алгоритъмът VeriSeq NIPT Solution v2 използва усъвършенстван статистически модел, който съчетава няколко различни типа информация от колекцията от двойки секвенирани фрагменти на библиотеката. Този модел се използва за откриване на геномни региони, които са слабо или свръхпредставени в библиотеката на всяка проба. Важното е, че този модел отчита дали степента на недостатъчното или свръхпредставяне е в количествено съответствие с анеуплоидно събитие във феталния геном на ниво фетална фракция, оценено за библиотеката.

За всички хромозоми данните за секвениране на сдвоени краища се подравняват с референтния геном (HG19). Уникалните недублирани подравнени разчитания се събират пакети от по 100 kb. Съответният брой пакети се коригира за GC отклонения и в съответствие с предварително установено специфично за региона геномно покритие. Използвайки такъв нормализиран брой бинове, се извеждат статистически резултати за всяка автосома чрез сравняване на регионите на покритие, които могат да бъдат засегнати от анеуплоидия с останалите автосоми. Съотношение на вероятност на логаритъма (LLR) се изчислява за всяка проба, като се вземат предвид тези резултати въз основа на покритието и приблизително изчислената фетална фракция. LLR е вероятността пробата да бъде засегната предвид наблюдаваното покритие и феталната фракция спрямо вероятността пробата да бъде незасегната при същото наблюдавано покритие. Изчисляването на това съотношение също взема предвид приблизително изчислената несигурност във феталната фракция. За последващи изчисления се използва естественият логаритъм на съотношението. Софтуерът за анализ оценява LLR за всяка прицелна хромозома и всяка проба, за да осигури определяне на анеуплоидията.

По време на създаването на партида трябва да дефинирате типа на пробата (едноплодна или двуплодна), вида на скрининга (основен или пълногеномен) и отчитането на половите хромозоми (да, не и SCA), желано за всяка проба. Заедно тези опции определят информацията, докладвана за всяка проба.

За всички типове проби, скрининговият тип определя кои автосомни аномалии се отчитат. За основния скринингов тип се отчитат само цели хромозомни тризомични събития, включващи хромозоми 13, 18 и 21. За пълногеномния скринингов тип се отчита цялостна или частична делеция на хромозома или дупликация на всяка автосомна хромозома. Дължината на най-малката докладвана частична делеция или дупликация на хромозома е 7 Mb.

За едноплодни проби можете да деактивирате отчитането на половите хромозоми. Можете също така да конфигурирате съобщаване за анеуплоидии на половите хромозоми със или без докладване на пола на еуплоидни проби.

За двуплодни проби, ако е избрано Да за отчитане на половите хромозоми, резултатът е ограничен до отчитане на наличието или отсъствието на Y хромозома в библиотеката. Анеуплоидия на половата хромозома не може да бъде докладвана за проби от близнаци.

Резултат ANOMALY DETECTED (ОТКРИТА АНОМАЛИЯ) показва скрининг на положителни проби за една или повече аномалии, съответстващи на избрания тип скрининг и опция за докладване на половата хромозома. Когато се открие аномалия, докладът предоставя описание на аномалията в цитогенетична нотация.

VeriSeq NIPT Assay Software v2 използва статистически данни, генерирани по време на секвенирането, за да предостави оценка на феталната фракция (FFE) за всяка проба. FFE е приблизителният фетален компонент на cfDNA, който се възстановява чрез анализа и се отчита като закръглен процент за всяка проба. Средното стандартно отклонение на тази оценка за всички проби е 1,3%. FFE не трябва да се използва изолирано за изключване на проби при докладване на резултати.

За подаване на хромозомни представителни сигнали софтуерът VeriSeq NIPT Assay Software v2 използва индивидуализиран доверителен тест на феталната анеуплоидия (iFACT), динамичен показател за прага, който показва дали системата е генерирала достатъчно покритие на секвениране, като се има предвид оценката на феталната фракция за всяка проба. Отрицателните сигнали се отчитат само ако пробата отговаря на прага на iFACT. Ако пробата не успее да достигне този праг, оценката на качествения контрол (QC) показва FAILED iFACT (НЕУСПЕШЕН iFACT) и системата не генерира резултат.

В допълнение към iFACT, софтуерът VeriSeq NIPT Assay v2 оценява няколко други показатели на качествения контрол по време на анализа. Допълнителните показатели включват оценки на еднородността на покритието в референтните геномни региони и разпределението на дължините на cfDNA фрагментите. Оценката на качествения контрол показва или флаг на качествен контрол, или неуспешен качествен контрол за всички показатели извън допустимия диапазон. В случай на неуспешен качествен контрол системата не генерира резултат за пробата. Ако пробата не успее да премине качествен контрол, тя може да бъде преработена, при условие че достатъчен обем плазма е в епруветката за вземане на кръв.

VeriSeq NIPT Solution v2 генерира данни за използване в заключителен отчет. Не генерира заключителен доклад за пациента. Клиентите носят отговорност за оформянето и съдържанието на заключителния доклад, предоставян на лекуващия лекар. Illumina не носи отговорност за точността на формулировките в заключителния доклад за клиентите.



ВНИМАНИЕ

Проверете оценките на феталната фракция на всички проби. Ако оценките на феталната фракция са сходни за всички проби в рамките на един цикъл, може да е настъпило обединяване на пробата и това да повлияе на резултатите. Свържете се с техническата поддръжка на Illumina за помощ при отстраняване на неизправности.

Характеристики на изпълнението

Следващите данни, описани в разделите за клинично и аналитично изпълнение, са получени чрез използване на протоколите и материалите, описани в инструкциите за употреба, като се започне с плазмата. Всички данни за секвениране за този раздел са генерирани на система за секвениране NextSeq 500/550 или на система за секвениране NextSeq 550Dx със следните конфигурации:

	NextSeq 500/550	NextSeq 550Dx
Софтуер за инструменти	NextSeq Control Software 4.0	NextSeq Operating Software 1.3

	NextSeq 500/550	NextSeq 550Dx
Версия на комплекта с реагенти	NextSeq 500/550 High Output v2.5 (75 cycle) Reagent Kit	NextSeq 550Dx High Output v2.5 (75 cycle) Reagent Kit
Метод на секвениране	Изпълняване на секвениране на 2x36 сдвоени краища в режим на висока производителност	Изпълняване на секвениране на 2x36 сдвоени краища в режим на висока производителност

Клинично проучване

Клиничната точност на VeriSeq NIPT Solution v2 беше демонстрирана чрез оценка на плазмени проби от бременни жени с едноплодна и двуплодна бременност. Пробите са получени от деидентифицирани банки с плазмени проби, които преди това са обработени от периферни спесимени от цяла кръв. Над 45 000 проби са взети под внимание за това проучване. Тези проби са преминали предварителен пренатален скрининг за анеуплоидии на фетална хромозома и частични делеции и дублирания в размер на 7 Mb или повече. Всички проби от засегнатите бременности и подгрупа от последователни проби от незасегнати бременности бяха допустими за тестване, ако бяха налице клинични резултати и критериите за проба бяха изпълнени. Общо 2335 проби бяха в набора проби за анализ. От този набор 2328 проби са от едноплодна бременност и седем проби от двуплодна бременност.

От тези проби 28 (1,2%, 28/2335) проби не са преминали успешно първото оценяване на качествения контрол (QC) при анализирането на попълнените данни за секвениране:

- 27 iFACT неуспешни (една XO, 26 незасегнати)
- Една грешка за данни извън очаквания обхват

Демографски данни и характеристики на бременността

Възрастта на майката, гестационната възраст и тримесечието на [Таблица 7](#) за пробите в пълногеномния скрининг, включително известните проби с мозаицизъм. Повечето (98%) тествани проби представляват бременност в първото тримесечие.

Демографските данни са оценени между основните и пълногеномните кохорти и не показват статистическа разлика. Демографските данни и характеристиките на бременността са сходни, независимо дали са включени, или изключени известните мозайки.

Таблица 7 Демографски данни и характеристики на бременността

Обобщаваща статистика	Пълногеномен (включително известния мозаицизъм)
Брой проби	2307*
Възраст на майката – години	
Средна стойност	35,08
Стандартно отклонение	4,04
Медиана	34,95
25-и перцентил, 75-и перцентил	32,31, 37,79
Минимум, максимум	20,22, 53,02
Гестационна възраст при вземане на кръв – седмици	
Средна стойност	10,93
Стандартно отклонение	1,20
Медиана	10,57
25-и перцентил, 75-и перцентил	10,29, 11,14
Минимум, максимум	10,00, 27,86
Триместър на бременността – n (%)	
< Първи (<14 седмици)	2252 (98%)
Втори	54 (2%)
Трети (≥ 27 седмици)	1 (0%)

* Представените окончателни проби съдържат 7 близнаци.

Клинична ефективност

Направено е сравнение на резултатите, получени чрез VeriSeq NIPT Solution v2 с резултатите от клиничния референтен стандарт. Всички проби в проучването имат клинични референтни стандартни резултати (клинична истина), свързани със състоянието на хромозомната анеуплоидия на плода и частични делеции и дупликации от 7 Mb или повече. Резултатът от клиничния референтен стандарт за пробите, включени в това проучване, зависи от резултатите от хромозомния анализ или от физическия преглед на новороденото с отрицателен скрининг чрез пренатален неинвазивен тест (NIPT) на базата на секвениране от следващо поколение (NGS). Обучен персонал на проучването извърши класификация на данните от клиничния референтен стандарт в съответствие с документа за медицинско кодиране на спонсора.

Методите за хромозомен анализ включват кариотипиране, флуоресцентна in situ хибридизация (FISH) или сравнителна геномна хибридизация на хромозомен микрочип (CMA). Хромозомният анализ е извършен върху периферна кръв или слюнка на новородено или кърмаче, проби от продукти на зачеването (РОС), амниоцити, хорионни власинки, плацентни тъкани или постнатална кръв от пъпна връв.

Мозаицизмът се определя като наличие на две или повече клетъчни линии с различен хромозомен състав в даден индивид. Клетъчните линии произхождат от една и съща зигота. Видът и степента на мозаицизъм варират и зависят от времето на мозаичните събития по време на ембриогенезата и феталното развитие. В пренаталната диагностика се появяват различни видове мозаицизъм в зависимост от разпределението на аномалните спрямо нормалните клетъчни линии в цитотрофобласта, мезенхима или плода.¹⁰ Въпреки че мозаицизъм може да се наблюдава при всяка хромозомна аномалия, честотата на мозаицизъм при редките тризомии е по-висока, отколкото при тризомиите на хромозоми 21, 18, и 13 (T21, T18, и T13).¹¹ При оценката на ефективността случаите на мозаицизъм бяха включени в геномния анализ, тъй като целта на този тип скрининг за този тест е да открива редки автозомни анеуплоидии (RAA).

Основно изпълнение на скрининга

В базовия скрининг са включени аномалии T21, T18 и T13. В анализа са включени общо 2243 едноплодни и двуплодни проби. Всичките седем двуплодни бременности са правилно определени като T21 и не са отчетени в следващата таблица.

Таблица 8 Чувствителност и специфичност на VeriSeq NIPT Solution v2 за определяне на тризомии 21, 18 и 13 при базов скрининг на едноплодни бременности (изключвайки познатия мозаицизъм).

	T21	T18	T13
Чувствителност	> 99,9% (130/130)	> 99,9% (41/41)	> 99,9% (26/26)
Двустранно 95% CI	97,1%, 100%	91,4%, 100%	87,1%, 100%
Специфичност	99,90% (1982/1984)	99,90% (1995/1997)	99,90% (2000/2002)
Двустранно 95% CI	99,63%, 99,97%	99,64%, 99,97%	99,64%, 99,97%

Ефективността на анализа в основния скрининг, както е показано в [Таблица 8](#), е изчислена, като се изключва подгрупа от 64 проби, засегнати от RAA, автозомни частични делеции или дупликации или известен мозаицизъм. Тези 64 проби включват осем мозайки T21 и три мозайки T18. Пет от тези 11 проби бяха идентифицирани като засегнати от аномалията, открита от VeriSeq NIPT Assay Software v2.

Ефективност на пълногеномния скрининг

При пълногеномния скрининг всяка аномалия включва тризомии, монозомии и частични делеции или дупликации с размер 7 Mb или повече. Пробите за пълногеномния скрининг съдържат 36 проби с известен мозаицизъм. Изследвани са общо 2307 едноплодни и двуплодни проби. Всичките седем

двуплодни бременности са правилно определени като притежаващи аномалията на хромозома 21 и не са отчетени в следващите таблици.

Ефективност на пълногеномния скрининг за всяка аномалия

Таблица 9 Чувствителност и специфичност на VeriSeq NIPT Solution v2 за откриване на всяка аномалия в пълногеномния скрининг (включително известни мозайки)

	Чувствителност	Специфичност
Изчислен % (n/N)	95,5% (318/333)	99,34% (1954/1967)
Двустранно 95% CI	92,7%, 97,3%	98,87%, 99,61%

Ефективност на пълногеномния скрининг за редки автозомни анеуплоидии

Таблица 10 Чувствителност и специфичност на VeriSeq NIPT Solution v2 за редки автозомни анеуплоидии (RAA) при пълногеномния скрининг (включително известни мозайки)

	Чувствителност	Специфичност
Изчислен % (n/N)	96,4% (27/28)	99,80% (2001/2005)
Двустранно 95% CI	82,3%, 99,4%	99,49%, 99,92%

Ефективност на пълногеномния скрининг за частични делеции и дупликации

Таблица 11 Чувствителност и специфичност на VeriSeq NIPT Solution v2 за частични делеции и дупликации с размер 7 Mb или повече при пълногеномния скрининг (включително известни мозайки)

	Чувствителност	Специфичност
Изчислен % (n/N)	74,1% (20/27)	99,80% (2000/2004)
Двустранно 95% CI	55,3%, 86,8%	99,49%, 99,92%

Разлики в ефективността на основния и пълногеномния скрининг

Методологията за оценяване на често срещани тризомии и анеуплоидии на половите хромозоми е една и съща както за основния, така и за пълногеномния скрининг. Основният скрининг прилага само алгоритъма за T21, T18 и T13. А пълногеномният скрининг разширява тази методология, за да се оценят всички тризомии и RAA, както и частични дупликации и делеции.

Има две разлики в отчитането на резултатите, описани между основните и пълногеномните скрининги. Първо, за геномния скрининг са включени проби с известен мозаицизъм, както за общи тризомии, така и за RAA и частични делеции и дупликации за измерване на ефективността. Второ, пълногеномният скрининг може да отчете с предимство откриването на частична дупликация или делеция пред пълна тризомия. Наличието на пълна тризомия в допълнение към частична дупликация или делеция може да се види чрез позоваване на LLR резултата, предоставен в допълнителния доклад.

Включване на мозайки в пълногеномния скрининг

Мозаицизмът е посочен като ограничение на този анализ. Когато е налице мозаицизъм, сигналът за аномалия на плода е намален и поради това може да е по-трудно да се открие, без да се компрометира общата специфичност на анализа. Въпреки това, тъй като мозаицизмът има по-голямо значение за разширеното съдържание, пробите с мозаицизъм са включени в геномния скрининг.

От 64-те проби, включени в пълногеномния скрининг, но не и в основния скрининг, 36 проби са идентифицирани като такива с мозаицизъм чрез клиничния референтен стандарт. От тези 36 проби 23 резултата съвпаднаха с клиничния референтен стандарт.

Откриване на частична делеция или дупликация срещу откриване на анеуплодия на цяла хромозома

Решението VeriSeq NIPT Solution v2 разполага с опции от менюто за основен скрининг и за пълногеномен скрининг. В основния екран резултатът ОТКРИТА АНОМАЛИЯ се съобщава само когато е открита пълна анеуплодия на хромозоми 21, 18 или 13 и ако са изпълнени всички показатели за контрол на качеството. При пълногеномния скрининг системата открива анеуплоидии във всички автозоми и частични делеции и дупликации с размер най-малко 7 Mb.

При използване на пълногеномния скрининг, в случаи, в които пълно хромозомно събитие и CNV събитие в същата хромозома превишават прага за LLR, системата дава предимство на докладването на събитие за частична делеция или дупликация пред докладването на цяла хромозома, ако размерът на частичната делеция или дупликация обхваща приблизително 75% или по-малко от хромозомата, при която е открито събитието. Ако откритият участък на частична делеция или дупликация е по-голям от 75% от размера на хромозомата, събитието се отчита като пълна тризомия или монозомия на цялата хромозома, ако едновременно се превишава и LLR прагът за цялата хромозома. Поради това значително големите делеции и дупликации, които са по-малки или равни на 75% от размера на хромозомата, могат да са показателни за анеуплодия на цялата хромозома.

При всички проби резултатът LLR за класификацията на цялата хромозома е наличен в допълнителния доклад. LLR резултатът трябва да бъде прегледан по отношение на посочената граница на [95% вероятност за откриване на средни региони по размер за VeriSeq NIPT Solution v2 на страница 64](#), преди да се интерпретира резултатът. Например CNV обозначаване, в което LLR резултатите на ниво хромозома, надвишаващи граничната стойност, осигуряват допълнителна подкрепа за тълкуване, съответстващо на анеуплодия на цялата хромозома, вижте [Таблица 12](#) за пример.

В клиничното проучване имаше две проби от едноплодна бременност със значително големи дупликации (една на хромозома 21 и една на хромозома 18), които бяха по-малко от 75% от относителния размер на хромозомата (вижте [Таблица 12](#)). И двете събития са докладвани като частични дупликации, а не като пълна тризомия за тази хромозома. LLR стойностите за тези събития са над границата, съответстваща на засегнат резултат при пълна тризомия. При частична дупликация или пълна тризомия последващото управление при положителен резултат от NIPT е да се предложи на пациента потвърждаващо изследване чрез пренатална диагностика.

Таблица 12 Примери за големи случаи на дупликация, идентифицирани при пълногеномния скрининг

	Клинична истина	Резултат на пълногеномната система	Размер на аномалията (Mb)	% от хромозомата	LLR резултати
Проба 1	Тризомия 21 при едноплодна бременност	Частична дупликация на 21	22,50	48,9	19,43
Проба 2	Тризомия 18 при едноплодна бременност	Частична дупликация на 18	47,00	60,2	12,99

Вижте *Ръководството за софтуера на VeriSeq NIPT Solution v2 (документ № 1000000067940)* за допълнителна информация относно показателите за контрол на качеството, използвани за докладване на резултатите за анеуплоидии.

Полови хромозоми

Резултатите от VeriSeq NIPT Solution v2 за половите хромозоми са сравнени с резултатите от клиничния референтен стандарт и са обобщени в следната таблица. Процентът на съвпадение е изчислен за всяка полова хромозома в рамките на всеки клиничен референтен стандартен резултат. Процентът на съвпадение е изчислен като брой проби, при които сигналът на половите хромозоми от VeriSeq NIPT Solution v2 съвпада с класификацията на клиничния референтен стандарт, разделен на общия брой проби със същата класификация на клиничния референтен стандарт.

Таблица 13 Процентно съвпадение за класификация на пола на плода*

Класификация на пола на плода		Фенотип от физикалния преглед на новороденото		Цитогенетични резултати							
Установени	Кариотип	Женски	Мъжки	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY	Други**	Липсващи
Не е установена аномалия	XX	997	0	21	0	2	0	0	0	0	0
Не е установена аномалия	XY	0	966	0	15	0	0	0	0	0	1

Класификация на пола на плода		Фенотип от физикалния преглед на новороденото		Цитогенетични резултати							
Установени	Кариотип	Женски	Мъжки	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY	Други**	Липсващи
Установена е аномалия	XO	0	0	0	0	19	0	0	1	0	0
Установена е аномалия	XXX	0	0	0	0	0	17	0	0	1	0
Установена е аномалия	XXY	0	0	0	0	0	0	23	0	1	0
Установена е аномалия	XYY	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0
Общо		997	966	21	15	21	17	23	12	2	1
Процентно съвпадение		100	100	100	100	90,5	100	100	91,7	Не е приложимо	Не е приложимо

* Пет двуплодни бременности са класифицирани правилно като бременности с наличие на Y. Две бременности са класифицирани правилно като бременности без Y.

** Други цитогенетични резултати са XXXXX и XXYY.

Положителна предиктивна стойност и отрицателна предиктивна стойност на VeriSeq NIPT Solution v2

Положителната предиктивна стойност (PPV) и отрицателната предиктивна стойност (NPV) на теста предоставят информация относно способността на теста да информира за клинични решения въз основа на чувствителността на теста, специфичността и предварителната вероятност, че плодът е засегнат от тризомия (разпространение). Тъй като PPV и NPV зависят от разпространението, а разпространението на тези анеуплоидии може да варира в различните популации от субекти, PPV и NPV са изчислени за диапазон от вероятни стойности на разпространението въз основа на стойностите на чувствителност и специфичност, наблюдавани при основния скрининг (без известни мозайки) в проучването за клинична точност. Таблица 17 се основава на пълногеномния скрининг (без известни мозайки).

Таблица 14 Разпространение на тризомия 21, PPV и NPV при основния скрининг (с изключение на известните мозайки)

Разпространение (%)	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

Таблица 15 Разпространение на тризомия 18, PPV и NPV при основния скрининг (с изключение на известните мозайки)

Разпространение (%)	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

Таблица 16 Разпространение на тризомия 13, PPV и NPV при основния скрининг (с изключение на известните мозайки)

Разпространение (%)	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

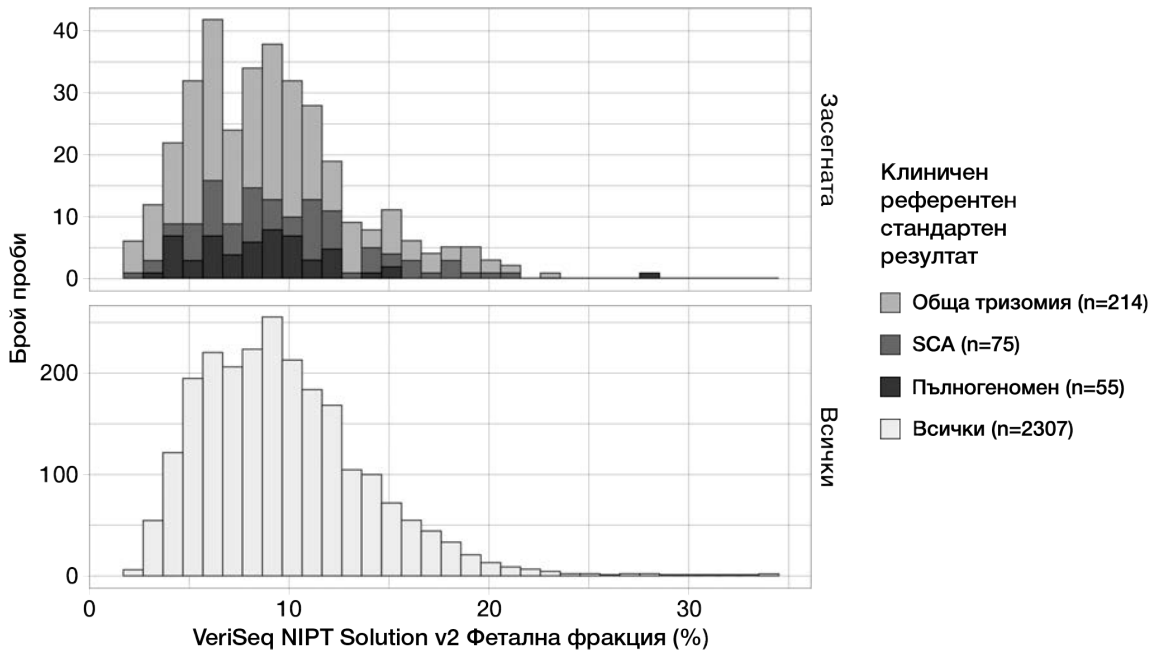
Таблица 17 Разпространение на всички аномалии, PPV и NPV при пълногеномния скрининг (включително известните мозайки)

Разпространение (%)	PPV (%)	NPV (%)
0,01	1,42	> 99,99
0,02	2,81	> 99,99
0,05	6,74	> 99,99
0,10	12,64	> 99,99
0,20	22,45	99,99
0,50	42,07	99,98
1,00	59,34	99,95
1,50	68,75	99,93
2,00	74,68	99,91

Разпределение на феталната фракция

Разпределението на оценките на VeriSeq NIPT Solution v2 за феталната фракция (FF) от пълногеномния скрининг с мозайки е показано по категории резултати на Клиничния референтен стандарт на [Фигура 1](#).

Фигура 1 Разпределение на феталната фракция



При 5 проби бяха установени аномалии в няколко категории.
Общата тризомия включва проби с тризомия 21, 18 и/или 13.
Пълногеномното изследване включва проби с RAA или частични делеции и/или дупликации.

Оценките на FF варират от 2% до 34% като цяло със средна стойност 9% и интерквартилен (IQ) диапазон от 6% до 12%. Средната оценка на FF за често срещани тризомии и събития, открити чрез пълногеномния скрининг, е 8%, а за SCA – 9%. Диапазонът на оценките на FF е постоянен за всички резултати. Не се наблюдава видима промяна в разпределението на FF сред често срещаните тризомии, SCA, събитията, открити чрез пълногеномния скрининг, или всички проби в пълногеномния анализ.

Изпълнение при двуплодна бременност

Оценка на тризомия 13, 18 и 21 и на Y хромозома при двуплодна бременност

Поради ниската честота на тризомия 21, 18 и 13 при двуплодна бременност за клиничното проучване бяха налични само малък брой засегнати проби от близнаци. За да се оцени ефективността на VeriSeq NIPT Solution v2 при двуплодни бременности, бяха използвани *in silico* модели, основани на наблюденията от клинични проби, за да се симулират популации от двуплодни бременности. Тази симулация съответства на популацията за определена употреба. Разпределението на феталната фракция е определено от около 4500 проби от близнаци и е сравнено с разпределението от около 120 000 едношаблонни проби. Разпределението на феталната фракция в зависимост от състоянието на анеуплоидията е определено от предполагаеми едношаблонни отговори (1044 тризомии 21, 307 тризомии 18 и 192 тризомии 13). Комбинирането на двете разпределения позволи да се направят изводи за откриване на анеуплоидии при близнаци. Симулирани са набори от двуйайчни и еднояйчни близнаци, а

за оценка на чувствителността е взета среднопретеглена стойност, която отразява преобладаващото им разпространение в популацията, за която е предназначена употребата (2 двуййчни: 1 еднoййчен). За да се постигне специфичност, са симулирани набори от незасегнати близнаци.

Фракцията на всяка симулирана проба, засегната от тризомия (т.е. засегнатата фракция), се изчисли по различен начин за всяка категория проби:

- За еднoййчни близнаци засегнатата част от всяка проба се определи на 1,0, тъй като в този случай тризомията засяга и двамата близнаци.
- За двуййчните близнаци се приема, че е засегнат само единият близнак (изключително рядко се случва и двамата двуййчни близнаци да са засегнати). Стойностите на засегнатите фракции са симулирани, като е използвано известното разпределение на съотношенията на феталните фракции, определени от несъвместими по пол клинични проби от близнаци. Възприе се консервативен подход, при който се приема, че засегнатият близнак винаги има най-ниската фетална фракция от двата близнака. Приложи се корекционен коефициент за това, че феталните фракции са средно по-ниски при бременности с тризомия 13 и 18.
- За незасегнатите близнаци засегнатата част от всяка проба е равна на нула.

За близнаци, засегнати от тризомия 18 или 13, феталната фракция, съответстваща на засегнатата фракция от пробата, е намалена. Намалението е пропорционално на средното намаление на феталната фракция, наблюдавано в клиничните данни при едноплодни деца с тризомия 18 или 13 в сравнение с едноплодни деца с еуплоидия.

Както общата фетална фракция, така и засегнатата фракция на всяка симулирана проба са използвани за изчисляване на резултата за анеуплоидия чрез стандартния алгоритъм на VeriSeq NIPT Solution v2. Чувствителността е изчислена чрез определяне колко често резултатите от анеуплоидията за симулираните засегнати близнаци надвишават съответната граница на анеуплоидията. Съответно, специфичността е изчислена чрез определяне колко често резултатите за анеуплоидия за симулираните незасегнати близнаци са под съответната граница за анеуплоидия ([Таблица 18](#)). 95% доверителни интервали са изчислени въз основа на броя на реалните клинични проби от близнаци в оригиналния набор от данни, които са класифицирани като засегнати или незасегнати от съответната тризомия.

За да се оцени чувствителността на Y хромозомата в проби от близнаци, са симулирани набори от близнаци XY/XY и XX/XY. Взета е среднопретеглена стойност, представляваща преобладаващото им разпространение в популацията, за която е предназначено изследването (1 XY/XY: 1 XX/XY). За да се оцени специфичността на Y хромозомата при близнаци, е симулиран набор от близнаци XX/XX. Общите стойности на феталната фракция са симулирани в съответствие с известното разпределение на феталната фракция в клиничните проби от близнаци.

За близнаците XY/XY и XX/XY, съответните резултати на Y хромозомата са оценени чрез използване на известната връзка между феталната фракция и резултатите на Y хромозомата в клиничните едноплодни проби, класифицирани като мъжки. Само за близнаци XX/XY, стойностите на засегнатата (т.е. мъжка) фетална фракция са симулирани чрез използване на известното разпределение на съотношенията на феталните фракции, наблюдавани между близнаци от една и съща бременност, както е определено от

клинични проби на близнаци с различен пол. Възприе се консервативен подход, при който засегнатата фракция се избира така, че да съответства на по-малкия от двамата близнаци. За всяка симулирана XX/XY проба резултатът на Y хромозомата се умножава по засегнатата фракция.

За близнаци XX/XX резултатите за Y хромозомата са взети от резултатите, наблюдавани в клиничните проби на еднородни близнаци, класифицирани като женски. След което резултатът на Y хромозомата и общата фетална фракция се използват за класифициране на всяка симулирана проба като наличие или отсъствие на Y хромозома, като се използва стандартният алгоритъм VeriSeq NIPT Solution v2.

Чувствителността се изчислява като се определя колко често симулираните близнаци XY/XY или XX/XY са правилно класифицирани като такива с Y хромозома. Специфичността се изчислява като се определя колко често симулираните близнаци XX/XX са правилно класифицирани като такива без Y хромозома. 95% доверителни интервали са изчислени въз основа на броя на реалните клинични проби от близнаци в оригиналния набор от данни, класифицирани като съдържащи или не Y хромозома.

Таблица 18 Очаквания за тризомия 21, 18 и 13 в симулирана популация от бременности с близнаци

	Тризомия 21	Тризомия 18	Тризомия 13	Наличие на Y
Чувствителност	96,4%	95,7%	93,6%	> 99,9%
Двустранно 95% CI	(86,4%, 98,9%)	(68,3%, 99,4%)	(64,1%, 98,9%)	(99,9%, > 99,9%)
Специфичност	99,9%	> 99,9%	> 99,9%	> 99,9%
Двустранно 95% CI	(99,8%, > 99,9%)	(99,9%, > 99,9%)	(99,9%, > 99,9%)	(99,7%, > 99,9%)

Таблица 18 предоставя точкови оценки и приблизителни 95% доверителни интервали за чувствителността и специфичността на VeriSeq NIPT Solution v2 за откриване на тризомия 21, 18, 13 и наличие на Y в симулирана популация от двуплодни бременности, съответстваща на популацията за използване по предназначение. Доверителните интервали са изчислени въз основа на броя на клиничните проби от близнаци, преминали качествен контрол, класифицирани като засегнати или незасегнати от съответната тризомия. При изчисляването на чувствителността се приема, че две трети от засегнатите двуплодни бременности са дизиготни с един засегнат близнак, а една трета от засегнатите двуплодни бременности са монозиготни с два засегнати близнака.

Оценките, посочени в Таблица 18, се отнасят само за двуплодни бременности. Поради още по-слабото разпространение, данните за бременности от по-висок порядък (тризнаци или повече) са недостатъчни за създаване на подходящи статистически модели за оценка на точността на откриване на анеуплоидии.

Аналитично представяне

Прецизност

За да се оцени и определи количествено прецизността на анализа, се извърши повторен анализ на данните с помощта на софтуера за анализ VeriSeq NIPT Solution v2 от две предишни проучвания от VeriSeq NIPT Solution:

- Проучване на възпроизводимостта на много места, което включва три опита от трима оператори на три места, като се използва една партида реагент за общо девет опита.
- Проучване за прецизност в лабораторни условия, което включва 12 опита на едно място, използвайки два ML STAR, две системи инструменти за секвениране и три партиди реагенти за секвениране.

Целта на проучването на прецизността е да се определи количествено прецизността на анализа по отношение на тризомия 21 (T21) и Y хромозома и да се оцени променливостта между различните инструменти, комплекти за подготовка на библиотеки и партиди реагенти за секвениране.

Пулът от 5% фетална фракция T21 е създаден чрез комбиниране на cfDNA, извлечена от майчина плазма от бременни жени (със засегнат от T21 плод), и cfDNA, извлечена от плазма от небременни жени. Създаден е също и пул от 10% майчина-мъжка cfDNA фетална фракция (XY фетус). Панелът от проби за всяко проучване за всеки цикъл включва 4 копия от засегнатия пул от проби от 5% фетална фракция T21 и 20 копия от пула от 10% фетална фракция от майчина и мъжка cfDNA. Тестовете са проведени в продължение на 10 дни, като общо за двете проучвания са направени 21 тестувания.

T21 и наличието на Y хромозома бяха избрани за оценка въз основа на представителността на клиничните състояния и сложността на откриването на аномалии. Тъй като е най-малката човешка автосома, размерът на хромозома 21 оказва пряко влияние върху чувствителността на откриването на T21, особено при ниски стойности на феталната фракция, каквито са използваните в това проучване. Y хромозомата, налична в майчината плазма, е изключително фетална по произход и следователно е лесно откриваема за анализа.

Наблюдаваните средни стойности и стандартни отклонения за показателя LLR на хромозома 21 и нормализираните хромозомни стойности на хромозома Y (NCV) показваха, че стандартното отклонение (SD) на копията е най-големият източник на променливост. Вариациите между обектите, инструментите и партидите реагенти добавят незначителна част от променливостта, както се вижда от разликата между общото стандартно отклонение (SD) и SD на копията в [Таблица 19](#) и [Таблица 20](#).

Таблица 19 Обобщение на Стандартното отклонение (SD) на отговора при многосайтово (възпроизводимост) секвениране

Отговор	N	Средна стойност	Репликиране на SD	Обща възпроизводимост SD*
Резултат за хромозома 21 LLR	36	34,43	11,36	11,36
Y хромозома NCV	180	190,56	7,96	10,20

* Общата стойност включва променливостта, дължаща се на сайта, оператора, изпълнението, деня и повторението.

Таблица 20 Обобщение на прецизността на отговора на секвенирането в рамките на лабораторията

Отговор	N	Средна стойност	Репликиране на SD	Общо SD* в рамките на лабораторията
Резултат за хромозома 21 LLR	48	36,01	9,07	10,25
Y хромозома NCV	240	198,68	7,63	7,82

* Общата стойност включва променливостта, дължаща се на инструмента, партидата на реагента, изпълнението, деня и повторението.

Извършено е допълнително проучване за сравняване на прецизността на секвенирането на VeriSeq NIPT Solution v2 (общо стандартно отклонение) при използване на версия 2.0 на поточната клетка спрямо версия 2.5. Проучването включва два вида поточни клетки (v2.0 и v2.5), три партиди комплекти за секвениране, четири системи инструменти и две секвенирания на комбинация с общо 48 изпълнения на едно място. Един пул за секвениране е подготвен от плаки със cfDNA, приготвени ръчно. Панелът от проби включва 4 копия от засегнатия пул от проби от 5% фетална фракция T21 и 20 копия от пула от 10% фетална фракция от майчина и мъжка cfDNA (XY фетус). Резултатите от проучването са представени в Таблица 21 и потвърждават, че няма разлика в прецизността на секвенирането при използване на поточна клетка v2.0 в сравнение с поточна клетка v2.5.

Таблица 21 Обобщение на прецизността на отговора на секвенирането на поточна клетка v2.0 спрямо поточна клетка v2.5

Отговор	Брой наблюдения на версия	v2.0 Общо SD*	v2.5 Общо SD*	Статистически резултат**
Резултат за хромозома 21 LLR	96	9,56	8,44	Статистически еквивалент (p-стойност = 0,25)
Y хромозома NCV	480	7,74	7,38	Статистически еквивалент (p-стойност = 0,38)

* Общата стойност включва променливостта, дължаща се на инструмента, партидата на реагента, изпълнението, деня и копието.

** Въз основа на F-тест за равенство на дисперсиите (стандартни отклонения, повдигнати на квадрат).

Кръстосано замърсяване

Направена е оценка на кръстосаното замърсяване в работния процес за подготовка на пробата на VeriSeq NIPT Solution. Плазмените пулове от небременни жени (XX) и възрастни мъже (XY) са тествани в шахматен модел в 96-ямова плака във форма от 4 плаки. N = по 48 женски и мъжки проби на плака, общо 192 женски и 192 мъжки проби. Нито една от женските проби не показва покритие на Y хромозома, което да е статистически по-високо от оценения фон, което показва, че няма кръстосано замърсяване от мъжки проби в една и съща плака. Не се открива кръстосано замърсяване при VeriSeq NIPT Solution.

Потенциално смущаващи вещества

Въздействието на потенциално смущаващи вещества е оценено за VeriSeq NIPT Solution чрез оценка на ефективността на анализа в присъствието на такива вещества.

Албумин, билирубин, хемоглобин и триглицериди (ендогенни) от незасегнати женски бременности (XX плод) са добавени в майчини плазмени пулове. Те са тествани при две концентрации за всяко изпитвано вещество (n = 16 за всяко). Не се наблюдава намеса в изпълнението на анализа.

Таблица 22 Потенциално смущаващи вещества (ендогенни)

Тестови субстанции	Ниска тестова концентрация (mg/mL)	Висока тестова концентрация (mg/mL)
Албумин	35	50
Билирубин	0,01	0,15
Хемоглобин	100	200
Триглицериди	1,5	5

Естествената майчина геномна ДНК (gDNA) в плазмата също може потенциално да повлияе на резултатите от анализа, тъй като тя може да бъде извлечена заедно с феталната cfDNA. Геномни нива на ДНК при 1,6, 3,3 и 4,9 ng на проба (съответстващи на 1, 2 и 3 стандартни отклонения над средната очаквана концентрация на gDNA след 7 дни съхранение на цяла кръв¹²) се добавят към cfDNA, извлечена от майчината плазма от незасегнатата женска бременност (XX плод). След това пробите са тествани във VeriSeq NIPT Solution (n = 16 за всяка концентрация) Не се наблюдава намеса в изпълнението на анализа при наличието на високи нива на gDNA.

Двадесет лекарствено-базирани потенциално интерфериращи вещества (екзогенни), често използвани или предписвани по време на бременност, са тествани съгласно EP7-A2 (Тестване на интерференция в клиничната химия; Одобрено ръководство – второ издание). 20-те потенциални интерференции са комбинирани в четири пула, добавени в майчината плазма от незасегнатата женска бременност (XX плод) и тествани във VeriSeq NIPT Solution (N = 16 за всеки пул). Не се наблюдава намеса в изпълнението на анализа при наличието на тези екзогенни субстанции.

Таблица 23 Потенциално интерфериращи вещества (екзогенни)

Пул 1	Пул 2	Пул 3	Пул 4
Ацетаминофен	Дифенилхидрамин	Албутерол	Цетиризин
Ацетилцистеин	Еритромицин	Бупропион	Декстрометорфан
Бисопролол	Гуайфенезин	Кофеин	L-аскорбинова киселина
Циталопрам	Хепарин	Сертралин	Метопролол
Деслоратадин	Лидокаин	Натриев флуорид	Надолол

Граница на откриване

Границата на откриване (LOD) се определя като ниво на феталната фракция, което съответства на 95% вероятност за откриване на състоянието, което представлява интерес, като например T21. За да се оцени LOD на VeriSeq NIPT Solution v2 за различни често срещани състояния, бяха проведени проучвания и статистически анализи.

Вероятността за откриване на представляващо интерес състояние в засегната проба, обработена с VeriSeq NIPT Solution v2, зависи основно от три фактора:

- фетална фракция
- дълбочина на секвениране
- размер и сложност на представляващия интерес геномен регион.

Ако приемем, че дълбочината на секвениране е постоянна, дадена аберация се открива по-лесно в проба с по-висок процент фетална фракция, отколкото в проба с по-нисък процент фетална фракция. Обратно, ако приемем, че феталната фракция е постоянна, дадена аберация се открива по-лесно в проба с по-голяма дълбочина на секвениране, отколкото в проба с по-малка дълбочина на секвениране. И накрая, аберациите в по-малки или по-сложни геномни региони са по-трудни за откриване, отколкото аберациите в по-големи или по-малко сложни геномни региони, ако се приеме, че има постоянна фетална фракция и дълбочина на секвениране.

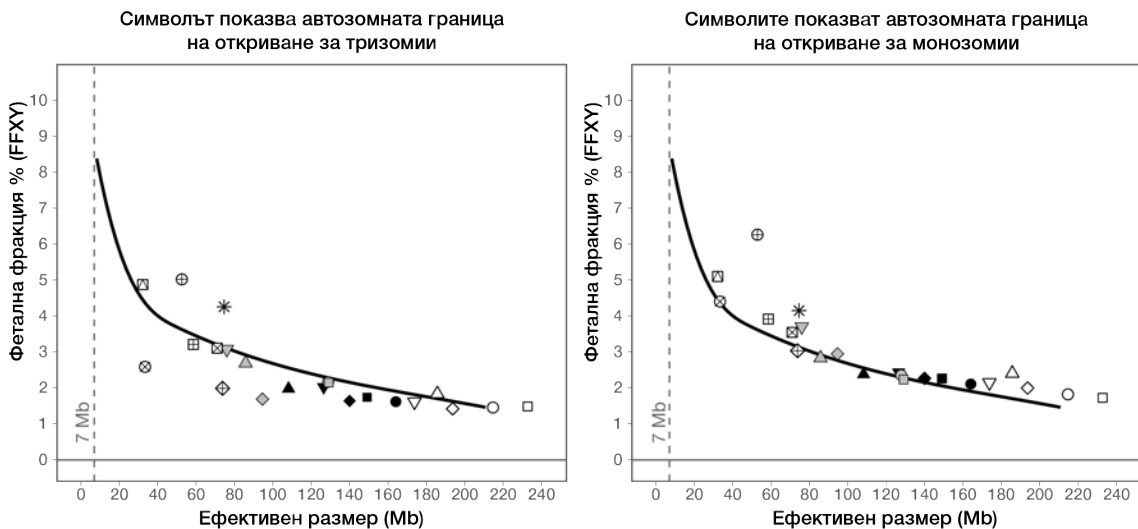
За да се определи LOD за откриване на T21, са анализирани проби, включващи смеси от пулирани проби с T21 и пулирани незасегнати проби. Двата вида анализ се смесват в серия от титрувания, за да се създаде набор от седем нива на фетална фракция (0, 2, 3, 4, 5, 6 и 10%). Всяко ниво е представено от общо 10 повторения.

За да се повиши допълнително разделителната способност на решетката на феталната фракция на LOD-анализа, данните от това проучване са допълнени с данни, получени от разреждане *in silico*. Резултатите от експерименталното разреждане и титруване са симулирани чрез контролирано смесване на данните от секвенирането. Данните от това *in silico* титруване обхващат набор от 14 нива на фетална фракция (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 и 4,50%) с 32 повторения за всяко ниво. Към получените данни е приложен пробит анализ, за да се определи границата на откриване (LOD) за T21.

Отделно е разработен статистически модел, използващ фетална фракция, дълбочина на секвениране и геномен размер/сложност, за да се предвиди вероятността за откриване на всяка аберация във всяка проба. Този модел е създаден въз основа на данните, съответстващи на набор от 1405 XY-проби. LOD за T21, както е предсказана от този модел, е определена като съответстваща на оценката, базирана на пробит анализа, описан по-горе. Този статистически модел е използван за оценка на стойностите на LOD за анеуплоидиите на всички автозоми и за частичните делеции и дупликации.

[Фигура 2](#) показва 95% вероятност за откриване на средни региони по размер и автозомните граници на откриване за всички тризомии и всички монозомии.

Фигура 2 95% вероятност за откриване на средни региони по размер за VeriSeq NIPT Solution v2



Chr	Символ	Тризомия		Монозомия	
		Отсечка за LLR	LoD (%)	Отсечка за 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	Символ	Тризомия		Монозомия	
		Отсечка за LLR	LoD (%)	Отсечка за 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

Отстраняване на неизправности

Отстраняване на неизправности при VeriSeq NIPT Solution v2

Режим на неизправност	Възможен резултат	Тълкуване	Препоръчително действие	Забележки
Недостатъчно количество входяща плазма	Пробата не преминава качествения контрол	Недостатъчен обем на плазмата.	Повторно вземане.	Въз основа на визуална проверка на обема на плазмата.
Повредена епруветка за кръв	Кръвта не се разделя на слоеве	Пробата не е центрофугирана.	Уверете се, че центрофугата е стартирала и епруветката е завъртяна с правилната сила. Вземете пробата отново.	
		Неправилно съхранение или транспортиране на пробата (хемолиза на пробата).	Вземете пробата отново.	Замразените проби не се сепарират. Неподходящите условия за транспортиране или съхранение могат да доведат до хемолиза на пробите.

Режим на неизправност	Възможен резултат	Тълкуване	Препоръчително действие	Забележки
Запушване на пробата или бавен поток	Замърсяване на плазмата	Отделни проби могат да запушат свързващата плака, ако плазмената проба е значително замърсена.	Прегледайте пробата. Ако останалата плазма в епруветката е червена или млечна, анулирайте пробата и поискайте повторно вземане. Ако пробата изглежда нормална, тествайте я отново.	
	Препълване на пробата	Неадекватна визуална проверка на всяка епруветка за годност на пробата.	Обявете за невалидни всички проби в засегнатите от преливането близки ямки.	Може да посочва, че пробите са транспортирани или съхранявани неправилно преди обработка. Изключете неподходящите проби от обработката.
	Неправилно функциониране на хардуера	Недостатъчно разграждане на материала по време на извличането.	Повторете тестването на пробата. Ако проблемът продължава да съществува в ямка с други проби, свържете се с техническата поддръжка на Illumina.	

Режим на неизправност	Възможен резултат	Тълкуване	Препоръчително действие	Забележки
Неуспешен анализ за качествен контрол на индивидуални проби	Неуспешен качествен контрол на секвенирането	Възможните причини са следните: <ul style="list-style-type: none"> • Недостатъчно входящи генетични данни • Неправилно прехвърляне при обработка на пробите • Грешка в реагента при секвениране 	Проверете анотацията на пробата. Проверете за подобни резултати при предишни проби в съответното положение на плаката. Повторете тестването на пробата.	Показва или недостатъчно въвеждане на пробата, или грешно прехвърляне на ML STAR. Недостатъчното количество генетичен материал може да се дължи на недостатъчно количество безклетъчна ДНК в плазмата или ДНК на клетъчна основа, което води до прекомерно разреждане на пробата за секвениране.
	Нисък брой на FF или неизключени обекти (NES)	Генерирани са недостатъчно данни за изготвяне на точни отчети.	Повторно тестване от плазма.	

Режим на неизправност	Възможен резултат	Тълкуване	Препоръчително действие	Забележки
Неуспешно количествено определяне на качествения контрол	Неуспешно изпълняване за количествено определяне. Медиана на партидите под минимума	Недостатъчна производителност на процеса.	Повторете количествения анализ. Ако повторението е неуспешно, свържете се с техническата поддръжка на Illumina.	Непреминаващи стандартни измервания на крива посочват или проблеми с приготвянето на библиотека (т.е. използване на небιологичен клас етанол), или проблеми с процеса за количествено определяне.
	Неуспешно изпълняване за количествено определяне	Неуспех при стандартната крива.	Повторете количествения анализ. Ако повторението е неуспешно, свържете се с техническата поддръжка на Illumina.	
Неуспешно обединяване	Неуспешно завършване на обединяването на пробите	Анализът на обединяването не може да изчисли правилните обеми на пула.	Направете преоценка на целевата концентрация на пула. Изпълнете повторно анализа за обединяване.	

Отстраняване на неизправности в микролабораторията VeriSeq NIPT Microlab STAR

Стъпка на процеса	Код за грешка	Диалог за грешки	Описание	Резолюция на потребителя
Създаване на партиди	EM0044	Въведеният идентификатор на партидата съдържа забранени символи.	VeriSeq NIPT Solution v2 приема само цифри, букви, долни тирета и тирета за всички полета с данни.	Преименувайте партидата, като използвате име, което не съдържа специални символи.
Създаване на партиди	EM0051	Дължината на идентификатора на партидата надвишава 36 знака.	VeriSeq NIPT Solution v2 ограничава дължината на имената на партидите до 36 знака или по-малко.	Преименувайте партидата, като използвате наименование, съдържащо по-малко от 36 знака.

Стъпка на процеса	Код за грешка	Диалог за грешки	Описание	Резолуция на потребителя
Създаване на партиди	EM0076	Невъзможност за свързване с VeriSeq Onsite Server v2.	VeriSeq Onsite Server v2 не отговаря на заявките за данни от мениджъра на работния процес (Workflow Manager).	<ol style="list-style-type: none"> 1. Уверете се, че ML STAR е свързан към мрежата. 2. Уверете се, че VeriSeq Onsite Server v2 е включен. 3. Уверете се, че ML STAR може да се свърже с VeriSeq Onsite Server v2 (чрез заявка за ping). 4. Проверете бутилката за отпадъци за вакуум. Ако бутилката за отпадъци е пълна на повече от половината, изпразнете бутилката за отпадъци. 5. Ако предходните стъпки не решат проблема, свържете се с отдела за техническа поддръжка на Illumina.
Създаване на партиди	EM0118	Тази партида е неуспешна и не може да бъде обработвана по-нататък.	Посочената партида вече е била неуспешна и не може да бъде обработвана по-нататък.	Записът на партидата във VeriSeq Onsite Server v2 показва, че избраната партида е неуспешна. Не се разрешава допълнителна обработка. Създайте друга партида с желаните проби.
Създаване на партиди	Не е приложимо	Обработката на тази партида вече е приключила. Искате ли да извършите повторно пулиране?	Посочената партида е обработена чрез обединяване. Единствената допустима обработка е повторно пулиране.	Обединете повторно, както следва. <ul style="list-style-type: none"> • Изберете Re-Pool (Повторно обединяване). • Прекратете метода и се уверете, че името на партидата е правилно преди повторно обединяване.

Стъпка на процеса	Код за грешка	Диалог за грешки	Описание	Резолуция на потребителя
Изолиране на плазма	WP0087	Заредени са дублиращи се баркодове на проби.	В системата са заредени проби с идентични баркодове.	<ol style="list-style-type: none"> Следвайте указанията на мениджъра на работния процес (Workflow Manager), за да определите кои проби са дублирани. Извадете дублиращите се и ги преетикетирате или заменете. Презаредете пробите.
Изолиране на плазма	EP0102	Пробите, посочени в листа с проби, не са били заредени.	Пробите, включени в листа с проби, не са включени в заредените баркодове.	<ol style="list-style-type: none"> Следвайте указанията на мениджъра на работния процес (Workflow Manager), за да идентифицирате липсващите проби. Направете една от следните опции: <ul style="list-style-type: none"> • Добавете липсващите проби към партидата и заредете повторно пробите. • Прекъснете метода, променете бланката за проби, ако е необходимо. Рестартирайте метода.
Зареждане на плаки	Не е приложимо	Грешка в маската на баркода на Venus (Venus Barcode Mask Error).	Мениджърът на работния процес (Workflow Manager) налага правилно свързване на плаката с партидата, като използва маски за баркод на Venus.	<ol style="list-style-type: none"> Проверете разположението на плаките, за да потвърдите, че подреждането на плаките е правилно. Уверете се, че заредената плака е правилната плака за посочената партида.

Стъпка на процеса	Код за грешка	Диалог за грешки	Описание	Резолуция на потребителя
Екстракция на cfDNA	WE0150	Налягането във вакуумната камера е твърде ниско.	Мениджърът на работния процес (Workflow Manager) няма да продължи работа, ако налягането на вакуумната линия в покой е < 400 Torr.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Проверете за прегъвания или други препятствия във вакуумната линия. 2. Отворете скобите за освобождаване на линията за отпадъци, изчакайте да се освободи налягането и след това затворете напълно скобите за освобождаване на линията. 3. Уверете се, че вакуумният контролер и помпата са включени. 4. Ако проблемът продължава, се свържете с техническата поддръжка на Illumina.
Екстракция на cfDNA	WE0153	Налягането във вакуумната камера е твърде високо.	Ако измереното вакуумно налягане е твърде високо преди стартиране на контрола на налягането, системата може да е неизправна.	Уверете се, че всички вакуумни връзки и линии от задната страна на контролера са добре фиксирани.

Стъпка на процеса	Код за грешка	Диалог за грешки	Описание	Резолуция на потребителя
Екстракция на cfDNA	WE0996	Вакуумът не успява да се запечата.	Повреденото запечатване трябва да се коригира, преди да продължите.	<p>Уверете се, че повредата на запечатването е коригирана, преди да изберете OK.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Уверете се, че свързващата плака е на едно ниво с вакуумния колектор. С облечена в ръкавица ръка натиснете със сила свързващата плака. 2. Слушайте за звука от вакуума и следете потока на водата през плаката за свързване. 3. Отворете изгледа за проследяване на мениджъра на работния процес. След като действително отчетеното налягане достигне поне 50 единици за налягане по-малко от околното отчитане, изберете OK, за да продължите с екстрахирането на cfDNA. 4. Ако желаното отчитане на налягане не бъде достигнато в отделеното време, изберете OK, за да продължите с първото зареждане на лизат. 5. Паузирайте метода, след като лизатът бъде отделен на плаката за свързване. Поставете повторно със сила плаката за свързване. 6. Ако лизатът не премине през плаката, свържете се с отдела за техническа поддръжка на Illumina.

Стъпка на процеса	Код за грешка	Диалог за грешки	Описание	Резолуция на потребителя
Екстракция на cfDNA	WM0219	Ако вакуумът е включен, отпуснете помпата ръчно.	Вакуумът може да остане включен след прекъсване на метода по време на екстракция.	1. За да изключите вакуума, натиснете бутона Power (Захранване) на вакуумния контролер. 2. Изчакайте 10 секунди и след това натиснете отново бутона Power (Захранване), за да включите вакуума.
Екстракция на cfDNA	EE0477	При преместването на плака е възникнала грешка. (iSWAP error).	Ако се появи грешка iSWAP (изпускане на плака, неуспешно вдигане и т. н.), системата ви подканва за ръчно преместване на плаката.	Уверете се, че плаката може да бъде възстановена (няма разпилян материал). <ul style="list-style-type: none"> Ако плаката не може да бъде възстановена, прекратете изпълняването. Ако плаката може да се възстанови, следвайте показаните инструкции, за да извършите ръчно прехвърляне на плаката.
Екстракция на cfDNA	EE0519	Сканираният баркод не съвпада с баркода на свързващата плака в записа.	Заредената свързваща плака не съвпада с баркода на извадената плака.	Уверете се, че заредената плака съответства на записания баркод (вижте дневника за проследяване за очаквания баркод).

Стъпка на процеса	Код за грешка	Диалог за грешки	Описание	Резолуция на потребителя
API	EA0372	Невъзможно е да се свържете със сървъра за данни.	VeriSeq Onsite Server v2 не отговаря на заявките за данни от мениджъра на работния процес (Workflow Manager).	<ol style="list-style-type: none"> 1. Уверете се, че ML STAR е свързан към мрежата. 2. Уверете се, че VeriSeq Onsite Server v2 е включен. 3. Уверете се, че ML STAR може да се свърже с VeriSeq Onsite Server v2 (чрез заявка за ping).
	EA0774	Грешка при свързване. Връзката със сървъра на API не успя да се потвърди.	VeriSeq Onsite Server v2 е спрял да отговаря на заявките за данни от мениджъра на работния процес (Workflow Manager).	<p>Уверете се, че:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Уверете се, че ML STAR е свързан към мрежата. 2. Уверете се, че ML STAR може да се свърже с VeriSeq Onsite Server v2 (чрез заявка за ping). 3. Уверете се, че VeriSeq Onsite Server v2 е включен.
	EA0780	403: Невалидна заявка Текущата трансакция не е валидна.	Изпратените данни нарушават логиката на работния процес на системата.	За повече информация вижте подробностите за грешката. Често срещаните причини са твърде дълги входящи данни или такива, които нарушават списъка с допустими знаци.

Литература

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

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

Хронология на редакциите

Документ	Дата	Описание на промяната
Документ № 1000000078751 v08	Август 2022 г.	Актуализирайте номера на част на работния процес Премахната инструкция за пипетиране за смесване, ако плаката с библиотеки е замразявана.
Документ № 1000000078751 v07	Май 2022 г.	Разделете ограниченията на процедурата в отчитането на VeriSeq NIPT Solution v2 и включете първите две точки. Останалият текст в нов хедер с ограничения на анализа. Премахнато <ul style="list-style-type: none"> • VeriSeq от всички етикети на реагент. • Поставете баркод на плаката към адаптерната плака VeriSeq NIPT в приготвянето на библиотеки. Добавено <ul style="list-style-type: none"> • Думата сертифицирана вода без DNase/RNase • Един от следните четци за микроплаки или еквивалент и SpectraMax M2, M3, M4, M5 и бележка. • Към раздела VeriSeq NIPT Microlab STAR за обясняване на това какво да се прави при събитие за обработка на грешка. • Бележка за визуален преглед на ямките. • Инструкции за партиди с 24 и 48 проби по време на разделите на протокола. • Стъпки за това кога да се използва лилавата адаптерна плака или еквивалент. • Уведомления за раздела за демографски данни и характеристики на бременност за включване на резултати от бременност за първо тримесечие. • Точка за спецификациите на плаката с дълбоки ямки за включване на устойчивост на въртене. Актуализирано

Документ	Дата	Описание на промяната
		<ul style="list-style-type: none">• Уведомления за уникални партидни номера за яснота и включване на пример.• Символи и форматиране за бележки, уведомления за внимание и предупреждения.• Резултати от подточките за тест.• Гуанидин тиоцианат към гуанидин хидрохлорид.• CVS към BVS (базова вакуумна система).• Уведомления за използване на скрининг в целия геном и LLR резултат.• Спецификации: спецификации на вана с реагент, плаки с дълбоки ямки, плаки с 384 ямки, плаки с 96 ямки.
Документ № 1000000078751 v06	Август 2021 г.	Актуализиран адрес на упълномощен представител на ЕС.

Документ	Дата	Описание на промяната
Документ № 1000000078751 v05	Декември 2020 г.	<p>Актуализирани са разделите "Принципи на процедурата", "Предупреждения и предпазни мерки" и "Етикетиране на продукта" с допълнителни разяснения в изпълнение на изискванията на регулаторните органи.</p> <p>Незначителни актуализации на съдържанието на протокола, за да съответства на актуалния стил и организация на Illumina.</p> <p>Коригирано е описанието на хромозома 21 като "втората най-малка човешка автозома" на "най-малката човешка автозома" в раздела за прецизност на аналитичните резултати.</p> <p>Добавени са предупредителни изречения за неправилно използване на резервоари и рискове от сливане на проби в разделите "Подготовка на изолирана плазма" и "Тълкуване на резултатите".</p> <p>Добавени са нови номера на сървъри и софтуерни части за пускането на нови модели сървъри и актуализации на номера на софтуерни части.</p> <p>Добавени са предупреждения към протокола и информация за отстраняване на неизправности за справяне и предотвратяване на препълване на пробата.</p> <p>Актуализирани активни съставки в стандарта на реагента за количествено определяне на ДНК в кутията за принадлежности, за да се приведе в съответствие с Информационния лист за безопасност.</p> <p>Актуализирани конвенции за именуване на модула Local Run Manager VeriSeq NIPT за съгласуваност с другата документация.</p> <p>Добавена хронология на редакциите.</p>
Документ № 1000000078751 v04	Октомври 2020 г.	Незначителни корекции.
Документ № 1000000078751 v03	Септември 2020 г.	Актуализиран е списъкът с материали, за да се представят спецификациите на лабораторното оборудване заедно с известните съвместими опции.

Документ	Дата	Описание на промяната
Документ № 1000000078751 v02	Февруари 2020 г.	<p>Актуализирано представяне на информацията за клиничните резултати, за да се представят по-добре разликите между основните и пълногеномните видове скрининги.</p> <p>Добавени са нови разлики в раздела за ефективността на основния и пълногеномния скрининг.</p> <p>Премахната е противоречивата информация за незадължителността на допълнителния доклад от раздела "Принципи на процедурата".</p> <p>Актуализирана е конвенцията за именуване на софтуера VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 в целия документ за стилистична последователност.</p> <p>Актуализирано е етикетирането на адресите на Австралия и Illumina Нидерландия, за да се отразят последните промени.</p>
Документ № 1000000078751 v01	Август 2019 г.	Премахната е дублираща се стъпка в "Екстракция на cfDNA", причинена от софтуерна грешка при публикуване.
Документ № 1000000078751 v00	Май 2019 г.	Първоначална версия.

Патенти и търговски марки

Настоящият документ и съдържанието му са собственост на Illumina, Inc. и нейните филиали („Illumina“) и са предназначени само за употреба по силата на договор от страна на клиента и във връзка с използването на продукта(ите), описан(и) в настоящия документ, и с никаква друга цел. Този документ и съдържанието му не трябва да се използват или разпространяват за никаква друга цел и/или по друг начин да бъдат съобщавани, разкривани или възпроизведени по какъвто и да е начин без предварителното писмено съгласие от страна на Illumina. Illumina не предоставя посредством този документ никакъв лиценз за свой патент, търговска марка, авторско право или права по силата на общото право, нито подобни права на която и да е трета страна.

Инструкциите в този документ трябва да се следват строго и изрично от страна на квалифициран и правилно обучен персонал, за да се гарантират правилната и безопасната употреба на продукта(ите), описан(и) в настоящия документ. Цялото съдържание на този документ трябва да бъде прочетено и разбрано напълно, преди да се използва(т) такъв(такви) продукт(и).

АКО ВСИЧКИ ИНСТРУКЦИИ, СЪДЪРЖАЩИ СЕ В НАСТОЯЩИЯ ДОКУМЕНТ, НЕ БЪДАТ НАПЪЛНО ПРОЧЕТИ И ИЗРИЧНО СПАЗВАНИ, ТОВА МОЖЕ ДА ДОВЕДЕ ДО ПОВРЕДА НА ПРОДУКТ(ИТЕ), НАРАНЯВАНЕ НА ЛИЦАТА, ВКЛЮЧИТЕЛНО НА ПОТРЕБИТЕЛИТЕ ИЛИ ДРУГИ ЛИЦА, И УВРЕЖДАНЕ НА ДРУГО ИМУЩЕСТВО, И ЩЕ ОТМЕНИ ВСЯКАКВА ГАРАНЦИЯ, ПРИЛОЖИМА ЗА ПРОДУКТ(ИТЕ).

ILLUMINA НЕ ПОЕМА НИКАКВА ОТГОВОРНОСТ В РЕЗУЛТАТ НА НЕПРАВИЛНАТА УПОТРЕБА НА ПРОДУКТА(ИТЕ), ОПИСАН(И) В НАСТОЯЩИЯ ДОКУМЕНТ (ВКЛЮЧИТЕЛНО ТЕХНИ ЧАСТИ ИЛИ СОФТУЕР).

© 2022 Illumina, Inc. Всички права запазени.

Всички търговски марки са собственост на Illumina, Inc. или съответните си притежатели. За специфична информация относно търговските марки посетете www.illumina.com/company/legal.html.

Информация за контакт



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, California 92122, САЩ

+1.800.809.ILMN (4566)

+1.858.202.4566 (извън Северна Америка)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com

CE
2797



Illumina Netherlands B.V.

Steenoven 19

5626 DK Eindhoven

Нидерландия

Спонсор в Австралия

Illumina Australia Pty Ltd

Nursing Association Building

Level 3, 535 Elizabeth Street

Melbourne, VIC 3000

Австралия

Етикетиране на продукта

За пълна справка за символите, които може да се появяват на опаковката и етикетите на продукта, вижте легендата на символите за вашия комплект на support.illumina.com в раздела *Документация*.

Резюме относно безопасността и ефективността (SSP) се намира на адрес

<https://ec.europa.eu/tools/eudamed> след стартиране на Европейската база данни за медицински изделия (Eudamed). Свързано е с основния UDI-DI (0081627002NIPTRP).