

Příbalový leták

URČENO K DIAGNOSTICE IN VITRO

Účel použití

VeriSeq NIPT Solution v2 je diagnostický test *in vitro* určený k vyšetření za účelem zjištění celogenomových genetických anomálií plodu ze vzorků periferní plné krve matky v nejméně 10. týdnu těhotenství. Test VeriSeq NIPT Solution v2 používá celogenomové sekvenování k detekci částečných duplikací a delecí pro všechny autozomy a stavy aneuploidie pro všechny chromozomy. Test nabízí možnost požádat o hlášení aneuploidií pohlavního chromozomu (SCA). Tento produkt se nesmí používat jako jediný základ pro diagnostiku a další rozhodnutí týkající se řízení těhotenství.

Test VeriSeq NIPT Solution v2 má tyto součásti: software VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 pro systém VeriSeq NIPT Microlab STAR, sadu pro přípravu vzorků VeriSeq NIPT a místní server VeriSeq Onsite Server v2 se softwarem VeriSeq NIPT Assay Software v2. Test VeriSeq NIPT Solution v2 je určen k použití se sekvencerem nové generace.

Shrnutí a vysvětlení rozboru

Abnormality chromozomů plodu, konkrétně aneuploidie, což je abnormální počet chromozomů, jsou běžnou příčinou reprodukčního selhání, vrozených anomálií, opožděného vývoje a duševních postižení. Aneuploidie ovlivňuje přibližně 1 ze 300 živě narozených dětí, přičemž tento počet je mnohem vyšší v případě potratů a narození mrtvého plodu.^{1,2} Až donedávna existovaly pro tyto poruchy dva typy prenatalních testů: diagnostické testy nebo vyšetření. Diagnostické testy zahrnují invazivní postupy, jako je amniocentéza nebo test CVS (Chorionic Villus Sampling). Tyto metody testování jsou považovány za zlatý standard detekce fetální aneuploidie. Jsou však spojeny s rizikem potratu v 0,11 až 0,22 % případů.³ U konvenčních multimarkerových vyšetření nehrozí riziko potratu, protože jsou neinvazivní, jsou však méně přesné než diagnostické testy. Jejich úspěšnost v detekci trizomie chromozomu 21 kolísá v rozmezí 69 až 96 % v závislosti na konkrétním vyšetření, věku matky a délce těhotenství v době testování.⁴ Důležité je, že tato vyšetření mají falešnou pozitivitu přibližně 5 %, což může vést k invazivnímu diagnostickému testování za účelem potvrzení, a tím ke vzniku rizika potratu v důsledku provedení zákroku.⁴ Ultrazvuková vyšetření mohou také detekovat abnormality chromozomů, ale přesnost této metody je nižší ve srovnání s jinými metodami.

Aneuploidii plodu pro chromozomy 21, 18, 13, X a Y lze detekovat s vysokým stupněm přesnosti neinvazivním prenatalním testováním (NIPT), které využívá celogenomové sekvenování mimobuněčné DNA (cfDNA) získané z krevní plazmy matky v 10. týdnu těhotenství nebo později. Nedávná metaanalýza více klinických studií ukázala následující vážené sloučené hodnoty úspěšnosti detekce a specificity pro trizomii chromozomu 21 a trizomii chromozomu 18 u těhotenství s jedním plodem: trizomie chromozomu 21: 99,7 %, resp. 99,96 %, a trizomie chromozomu 18: 97,9 %, resp. 99,96 %.⁵ Podle jedné studie může mít použití testu NIPT jakožto hlavního vyšetření u všech těhotenství za následek snížení počtu invazivních postupů k potvrzení diagnózy o 89 %.⁶

S ohledem na významné snížení falešné pozitivivity testu NIPT v porovnání s konvenčním multimarkerovým vyšetřením vydalo mnoho odborných lékařských organizací stanovisko podporující některé indikace pro použití testu NIPT.

Nabízení testu NIPT všem těhotným ženám podporují konkrétně tyto organizace: Mezinárodní společnost pro prenatální diagnostiku (International Society for Prenatal Diagnosis – IPSD), Americké sdružení porodníků a gynekologů (American College of Obstetricians and Gynecologists – ACOG) / Society for Maternal Fetal Medicine (SMFM), Americké sdružení pro lékařskou genetiku a genomiku (American College of Medical Genetics and Genomics – ACMG) a Evropská společnost pro lidskou genetiku (European Society of Human Genetics – ESHG) / Americká společnost pro lidskou genetiku (American Society of Human Genetics – ASHG).^{7,8,9} Doporučuje se poskytovat poradenství před testem, opatřit informovaný souhlas pacientky a provádět diagnostické testování k potvrzení pozitivního vyšetření cfDNA.⁴

VeriSeq NIPT Solution v2 je neinvazivní diagnostický test in vitro, který využívá celogenomové sekvenování fragmentů cfDNA získaných ze vzorků plné periferní krve těhotných matek v 10. a pozdějším týdnu těhotenství. Test nabízí dvě možnosti pro typy vyšetření: základní a celogenomové. Základní vyšetření poskytuje informace pouze ke stavu aneuploidie chromozomů 21, 18, 13, X a Y. Celogenomová vyšetření poskytují informace o částečné duplikaci a delecii u všech autozomů a informace o stavu aneuploidie u všech chromozomů. Oba typy vyšetření poskytují možnost hlášení aneuploidie pohlavních chromozomů (SCA) s hlášením pohlaví plodu nebo bez něj. Možnost hlášení aneuploidie pohlavních chromozomů (SCA) lze vypnout. Pokud je možnost hlášení aneuploidie pohlavních chromozomů (SCA) vypnutá, nebude hlášeno ani pohlaví plodu. Další informace o možnostech hlášení pohlaví najdete v *Příručce k softwaru VeriSeq NIPT Solution v2 (dokument č. 1000000067940)*.

Principy postupu

VeriSeq NIPT Solution v2 je automatizovaný systém pro laboratorní testování NIPT, který se skládá z automatizované přípravy vzorků a analýzy dat sekvenování. Sady pro přípravu vzorků VeriSeq NIPT jsou specializované reagenty na jedno použití, které se používají společně se systémem VeriSeq NIPT Microlab STAR k přípravě dávek 24, 48 nebo 96 vzorků pro sekvenování nové generace. Data sekvenování párových konců celého genomu jsou analyzována pomocí specializovaného softwaru VeriSeq NIPT Assay Software v2 a je vytvořen výkaz, který poskytuje kvalitativní výsledky.

Pracovní postup zahrnuje následující kroky: odběr vzorků, izolace plazmy, extrakce cfDNA, příprava knihoven, kvantifikace knihoven, slučování knihoven, sekvenování a analýza. Tyto kroky jsou popsány podrobněji:

- **Odběr vzorků** – Do zkumavky Streck pro odběr bezbuněčných krevních vzorků DNA (BCT) je odebrán objem 7–10 ml periferní plné krve matky, což zabrání lýze buněk a kontaminaci genomu a stabilizuje plnou krev.
- **Izolace plazmy** – Do 5 dnů od odběru je plazma izolována z periferní plné krve matky standardní odstředivací technikou. Systém VeriSeq NIPT Microlab STAR nasává a vypuzuje plazmu do desky s 96 hlubokými jamkami k následnému zpracování. Pro případ opakovaného testování mohou být vzorky po zpracování opětovně uzavřeny a uchovány při teplotě 4 °C po dobu dalších 5 dní (celkem 10 dní po odběru krve).

**UPOZORNĚNÍ**

Překročení výše uvedených časů skladování může negativně ovlivnit míru chybovosti jednotlivých vzorků.

- **Extrakce cfDNA** – Purifikace cfDNA z plazmy je dosaženo adsorpcí na vazebnou desku, promytím vazebné desky za účelem odstranění kontaminujících látek a elucí.
- **Příprava knihoven** – Purifikované fragmenty cfDNA procházejí procesem závěrečné opravy, při které se převádí 5' a 3' převisy na tupé konce. Následně jsou 3' konce doplněny nukleotidem deoxyadenosinu, čímž vznikne jednobázový převis. Indexované adaptéry obsahující jednobázový 3' převis deoxythymidinu jsou poté navázány na zpracované fragmenty cfDNA. Navázaná DNA je purifikována pomocí částic SPRI (Solid Phase Reverse Immobilization). Každý vzorek v sadě 24, 48, nebo 96 vzorků obdrží jedinečný indexovaný adaptér. Adaptéry slouží dvěma účelům:

**UPOZORNĚNÍ**

Dbejte zvýšené opatrnosti, aby nedošlo ke křížové kontaminaci indexů, která by mohla vést k nesprávným výsledkům.

- Pomocí indexů lze identifikovat vzorky v následném sekvenování.
- Indexované adaptéry obsahují sekvence, které umožňují zachycení knihovny na pevném povrchu průtokové kyvety pro sekvenování za účelem generování klastrů a následného sekvenování.
- **Kvantifikace** – Produkt knihovny je kvantifikován pomocí fluorescenčního barviva s koncentrací určenou porovnáním se standardní křivkou DNA.
- **Slučování knihoven a sekvenování** – Vzorky knihoven jsou sloučeny společně do fondu s 24 nebo 48 vzorky v množstvích, která jsou upravena tak, aby byla minimalizována odchylka pokrytí. Jednotlivé fondy jsou následně sekvenovány pomocí systému pro sekvenování nové generace.
- Test VeriSeq NIPT Solution v2 neobsahuje vybavení pro sekvenování ani spotřební materiál.
- **Analýza** – Analýza jednotlivých vzorků má následující součásti:
 - Identifikace fragmentů knihovny sekvencí indexu a zarovnání čtení párových konců s referenčním lidským genomem.
 - Odhad fetální frakce knihovny kombinací informací z distribuce délek a genomických souřadnic fragmentů knihovny.
 - Po započtení známých zkreslení statistický model detekuje oblasti genomu, které jsou v knihovně zastoupeny v příliš malé nebo velké míře způsobem, který je v souladu s anomálií na odhadované úrovni fetální frakce.
 - Výkaz NIPT poskytuje souhrnné výsledky vybrané nabídky testů, kde je u odhadu fetální frakce vzorků, které projdou kontrolou kvality, uvedeno ANOMALY DETECTED (Byla detekována anomálie) nebo NO ANOMALY DETECTED (Nebyla detekována anomálie).
 - Doplnující zpráva poskytuje kvantitativní metriky, které charakterizují každou detekovanou anomálii.

Omezení postupu

Omezení týkající se rozboru

- Důkazy podporující citlivost a specifitu testu pokrývají jednočetná a dvojčetná těhotenství. Tento návod k použití neposkytuje data pro citlivost a specifitu u trojčet nebo vícečetných těhotenství.
- Test VeriSeq NIPT Solution v2 není určen k detekci polyploidie, jako je triploidie.
- Test VeriSeq NIPT Solution v2 není určen k detekci vyvážené přestavby mezi chromozomy.
- Rozbor vyžaduje odebrání vzorků periferní plné krve těhotné matky v 10. týdnu těhotenství nebo později.
- U základních vyšetření zjišťuje test VeriSeq NIPT Solution v2 konkrétní abnormality chromozomů. Výsledky označené jako NO ANOMALY DETECTED (Nebyla zjištěna anomálie) nevylučují možnost výskytu abnormalit testovaných chromozomů. Negativní výsledek nevylučuje možnost, že těhotenství trpí dalšími abnormalitami chromozomů, genetickými stavy nebo vrozenými vadami (např. otevřený defekt neurální trubice).
- U celogenomových vyšetření mohou značně velké delece a duplikace, které jsou menší než 75 % velikosti chromozomu, poukazovat na aneuploidii celého chromozomu.
- U celogenomového vyšetření jsou určité oblasti z analýzy vyloučeny. Seznam těchto vyloučených oblastí je k dispozici na webových stránkách podpory společnosti Illumina. Detekce genetických anomálií se provádí pouze na nevyloučených oblastech.
- Hlášení pohlaví plodu není k dispozici ve všech oblastech vzhledem k místním předpisům upravujícím informování o pohlaví.
- Na základě údajů z literatury mohou být výsledky vyšetření na základě mimobuněčné DNA zkresleny určitými faktory na straně matky a plodu. Některé z nich jsou uvedeny níže, ale nejde jen o tyto případy:
 - Nedávná transfúze krve u matky
 - Předchozí transplantace orgánu / transplantace kmenových buněk u matky
 - Autoimunitní onemocnění matky
 - Nádory u matky (benigní a maligní)
 - Mozaicismus matky
 - Variabilita počtu kopií u matky
 - Fetoplacentární mozaicismus / mozaicismus omezený na placentu
 - Potrat plodu / syndrom mizejícího dvojčete

Vykazování testu VeriSeq NIPT Solution v2

- VeriSeq NIPT Solution v2 je vyšetřovací test, jehož použití by mělo být zváženo nezávisle na jiných klinických nálezech a výsledcích testů. Závěry o stavu plodu a rozhodnutí týkající se řízení těhotenství by se neměly zakládat pouze na výsledcích vyšetření NIPT.⁷

- Test VeriSeq NIPT Solution v2 hlásí následující parametry:
 - Základní vyšetření testuje vyšší zastoupení chromozomů 13, 18, a 21.
 - Celogenomové vyšetření testuje nižší nebo vyšší zastoupení všech autozomů včetně částečných delecí a duplikací dosahujících alespoň 7 Mb.
 - U jednočetných těhotenství, u kterých je pro hlášení pohlaví vybrána možnost Yes (Ano) nebo SCA (aneuploidie pohlavních chromozomů), jsou hlášeny následující anomálie chromozomů: XO, XXX, XXY a XYY.
 - U jednočetných těhotenství, u kterých je pro hlášení pohlaví vybrána možnost Yes (Ano), je hlášeno pohlaví plodu.
 - Přítomnost chromozomu Y u dvoučetných těhotenství.

Složky produktu

Test VeriSeq NIPT Solution v2 (kat. č. 20030577) se skládá z následujících sad pro přípravu vzorků:

- Příprava vzorku VeriSeq NIPT (24 vzorků) (kat. č. 20025895)
- Příprava vzorku VeriSeq NIPT (48 vzorků) (kat. č. 15066801)
- Příprava vzorku VeriSeq NIPT (96 vzorků) (kat. č. 15066802)

Test VeriSeq NIPT Solution v2 (kat. č. 20030577) se skládá z následujících součástí softwaru:

- Software VeriSeq NIPT Assay Software v2 (kat. č. 20047024) předinstalovaný na místním serveru VeriSeq Onsite Server v2.
 - Místní server VeriSeq Onsite Server v2 (kat. č. 20028403 nebo 20047000) nebo stávající místní server VeriSeq Onsite Server (kat. č. 15076164 nebo 20016240), který byl upgradován na verzi 2.
- Software VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 (kat. č. 20044988) předinstalovaný v systému VeriSeq NIPT Microlab STAR.
 - Systém VeriSeq NIPT Microlab STAR (kat. č. Hamilton Company Reno: 95475-01 (115 V) a 95475-02 (230 V), Hamilton Company Bonaduz: 806288).
- Modul Local Run Manager VeriSeq NIPT (kat. č. 20044989).

Reagencie

Dodané reagencie

Společnost Illumina dodává následující reagencie: příprava vzorku VeriSeq NIPT (24 vzorků) (kat. č. 20025895), příprava vzorku VeriSeq NIPT (48 vzorků) (kat. č. 15066801) a příprava vzorku VeriSeq NIPT (96 vzorků) (kat. č. 15066802). Přípravy vzorků VeriSeq NIPT jsou nakonfigurovány pro použití se systémem VeriSeq NIPT Microlab STAR (ML STAR) (kat. č. 95475-01, 95475-02 nebo 806288), který dodává společnost Hamilton.

Sada pro přípravné zpracování vzorků VeriSeq NIPT, sada pro extrakci

Tabulka 1 Sada pro extrakci VeriSeq NIPT (24) a (48), kat. č. 20025869 a 15066803

Název reagensie na štítku	Počet balení v sadě	Účinné látky	Skladování
Lysis Buffer (Lyzační pufr)	1	Guanidinhydrochlorid v pufovaném vodném roztoku	15 až 30 °C
Wash Buffer I (Promývací pufr I)	1	Guanidinhydrochlorid a 2-propanol v pufovaném vodném roztoku	15 až 30 °C
Wash Buffer II (Promývací pufr II)	1	Pufovaný vodný roztok obsahující soli	15 až 30 °C
Elution Buffer (Eluční pufr)	1	Pufovaný vodný roztok	15 až 30 °C
Proteinase Buffer (Proteinázový pufr)	1	Glycerol v pufovaném vodném roztoku	15 až 30 °C
Proteinase K (Proteináza K)	3	Lyofilizovaná proteináza K	15 až 30 °C

Tabulka 2 Sada pro extrakci VeriSeq NIPT (96), kat. č. 15066807

Název reagensie na štítku	Počet balení v sadě	Účinné látky	Skladování
Lysis Buffer (Lyzační pufr)	1	Guanidinhydrochlorid v pufovaném vodném roztoku	15 až 30 °C
Wash Buffer I (Promývací pufr I)	1	Guanidinhydrochlorid a 2-propanol v pufovaném vodném roztoku	15 až 30 °C
Wash Buffer II (Promývací pufr II)	2	Pufovaný vodný roztok obsahující soli	15 až 30 °C
Elution Buffer (Eluční pufr)	1	Pufovaný vodný roztok	15 až 30 °C
Proteinase Buffer (Proteinázový pufr)	1	Glycerol v pufovaném vodném roztoku	15 až 30 °C
Proteinase K (Proteináza K)	4	Lyofilizovaná proteináza K	15 až 30 °C

Sada pro přípravné zpracování vzorků VeriSeq NIPT, sada pro přípravu knihovny

Tabulka 3 Sada pro přípravu knihovny VeriSeq NIPT (24) a (48), kat. č. 20026030 a 15066809

Název reagensie na štítku	Počet balení v sadě	Účinné látky	Skladování
End Repair Mix (Směs pro opravu konců)	1	DNA polymeráza a dNTP v pufovaném vodném roztoku	-25 až -15 °C
A-Tailing Mix (Směs A-Tailing)	1	DNA polymeráza a dATP v pufovaném vodném roztoku	-25 až -15 °C
Ligation Mix (Ligační směs)	1	DNA ligáza v pufovaném vodném roztoku	-25 až -15 °C
Hybridization Buffer (Hybridizační pufr)	1	Pufovaný vodný roztok	-25 až -15 °C
NIPT DNA Adapter Plate (Deska adaptéru DNA NIPT)	1	Oligonukleotidy v pufovaném vodném roztoku	-25 až -15 °C

Tabulka 4 Sada pro přípravu knihovny VeriSeq NIPT (96), kat. č. 15066810

Název reagensie na štítku	Počet balení v sadě	Účinné látky	Skladování
End Repair Mix (Směs pro opravu konců)	1	DNA polymeráza a dNTP v pufovaném vodném roztoku	-25 až -15 °C
A-Tailing Mix (Směs A-Tailing)	2	DNA polymeráza a dATP v pufovaném vodném roztoku	-25 až -15 °C
Ligation Mix (Ligační směs)	2	DNA ligáza v pufovaném vodném roztoku	-25 až -15 °C
Hybridization Buffer (Hybridizační pufr)	1	Pufovaný vodný roztok	-25 až -15 °C

Název reagensie na štítku	Počet balení v sadě	Účinné látky	Skladování
NIPT DNA Adapter Plate (Deska adaptéru DNA NIPT)	1	Oligonukleotidy v pufrovaném vodném roztoku	-25 až -15 °C

Sada pro přípravné zpracování vzorků VeriSeq NIPT, sada s příslušenstvím

Tabulka 5 Sada s příslušenstvím VeriSeq NIPT, kat. č. 15066811

Název reagensie na štítku	Počet balení v sadě	Účinné látky	Skladování
DNA Binding Plate (Deska pro vazbu DNA)	1	Propylenová mikrodeska s modifikovanou silikonovou membránou	2 až 8 °C
Resuspenzační pufr	1	Pufrovaný vodný roztok	2 °C až 8 °C
Sample Purification Beads (Částice pro purifikaci vzorku)	1	Tuhé paramagnetické částice v pufrovaném vodném roztoku	2 až 8 °C
Reagensie kvantifikace DNA	1	DNA interkalační barvivo v DMSO	2 až 8 °C
Standard kvantifikace DNA	1	Standard dsDNA, nespecifická DNA a azid sodný v pufrovaném vodném roztoku	2 až 8 °C

Sada pro přípravné zpracování vzorků VeriSeq NIPT, zkumavky a štítky pracovního postupu

Tabulka 6 Zkumavky a štítky, kat. č. 15071543

Název položky na štítku	Počet položek v sadě	Skladování
Štítek (LBL) – čárový kód desky	9	15 až 30 °C
Štítek (LBL) – čárový kód desky s hlubokými jamkami	12	15 až 30 °C
Zkumavka (TB) – prázdná zkumavka pro slučování	5	15 až 30 °C

Nedodané reagensie

Požadované reagensie, nedodané

- Reagensie a spotřební materiál pro sekvenování v systému sekvenování nové generace (NGS)
- Certifikovaná voda prostá Dnáz/Rnáz
- 100% etanol (200 proof), v kvalitě pro molekulární biologii

POZNÁMKA Etanol, který není na úrovni pro molekulární biologii, může mít negativní vliv na účinnost rozboru.

Volitelné reagensie, nedodané

- Fosfátový pufr Dulbecco (DPBS) pro kontrolu bez templátu (NTC)

Skladování a manipulace

1. Pokojová teplota je definována jako 15 °C až 30 °C.
2. Všechny reagensie jsou určeny pouze k jednomu použití. Reagensie připravené k použití musí být ihned použity.
3. Dojde-li k poškození nebo porušení obalu nebo obsahu kterékoliv součásti testu VeriSeq NIPT Solution, obraťte se na zákaznický servis společnosti Illumina.
4. Reagensie jsou stabilní, pokud jsou skladovány v souladu s pokyny až do data použitelnosti uvedeného na štítcích sady. Podmínky skladování jsou uvedeny ve sloupci Skladování v tabulkách v části [Reagensie na straně 5](#). Nepoužívejte prošlé reagensie.
5. Změny fyzického vzhledu dodaných reagensií mohou znamenat poškození materiálů. Dojde-li ke změně fyzického vzhledu (například ke zjevným změnám barvy reagensií nebo výskytu zákalu typického pro mikrobiální kontaminaci), reagensie nepoužívejte.
6. Při manipulaci s částicemi pro purifikaci vzorku dodržujte následující dobrou praxi:
 - Částice nikdy nezmrazujte.
 - Před použitím počkejte, než částice dosáhnou pokojovou teplotu.
 - Bezprostředně před použitím míchejte částice ve vortexové třepačce, dokud nezískáte dobře rozptýlenou suspenzi homogenní barvy.
7. V lyzačním pufru, promývacím pufru I, promývacím pufru II, elučním pufru a proteinázovém pufru se mohou tvořit sraženiny nebo krystalky. Před použitím důkladně promíchejte ve vortexové třepačce a poté očima zkontrolujte, zda v obsahu nejsou sraženiny.
8. Odebranou plnou krev nikdy nezmrazujte.

9. Sekvenujte knihovny co nejdříve po sloučení do fondu. Knihovny sloučené ve fondu jsou stabilní až sedm dní při teplotě -25 °C až -15 °C . Není nutná žádná další denaturace, pokud jsou uloženy po tuto dobu za těchto podmínek.

Vybavení a materiály

Požadované vybavení a materiály, nedodané

Požadované vybavení, nedodané

Vybavení	Dodavatel
Systém pro sekvenování nové generace (NGS) s následujícími vlastnostmi: <ul style="list-style-type: none"> • Sekvenování koncových párů s 2x 36 bázovými páry • Kompatibilní s duálními indexovými adaptéry sady pro přípravné zpracování vzorků VeriSeq NIPT • Automatické vytváření souborů BCL • Chemie založená na dvou kanálech • 400 milionů čtení párových konců na jeden běh • Kompatibilní se softwarem VeriSeq NIPT Assay Software v2 nebo sekvenačním systémem NextSeq 550Dx. 	Dodavatel přístrojů nebo společnost Illumina, kat. č. 20005715
Mraznička, -25 °C až -15 °C	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Mikroodstředivka	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Pipetovací pomůcka	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Chladnička, 2 °C až 8 °C	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Jednokanálové pipety 20 μl	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Jednokanálové pipety 200 μl	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Jednokanálové pipety 1 000 μl	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Vortexová třepačka	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Sestava odstředivky a rotoru pro zkumavky na krevní vzorky	

Vybavení	Dodavatel
<p>Rovnocenné výrobky:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Odstředivka s chlazením umožňující zrychlení 1 600 g s možností provozu bez brzdy • Rotor s výkyvnými nádobkami • Vložky do nádobek, kapacita, 24, 48, nebo 96 zkumavek, minimální hloubka 76 mm • Vkládací adaptéry pro podporu zkumavek na krevní vzorky s rozměrem 16 × 100 mm <p>Doporučeno:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Odstředivka řady Allegra X12R, 1 600 g • Rotor s nádobkami pro odstředivku Allegra GH-3.8 • Kryty nádobek pro odstředivku Allegra, sada 2 ks • Sestava adaptéru odstředivky Allegra, 16 mm, sada 4 ks 	<p>Dodavatel běžného laboratorního vybavení</p> <p>Beckman Coulter, č. položky 392304 (120 V nebo 230 V)</p> <p>Beckman Coulter, č. položky 369704</p> <p>Beckman Coulter, č. položky 392805</p> <p>Beckman Coulter, č. položky 359150</p>
Sestava odstředivky s rotorem pro mikrodisky	
<p>Rovnocenné výrobky:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Odstředivka umožňující zrychlení 5 600 g • Rotor s výkyvnými deskami s držáky na desky s 96 jamkami, minimální hloubka 76,5 mm. • Multifuga X4 Pro-MD 120V TX-1000BT • Odstředivka Sorvall Legend XTR <ul style="list-style-type: none"> • Rotor pro mikrodisky HIGHPlate 6000 • Rotor pro filtrační desky High Plate 6000 <p>Stojan na mikrodisky</p> <ul style="list-style-type: none"> • Doporučeno: <ul style="list-style-type: none"> • Stojan MicroAmp pro 96 jamek • Držák desek PCR pro 96 jamek 	<p>Dodavatel běžného laboratorního vybavení</p> <p>Thermo Scientific VWR, kat. č. 76326-254</p> <p>Thermo Fisher Scientific, kat. č. 75004521 (120 V) nebo kat. č. 75004520 (230 V)</p> <p>Thermo Fisher Scientific, kat. č. 75003606</p> <p>Thermo Scientific VWR, kat. č. 97040-244</p> <p>Thermo Fisher Scientific, kat. č. 4379590</p> <p>Thermo Fisher Scientific, kat. č. AB-0563/1000</p>

Vybavení	Dodavatel
Některá z následujících čteček mikrodesek nebo ekvivalentní zařízení (fluorometr) se softwarem SoftMax Pro verze 6.2.2 nebo novějším: <ul style="list-style-type: none"> Gemini XPS SpectraMax M2, M3, M4, and M5. <ul style="list-style-type: none"> Fialová vložka je součástí čtečky mikrodesek pro použití v pracovním postupu. 	Molecular Devices, kat. č. XPS Molecular Devices, kat. č. M2, M3, M4 a M5
Sériový adaptér SpectraMax High-Speed USB	Molecular Devices, kat. č. 9000-0938
Termocyklér s následujícími specifikacemi: <ul style="list-style-type: none"> Vyhřívané víko Teplotní rozsah 4 až 98 °C Přesnost teploty ±2 °C Minimální rychlost stoupání teploty 2 °C za sekundu Kompatibilní s deskou PCR Twin.tec s 96 jamkami a plným lemem 	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
VeriSeq NIPT Microlab STAR	Hamilton, kat. č. 95475-01 (115 V), kat. č. 95475-02 (230 V) nebo kat. č. 806288 (pro Hamilton Company Bonaduz)
VeriSeq Onsite Server v2 nebo upgradovaný VeriSeq Onsite Server	illumina, kat. č. 20028403, kat. č. 20047000 (v2), kat. č. 15076164 nebo kat. č. 20016240 (upgradováno)
Pokud používáte systém pro sekvenování NextSeq 550Dx: <ul style="list-style-type: none"> Sada reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 cyklů) 	illumina, kat. č. 20028870

Volitelné vybavení, nedodané

Vybavení	Dodavatel
Systém Pluggo Decapper	LGP Consulting, kat. č. 4600 4450
Deska pro fluorescenční ověřování SpectraMax SpectraTest FL1	Molecular Devices, kat. č. 0200-5060
Revolver/rotátor zkumavek, 15ml zkumavky, 40 ot./min, 100–240 V	Thermo Scientific, kat. č. 88881001 (USA) nebo kat. č. 88881002 (EU)

Požadované materiály, nedodané

Spotřební materiál	Dodavatel
Vodivé nesterilní filtrační špičky 1 000 µl	Hamilton, kat. č. 235905
Vodivé nesterilní filtrační špičky 300 µl	Hamilton, kat. č. 235903
Vodivé nesterilní filtrační špičky 50 µl	Hamilton, kat. č. 235948
<p>Zásobník s hlubokými jamkami s následujícími specifikacemi:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Formát mikrodessky SLAS 1–2004 s 96 jehlanovými nebo kuželovými jamkami a minimální kapacitou 240 ml. • Polypropylen s preferencí pro malou vazbu DNA pro všechny styčné plochy vzorku. • Vnitřní rozměry (hladina kapaliny) jsou kompatibilní s kroky automatizovaného nasávání a rozptylování v systému VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Výškové rozměry jsou kompatibilní s automatizovanými pohyby systému VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	<p>Dodavatel běžného laboratorního vybavení</p> <p>Kompatibilní zásobníky:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Corning Axygen, č. produktu RES-SW96-HP-SI • Agilent, č. produktu 201246-100
<p>Zkumavka na reagentie s následujícími specifikacemi:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Zkumavka, která se pevně (ale ne silou) nasadí do držáku systému VeriSeq NIPT Microlab STAR se zúženým dnem a minimální kapacitou 20 ml. • Polypropylen neobsahující RNázy/DNázy. • Vnitřní rozměry zásobníku (hladina kapaliny) určují hladiny kapalin na základě objemů reagentií rozboru jsou kompatibilní s kroky automatizovaného nasávání a rozptylování v systému VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Výškové rozměry jsou kompatibilní s automatizovanými pohyby systému VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	<p>Dodavatel běžného laboratorního vybavení</p> <p>Kompatibilní zkumavky:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Roche, č. produktu 03004058001

Spotřební materiál	Dodavatel
<p>Desky s hlubokými jamkami s následujícími specifikacemi:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Formát mikroděsky SLAS 1–2004, 3–2004 a 4–2004 s 96 jehlanovými nebo kuželovými jamkami a minimální kapacitou jamky 2 ml. • Průsvitný polypropylen s preferencí materiálu pro malou vazbu DNA pro všechny styčné plochy vzorku. • Rozměry jamky určují hladinu kapaliny jsou kompatibilní s kroky automatizovaného nasávání a rozptylování v systému VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Lem desky, který umožňuje umístění čárových kódů desek do požadované polohy a jejich bezpečné přilnutí k povrchu. • Rám odolný proti zkroucení, který vydrží minimálně 5600 g. • Výškové rozměry desky jsou kompatibilní s automatizovanými pohyby systému VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	<p>Dodavatel běžného laboratorního vybavení</p> <p>Kompatibilní desky:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, kat. č. 0030505301 • Eppendorf, kat. č. 30502302 • USA Scientific, kat. č. 1896-2000
<p>Deska s 384 jamkami s následujícími specifikacemi:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mikroděska se 384 jamkami optimalizovaná pro malé objemy, s minimální kapacitou jamky 50 µl. • Černý neprůhledný polystyren s blokováním světla a malou vazbou DNA pro všechny styčné plochy vzorku. • Rozměry jamky určují hladiny kapalin, které jsou kompatibilní s kroky automatizovaného nasávání a rozptylování v systému VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Výškové rozměry desky jsou kompatibilní s automatizovanými pohyby systému VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Lem desky, který umožňuje umístění čárových kódů desek do požadované polohy a jejich bezpečné přilnutí k povrchu. 	<p>Dodavatel běžného laboratorního vybavení</p> <p>Kompatibilní desky:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Corning, č. produktu 3820

Spotřební materiál	Dodavatel
<p>Deska s 96 jamkami s následujícími specifikacemi:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mikrodiska s rámem odolným vůči zkroucení, který vydrží minimálně 5600 g, a 96 průsvitnými jamkami se zúženým dnem, vystouplými okraji a minimální kapacitou jamky 150 µl. • Polypropylen neobsahující Rnázy/Dnázy s malou vazbou DNA pro všechny styčné plochy vzorku. • Rozměry jamky určují hladiny kapalin, které jsou kompatibilní s kroky automatizovaného nasávání a rozptylování v systému VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Výškové rozměry desky jsou kompatibilní s automatizovanými pohyby systému VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Lem desky, který umožňuje umístění čárových kódů desek do požadované polohy a jejich bezpečné přilnutí k povrchu. • Kompatibilní s termocykléry pro denaturaci. 	<p>Dodavatel běžného laboratorního vybavení</p> <p>Kompatibilní desky:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, kat. č. 0030129512 • Eppendorf, kat. č. 30129580 • Eppendorf, kat. č. 30129598 • Eppendorf, kat. č. 30129660 • Eppendorf, kat. č. 30129679 • Bio-Rad, kat. č. HSP9601
<p>Některá z těchto těsnicích fólií:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Fólie Microseal 'F' • Těsnicí fólie 	<p>Bio-Rad, kat. č. MSF1001 Beckman Coulter, č. položky 538619</p>
<p>Cell-Free DNA BCT CE</p>	<p>Streck, kat. č. 218997</p>
<p>Vtlačovací uzávěry</p>	<p>Sarstedt, obj. č. 65.802</p>
<p>2ml zkumavky se šroubovacím uzávěrem</p>	<p>Dodavatel běžného laboratorního vybavení</p>
<p>Filtrační špičky 20 µl pro pipetovací zařízení 20 µl</p>	<p>Dodavatel běžného laboratorního vybavení</p>
<p>Filtrační špičky 200 µl pro pipetovací zařízení 200 µl</p>	<p>Dodavatel běžného laboratorního vybavení</p>
<p>Filtrační špičky 1 000 µl pro pipetovací zařízení 1 000 µl</p>	<p>Dodavatel běžného laboratorního vybavení</p>
<p>Rovnocenné výrobky:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sprej pro rychlou dezinfekci na bázi alkoholu • Rostok dezinfekčního detergentu <p>Doporučeno:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Deionizovaná voda a 70% ethanol 	<p>Dodavatel běžného laboratorního vybavení</p>

Volitelné materiály, nedodané

Spotřební materiál	Dodavatel
Fosfátový pufr Dulbecco (DPBS) pro kontrolu bez templátu (NTC)	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Zkumavka, šroubovací uzávěr, 10 ml (pouze pro kontrolní vzorky)	Sarstedt, obj. č. 60.551
Zkumavka, šroubovací uzávěr, 50 ml	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Sérologické pipety 25 ml	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Sérologické pipety 10 ml	Dodavatel běžného laboratorního vybavení

Sběr, přeprava a skladování vzorků**UPOZORNĚNÍ**

Se všemi vzorky zacházejte tak, jakoby byly potenciálně infekčními činidly.

- Vzorky plné krve o objemu 7–10 ml musejí být odebrány do zkumavky Streck Cell-Free DNA BCT.
- Přeprava plné krve musí splňovat všechny platné předpisy řídící přepravu patogenů. Doporučují se rychlé způsoby zaslání/přepravy.
- Během přepravy skladujte při teplotě 4 až 30 °C. Před dalším zpracováním uchovejte přijaté vzorky při teplotě 2 až 8 °C. Doba mezi odběrem krve a počáteční izolací plazmy by neměla překročit pět dní.
- Pro případ opakovaného testování mohou být vzorky po zpracování opětovně uzavřeny a uchovány při teplotě 4 °C po dobu dalších 5 dní (celkem 10 dní po odběru krve).

**UPOZORNĚNÍ**

Překročení výše uvedených časů skladování může negativně ovlivnit míru chybovosti jednotlivých vzorků.

Varování a preventivní opatření

- Tento rozbor obsahuje proteinázu K. Vdechováním, požitím, stykem s kůží a vniknutím do očí může dojít k poranění. Používejte v dobře větraných prostorech, používejte ochranný oděv, vyhýbejte se vdechování prachu a veškeré nádoby a jejich nespotřebovaný obsah zlikvidujte v souladu s platnými státními bezpečnostními normami.

- Tento rozbor obsahuje guanidiniumchlorid. Vdechováním, požitím, stykem s kůží a vniknutím do očí může dojít k poranění. Používejte v dobře větraných prostorech, používejte ochranný oděv a veškeré nádoby a jejich nespoteřovaný obsah zlikvidujte v souladu s platnými státními bezpečnostními normami.
- Tento rozbor obsahuje hořlavou chemikálii 2-propanol. Chraňte jej před teplem a otevřeným plamenem. Vdechováním, požitím, stykem s kůží a vniknutím do očí může dojít k poranění. Používejte v dobře větraných prostorech, používejte ochranný oděv a veškeré nádoby a jejich nespoteřovaný obsah zlikvidujte v souladu s platnými státními bezpečnostními normami.
- Tento test obsahuje dimethylsulfoxid, což je žíravá a hořlavá kapalina. Vdechováním, požitím, stykem s kůží a vniknutím do očí může dojít k poranění. Používejte v dobře větraných prostorech, používejte ochranný oděv a veškeré nádoby a jejich nespoteřovaný obsah zlikvidujte v souladu s platnými státními bezpečnostními normami.
- V zájmu prevence před tvorbou škodlivých plynů nelikvidujte odpad z extrakce cfDNA (obsahuje guanidinydrochlorid) společně s odpadem obsahujícím bělicí látky (chlornan sodný).
- Se všemi vzorky zacházejte tak, jakoby obsahovaly potenciálně infekční činidla.
- Dodržujte běžná laboratorní preventivní opatření. Nepipetujte ústy. Ve vyhrazených pracovních prostorech nejezte, nepijte ani nekuřte. Při manipulaci se vzorky a reagensy rozboru používejte jednorázové rukavice a laboratorní pláště. Po manipulaci se vzorky a reagensy rozboru si důkladně umyjte ruce.
- Nepoužívejte žádné ze složek rozboru po uplynutí data použitelnosti uvedeného na štítku na krabičce s rozbořem. Nenahrazujte složky rozboru za složky z jiných šarží. Šarže rozboru jsou označeny na štítku na krabičce s rozbořem. Složky rozboru uchovávejte při stanovené teplotě.
- Chcete-li zabránit degradaci vzorku nebo reagensie, zajistěte, aby byly před zahájením protokolu rozptýleny všechny páry chlornanu sodného vzniklé čištěním.
- Nedodržení uvedených postupů může vést k chybným výsledkům nebo významnému snížení kvality vzorku.
- Neprodleně nahlase veškeré závažné události související s tímto produktem společnosti Illumina a příslušným orgánům členských států, ve kterých působí uživatel a pacient.
- Informace týkající se ochrany životního prostředí, zdraví a bezpečnosti práce naleznete na bezpečnostních listech (SDS) na stránce support.illumina.com/sds.html.

Poznámky k postupu

Ochrana před kontaminací

- Používejte nové špičky a čerstvý spotřební laboratorní materiál.
- Používejte špičky odolné vůči aerosolům, které sníží riziko přenosu a křížové kontaminace mezi vzorky.
- S ohledem na riziko kontaminace s nejvyšší důkladností zajistěte, aby zůstal obsah jamky zcela uvnitř jamky. Zabraňte vystříknutí obsahu. Po každém promíchání ve vortexové třepačce odstřed'te.
- Při manipulaci s krví a krevními deriváty dodržujte platné předpisy a správné laboratorní postupy.

- Při přípravě knihovny nepoužívejte aerosolové bělicí spreje. Stopová kontaminace bělidlem může vést k selhání rozboru.
- Při odpečetění desek dbejte na to, abyste desku položili na pevný, rovný povrch a dobře ji uchopili. Opatrně sejměte těsnicí fólii a dbejte na to, aby se těsnicí fólie nedotýkala odkrytých jamek. Dbejte na to, abyste se nedotýkali odkrytých jamek a nezneškodili jejich obsah. Křížová kontaminace mezi jamkami může vést k nesprávným výsledkům.

Čištění plošiny VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Před použitím zkontrolujte čistotu plošiny. Nejméně jednou týdně proveďte týdenní údržbu a postupujte podle tohoto návodu k čištění.
- Vyjměte všechny vyjmutelné držáky, vyčistěte je rychlým dezinfekčním sprejem na bázi alkoholu (deionizovaná voda a 70% ethanol) a nechte je vysušit. Jsou-li velmi znečištěné, namočte je následně do roztoku dezinfekčního detergentu, opláchněte je dezinfekčním prostředkem na bázi alkoholu a nechte je vysušit.
- Otevřete přední kryt a vytřete plošinu hadříkem nasáklým přípravkem z deionizované vody a 70% ethanolu. Zejména je třeba zkontrolovat čistotu bočních bloků.
- Vyjměte sběrné potrubí základní vakuovací soustavy (BVS) a hadříkem vyčistěte sběrné potrubí, těsnění a vnitřní prostory soustavy BVS. Nečistěte těsnění etanolem, protože může způsobit křehnutí materiálu.
- Vyprázdněte odpad na špičky pipetovací hlavy CORE 96 a nezávislý kanál.
- Vyjměte desku pro vysunování špiček nezávislého kanálu odpadní stanice na špičky a vyčistěte ji: nastříkejte přípravek z deionizované vody a 70% ethanolu přímo na povrch a setřete. Natáhněte na rám nový plastový pytel a znovu jej připevněte. Vraťte čistou desku pro vysunování špiček na místo.
- Nastříkejte přípravek z deionizované vody a 70% ethanolu přímo na povrch schránky na odpad a žlabu pipetovací hlavy CORE 96 a vytřete jej do čista.
 - Pokud je odstranění nahromaděných nečistot ze špičky obtížné, otřete ji hadříkem navlhčeným vodou prostou DNáz/RNáz, dokud se nahromaděné nečistoty neodstraní. Hadřík vhodným způsobem zlikvidujte. Pokračujte sterilizací dezinfekčním prostředkem na bázi alkoholu.
- Namočte hadřík nepouštějící vlákna nebo tampon 70% etanolem. Vytřete okénko laserového skeneru čtečky čárových kódů. Stejným hadříkem nebo tamponem vyčistěte všechny jamky adaptéru desky CPAC. Pokud používáte hadřík, vtlačte jej do každé z jamek adaptéru zadní stranou tužky, abyste zajistili řádné vyčištění vnitřku jamky.
- Vyčistěte nezávislé kanály:
 - Na nezávislých kanálech vyčistěte objímku pro vysunování špiček (vnější část pipetovacích kanálů) hadříkem nepouštějícím vlákna nasáklým přípravkem z deionizované vody a 70% ethanolu. (Viz *Referenční příručka k systému Hamilton Microlab STAR č. 15070074.*)
 - Vyčistěte zádržný kotouč a O-kroužky pipetovací hlavy (vnější část pipetovacích kanálů) hadříkem nepouštějícím vlákna nasáklým přípravkem z deionizované vody a 70% ethanolu.

- Vyčistěte pipetovací hlavu CORE 96:
 - Stejným hadříkem nepouštějícím vlákna nasáklým přípravkem z deionizované vody a 70% ethanolu vyčistěte kryt pipetovací hlavy 96 a dolní část zádržných kotoučů.
 - Stejným hadříkem nebo utrženým proužkem hadříku nasáklého přípravkem z deionizované vody a 70% ethanolu „třením ve stylu použití zubní nitě“ po obou stranách pipetovacích kanálů pipetovací hlavy CORE 96 vyčistěte O-kroužky. Opakujte tento postup pro každý pipetovací kanál hlavy CORE 96.
- Přední a boční kryt postříkejte přípravkem z deionizované vody a 70% ethanolu a otřete do sucha.
- Vyčistěte ochranný pás automatického vkládání hadříkem nasáklým přípravkem z deionizované vody a 70% ethanolu a vytřete jej bez použití tlaku.
- Když jsou plošina a součásti zcela suché, vyměňte držáky.

POZNÁMKA Nevhodné čištění a údržba systému ML STAR může mít za následek křížovou kontaminaci a špatnou účinnost rozborů.

Kontrola kvality

Vyhodnocením kontrolního materiálu se známými charakteristikami účinnosti lze zjistit rozdíly ve zpracování a technických postupech v laboratoři.

Zpracování kontrolního vzorku nebo kontrola bez šablony snižuje celkový počet neznámých vzorků od matky, které lze zpracovat s jednotlivými sadami pro přípravu vzorků.

Nepřekračujte limit 2 vzorků NTC na dávku 24 nebo 48 vzorků, resp. čtyř vzorků NTC na dávku 96 vzorků.

Návod k použití

Tipy a techniky

Pokud v protokolu není stanoven bod bezpečného přerušení, přejděte ihned k dalšímu kroku.

Označování desek čárovými kódy

- Čárové kódy pro desky s plným lemem začínají znaky PL.
- Čárové kódy pro desky s hlubokými jamkami začínají znaky DW.
- Čárové kódy lepte na desky s plným lemem a desky s hlubokými jamkami na bok vedle sloupečku 12.
- Pokud chcete umožnit automatizované skenování, vkládejte desky čárovým kódem orientovaným doprava.

Zapečetění a odpečetění desky

- Dbejte zvýšené opatrnosti, aby nedošlo ke křížové kontaminaci – na spodní straně těsnicí fólie by neměla být viditelná žádná kapalina.
 - Dbejte na to, aby se odkrytá spodní strana těsnicí fólie nedotýkala odkrytých jamek.
 - Dbejte na to, abyste se nedotýkali odkrytých jamek.
- Desku s 96 jamkami vždy zapečeťte před provedením následujících kroků protokolu:
 - Kroky odstředování.
 - Kroky teplotního cyklování.
- Při zapečetování desky přiložte na desku těsnicí fólii a poté proveďte zapečetění. Dbejte na to, abyste přitlačili na celou desku a aby byla každá jamka dobře utěsněna.
- Před odpečetěním desky proveďte následující kroky:
 - Krátce odstředujte desku s 96 jamkami při 1000 g po dobu 20 sekund.
 - Položte desku na rovný povrch a poté opatrně sejměte těsnicí fólii.

VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Před použitím proveďte a zdokumentujte požadovanou údržbu v souladu s pokyny výrobce.
- Během automatizovaných kroků sledujte systém ML STAR. Sledujte výzvy a pokyny pro obsluhu v uživatelském rozhraní softwaru VeriSeq NIPT Workflow Manager v2.
- Během použití ponechte přední kryt na místě.
- Během použití nesmí být na plošině žádné předměty.
- Pokud se během zpracování chyby zobrazí tlačítko **Exclude** (Vyloučit), v žádném případě tuto možnost nevybírejte. Pokud metodu není možné provést před zpracováním chyby nebo má omezené možnosti zpracování chyby, přerušete běh.
- Pokud k tomu budete během kroků vakuování desky vyzváni softwarem VeriSeq NIPT Workflow Manager v2, ručně pomozte vytvarovat těsnění mezi deskou a vakuovým sběrným potrubím.
- Počkejte, až systém automaticky vyhodí špičky z adaptéru. Nevyjímejte špičky ručně, pokud vás k tomu nevyzve software.
- Na pokyn softwaru Workflow Manager vyjměte spotřebované reagenty a použitý spotřební materiál.
- Každý den vyprázdněte nádoby na odpad z vakuování. První nádoba nesmí být nikdy zaplněna více než z jedné poloviny. Přetečení odpadu z vakuování může poškodit vakuovací pumpu a snížit podtlak použitý v systému.
- Před spuštěním metody pro dávky se 24, 48 a 96 vzorky vložte plný zásobník jednotlivě spočítaných 8kanálových špiček.

Zpracování vzorků

Postup

1. Pro každou poměrnou část projděte následující kroky:
 - a. Odstředivte vzorky s čárovým kódem při 1 600 g po dobu 10 minut při teplotě 4 °C s odjištěnou brzdou.
 - b. Když se odstředivka zastaví, vyjměte zkumavky se vzorky.
Nejpozději do 15 minut po odstředění zahajte izolaci plazmy. Pokud uplyne více než 15 minut, zopakujte odstředování.
2. U každé zkumavky zkontrolujte vhodnost vzorku ověřením následujících skutečností:
 - Objem vzorku odpovídá očekávání.
 - Po odstředění je patrné jasné oddělení vrstvy červených krvinek a plazmy ve vzorcích.
 - Úroveň plazmy je alespoň 1,5 ml nad vrstvou oddělující separované složky.
 - Vzorek není výrazně hemolyzovaný (tj. plazma není na pohled tmavě červená).
 - Vzorek není lipemický (tj. plazma není na pohled zakalená ani mléčně neprůhledná).
 - Vzorek neobsahuje sraženiny.



UPOZORNĚNÍ

Vzorky, které byly nesprávně skladovány nebo zpracovány, nemusejí být vhodné. V případě zpracování nevhodných vzorků v rámci pracovního postupu může při extrakci dojít k ucpání desky pro vazbu a k přetečení vzorků do sousedních jamek.

3. Sejměte uzávěry ze zkumavek a vložte je do držáků zkumavek. Vložte všechny vzorky a případné kontroly plazmy dané dávky.



UPOZORNĚNÍ

Pokud se během zpracování chyb zobrazí možnost Exclude (Vyloučit), nevybírejte ji. Pokud metoda po zpracování chyby nemůže pokračovat a máte omezené možnosti zpracování chyb, přerušete běh.

Izolace plazmy

Příprava

1. Označte jednu desku s hlubokými jamkami jako „Přechodná plazma“ a nalepte čárový kód.
2. Označte jednu desku s hlubokými jamkami jako „Konečná plazma“ a nalepte čárový kód.
3. Před spuštěním metody pro dávky se 24, 48 a 96 vzorky vložte plný zásobník jednotlivě spočítaných 8kanálových špiček.



UPOZORNĚNÍ

Opravte typ desky u desek Přejídná plazma a Konečná plazma. Použití zásobníku s hlubokými jamkami místo desky s hlubokými jamkami vede ke sloučení vzorků a může vést k nesprávným výsledkům.

Postup

1. Spusťte aplikaci AppLauncher a pak vyberte položku **VeriSeq NIPT Method**.
2. Zadejte jedinečné ID dávky a uživatelské jméno a pak vyberte tlačítko **OK**.
ID dávky může obsahovat maximálně 26 znaků. Můžete použít číslice, písmena, podtržítka (_) nebo pomlčky (-). Příklad: 2025-10-16_dávka3.
U ID dávky se nerozlišují velká a malá písmena. ID dávek s rozlišením malých a velkých písmen se nepovažují za jedinečné.
Názvy dávek musí být jedinečné a nesmí se lišit pouze ve velkých (malých) písmenech. Například názvy dávek Batch01 a batch01 nejsou jedinečné. Stejně pravidlo platí i pro názvy ID vzorků.
3. Vyberte možnost **New Batch** (Nová dávka).
4. Po zavedení zahajte izolaci plazmy výběrem tlačítka **OK**.
5. Proveďte jeden z následujících kroků:
 - Chcete-li načíst existující seznam vzorků, vyberte seznam vzorků přidružený k dávce a vyberte tlačítko **OK**.
 - Chcete-li pokračovat bez výběru seznamu vzorků, vyberte příkaz **No Sample Sheet** (Bez seznamu vzorků).

Postup vytvoření seznamu vzorků je popsán v *Příručce k softwaru VeriSeq NIPT Solution v2* (dokument č. 1000000067940).

POZNÁMKA Aby byla zajištěna správná analýza dat, musí být pro každý typ vzorku, jedináček nebo dvojčata, přesně zaznamenán každý vzorek. Pokud vyberete možnost **No Sample Sheet** (Bez seznamu vzorků), zkontrolujte, zda jste v nastavení Service Tools (Nástroje služby) softwaru Workflow Manager nastavili výchozí hodnoty vzorků. Další informace najdete v *Příručce k softwaru VeriSeq NIPT Solution v2* (dokument č. 1000000067940).

6. Vyberte velikost dávky a pak vyberte tlačítko **OK**.
7. Vyberte počet kontrol bez templátu a pak vyberte tlačítko **OK**.
Sloty NTC jsou vždy poslední vybrané sloty. Pokud budou například v běhu s 24 vzorky vybrány dvě kontroly NTC, budou na pozicích 23 a 24 kontroly NTC.

8. Zkontrolujte, zda jsou přilepeny všechny čárové kódy, a následně vložte do držáku vzorky, špičky a desky (s čárovými kódy směřujícími doprava).
9. Po zobrazení každé výzvy k vložení vyberte tlačítko **OK**.

Velikost dávky vzorků	Držák Typ	Dráha	Položka	Umístění
24, 48, 96	Špička	7–12	Špičky 1000 µl	5
			Špičky 1000 µl (pouze dávka 96)	4, 5
	Zkumavka	15	Připravené zkumavky s krevními vzorky 1–24 (pro všechny velikosti dávek)	1–24
	Zkumavka	16	Připravené zkumavky s krevními vzorky 25–48 (pro velikosti dávek 48 a 96)	25–48
	Zkumavka	17	Připravené zkumavky s krevními vzorky 49–72 (pro velikost dávky 96)	49–72
	Zkumavka	18	Připravené zkumavky s krevními vzorky 73–96 (pro velikost dávky 96)	73–96
	Multiflex	19–24	Prázdná deska s hlubokými jamkami, konečná plazma – s čárovým kódem	4
	Multiflex	19–24	Prázdná deska s hlubokými jamkami, přechodná plazma – s čárovým kódem	5
	Reagencie	47	[Volitelné] Fosfátový pufr Dulbecco (DPBS) – používá se pro kontrolu bez templátu (NTC)	5

10. Zkontrolujte, zda jsou držáky, laboratorní pomůcky a reagencie správně vloženy.
11. Na obrazovce Pre-Spin Deck Verification (Ověření plošiny pro předběžné roztočení) vyberte tlačítko **OK**.
12. Během automatizovaných kroků sledujte systém ML STAR.
13. Když vás k tomu vyzve software Workflow Manager, zkontrolujte, zda je vkládací plošina systému ML STAR zbavena všech překážek, aby mohl systém ML STAR vyložit držáky.
14. Výběrem příkazu **Unload** (Vyložit) vyložte plošinu.
15. Vyjměte desku s hlubokými jamkami obsahující přechodnou plazmu následujícím způsobem.
 - a. Zkontrolujte, zda deska obsahuje stejné objemy v každé jamce (tj. bez chyb pipetování). Očekávaný objem je 1 000 µl.
 - b. Při dokončení postupu izolace plazmy zaznamenejte veškeré nesrovnalosti.
 - c. Zapečete desku, vložte ji v rovnovážné poloze a odstřed'ujte při 5600 g po dobu 10 minut s odjištěnou brzdou nebo s lehkým brzděním.
16. Výběrem položky **Yes** (Ano) přejděte k poslednímu kroku přípravy plazmy.

17. Sejměte těsnicí fólii desky a znovu vložte desku do držáku.

Velikost dávky vzorků	Držák Typ	Dráha	Položka	Umístění
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Deska s hlubokými jamkami obsahující přechodnou plazmu	5

18. Zaškrtněte políčko **Intermediate Plasma plate has been spun** (Přechodná plazma byla roztočena) a pak vyberte tlačítko **OK**.

19. Během automatizovaných kroků sledujte systém ML STAR.

20. Když vás k tomu vyzve software Workflow Manager, zkontrolujte, zda je vkládací plošina systému ML STAR zbavena všech překážek, aby mohl systém ML STAR vyložit držáky.

21. Výběrem příkazu **Unload** (Vyložit) vyložte plošinu.

22. Když vás k tomu vyzve software Workflow Manager, vyprázdněte držáky a plošinu.

23. Vyjměte desku s hlubokými jamkami obsahující konečnou plazmu.

24. Zkontrolujte, zda na desce nejsou následující chyby:

- Nestejné objemy v jednotlivých jamkách. Očekávaný objem je 900 µl.
- Viditelné buněčné shluky.
- Nadměrná hemolýza.

Pokud pozorujete abnormální viditelné buněčné shluky nebo nadměrnou hemolýzu, zneplatněte dotyčný vzorek po skončení postupu izolace plazmy nebo použijte aplikaci Batch Manager. Další informace o aplikaci Batch Manager naleznete v *Příručce softwaru VeriSeq NIPT Solution v2 (dokument č. 1000000067940)*.

25. Když se zobrazí výzva v softwaru Workflow Manager, vyberte tlačítko **OK**.

26. Zadejte komentář k dotyčným jamkám a pak vyberte tlačítko **OK**.

27. Proveďte jeden z následujících kroků.

- Chcete-li pokračovat v extrakci cfDNA, vyberte možnost **Yes** (Ano).
- Pokud chcete skončit, vyberte možnost **Exit** (Konec).

BOD BEZPEČNÉHO PŘERUŠENÍ

Pokud musíte přerušit protokol, zapečte desku s konečnou plazmou a uskladněte ji při teplotě 2 až 8 °C (až 7 dní).

Extrakce cfDNA

Příprava

1. Očima prohlédněte sadu pro extrakci a sadu s příslušenstvím a ověřte, zda neuplynulo datum použitelnosti sady.

2. Připravte následující reagentie: Popište nádoby a držáky s hlubokými jamkami názvy reagentií.

Reagentie	Skladování	Pokyny
Deska s hlubokými jamkami obsahující konečnou plazmu	2 až 8 °C	Pokud byla předtím skladována, nechte ji odstát 30 minut, aby byla dosažena pokojová teplota. Odstředujte s nastavením 1 000 g po dobu 20 sekund. Před použitím desku s hlubokými jamkami obsahující konečnou plazmu odpečete.

3. Pomalu přidejte 3,75 ml proteinázového pufru do každé ampulky s reagentiemi proteinázy K.
- Připravte 3 ampulky pro 24 a 48 vzorků.
 - Připravte 4 ampulky pro 96 vzorků.
4. Uzavřete ampulky s proteinázou K a míchejte ve vortexové třepačce, dokud nedosáhnete resuspendace.



UPOZORNĚNÍ

Nekontaminujte gumovou zátku. Pokud se na gumovou zátku dostanou jiné látky, může to v budoucnu způsobit kontaminaci vzorků.

5. Sluňte připravenou proteinázu K ze všech ampulek do zkumavky na reagentie a označte ji jako Proteináza K.
6. Doplněte 100 ml 100% etanolu do každé lahvičky reagentií s promývacím pufrem II.
- Připravte 1 lahvičku pro 24 a 48 vzorků.
 - Připravte 2 lahvičky pro 96 vzorků.
7. Obráťte lahvičky s promývacím pufrem II, aby se obsah promíchal.
8. Zaškrtněte políčka na lahvičkách s promývacím pufrem II.
9. Označte 1 novou desku s plným lemlem jako Přejedná a nalepte čárový kód desky.
10. Označte 1 novou desku s plným lemlem jako Eluce cfDNA a nalepte čárový kód desky.
11. Označte 1 novou desku s plným lemlem jako Přejedná extrakce a nalepte čárový kód desky.
12. Přilepte čárový kód desky na desku pro vazbu DNA.
13. Nepoužité jamky s 24 a 48 vzorky zapečete těsnicí fólií.
14. Připravte čisticí roztok na bázi 70% etanolu (70 % etanolu, 30 % vody prosté DNáz/RNáz) pro čištění vakuovací soustavy.
15. Vakuovací soustavu připravte následujícím způsobem.
- Vyjměte vakuové sběrné potrubí a vyčistěte jej 70% etanolem.
Nečistěte těsnění etanolem, protože může způsobit křehnutí materiálu.
 - Vyprázdněte nádobku na odpad z vakuování.
 - Zkontrolujte, zda je zapnutá vakuovací soustava systému ML STAR.

Postup

1. Výběrem **OK** zahajte extrakci cfDNA.
2. Pokud není spuštěna aplikace **VeriSeq NIPT Method**:
 - a. Spusťte aplikaci AppLauncher a pak vyberte položku **VeriSeq NIPT Method**.
 - b. Zadejte ID dávky a uživatelské jméno a pak vyberte tlačítko **OK**.
3. Vložte špičky do držáků špiček podle následujícího postupu a pak vyberte tlačítko **OK**.



UPOZORNĚNÍ

Před spuštěním metody pro dávky se 24, 48 a 96 vzorky přidejte plný zásobník 8kanálových špiček.

Velikost dávky vzorků	Držák Typ	Dráha	Položka	Umístění
24	Špička	1–6	Špičky 1000 µl	1
		7–12	Špičky 300 µl	1
48	Špička	1–6	Špičky 1000 µl	1, 2
		7–12	Špičky 300 µl	1
96	Špička	1–6	Špičky 1000 µl	1, 2, 3, 4
		7–12	Špičky 300 µl	1

4. Vložte spočítané špičky do držáků špiček podle následujících pokynů.

Velikost dávky vzorků	Držák Typ	Dráha	Položka	Umístění
24, 48, 96	Špička	49–54	Špičky 1000 µl	1
			Špičky 300 µl	2
			Špičky 50 µl	3

5. Zadejte umístění první a poslední špičky z každého zásobníku špiček a pak vyberte tlačítko **OK**.

6. Naskenujte čárové kódy sady pro extrakci.
7. Zadejte uživatelské jméno nebo iniciály osoby připravující reagenty a pak vyberte tlačítko **OK**.
8. Naskenujte čárové kódy na sadě s příslušenstvím.
9. Zadejte uživatelské jméno nebo iniciály osoby připravující reagenty a pak vyberte tlačítko **OK**.
10. Zkontrolujte, zda jsou přilepeny čárové kódy.
11. V případě potřeby desku s hlubokými jamkami obsahující konečnou plazmu odpečete.
12. Vložte desky (s čárovým kódem směřujícím doprava) do držáku desek podle následujícího postupu a pak vyberte tlačítko **OK**.

Velikost dávky vzorků	Držák Typ	Dráha	Položka	Umístění
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Nová deska s plným lemem, přechodná, s čárovým kódem	1
			Nová deska s plným lemem, eluce cfDNA, s čárovým kódem	2
			Nová deska s hlubokými jamkami, přechodná extrakce, s čárovým kódem	4
			Deska s hlubokými jamkami obsahující konečnou plazmu, s čárovým kódem	5

13. Ověřte, zda je deska pro vazbu DNA opatřena čárovým kódem, a pak vyberte tlačítko **OK**.
14. V případě částečné dávky desek použijte na nepoužité jamky (sloupce 4–12 pro dávky se 24 vzorky a sloupce 7–12 pro dávky se 48 vzorky) zastřiženou těsnicí folii desky.
15. Položte desku pro vazbu DNA na vakuové sběrné potrubí čárovým kódem směřujícím doprava.
16. Před umístěním desky pro vazbu na sběrné potrubí BVS vizuálně zkontrolujte, zda nejsou jamky něčím blokovány.
To může bránit průtoku reagentů ve vakuu.
17. Pokud používáte dávky se 24 nebo 48 vzorky, zakryjte nepoužité jamky a zapečete je fólií. Zaškrtněte políčko **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (Jsou sloupce desky pro vazbu DNA zapečetěné?) a vyberte tlačítko **OK**.
18. Vložte zkumavky na reagenty do držáku reagentů podle následujícího postupu a pak vyberte tlačítko **OK**.

Velikost dávky vzorků	Držák Typ	Dráha	Položka	Umístění
24, 48	Reagenty	47	Eluční pufr 16 ml	1
			Proteináza K 11 ml	2
96	Reagenty	47	Eluční pufr 16 ml	1
			Proteináza K 15 ml	2

19. Přeneste stanovené reagenty do nádobek pro hluboké jamky a vložte nádoby do držáků pro hluboké jamky následujícím způsobem.
20. Vyberte tlačítko **OK**.

Velikost dávky vzorků	Držák Typ	Dráha	Položka	Umístění
24, 48	Hluboké jamky	39–44	Promývací pufr II 125 ml	1
			Promývací pufr I 125 ml	2
			100% etanol 60 ml	3
			Lyzační pufr 100 ml	4
			Voda prostá Dnáz/Rnáz 60 ml	5
96	Hluboké jamky	39–44	Promývací pufr II 200 ml	1
			Promývací pufr I 125 ml	2
			100% etanol 100 ml	3
			Lyzační pufr 100 ml	4
			Voda prostá Dnáz/Rnáz 100 ml	5

21. Počkejte na dokončení automatizované kontroly objemu reagentů.
22. Zkontrolujte, zda je nádoba na odpad z vakuování prázdná (doporučujeme ji naplnit do poloviny), a pak vyberte tlačítko **OK**.
23. Zkontrolujte umístění všech držáků, laboratorních pomůcek a reagentů a pak vyberte tlačítko **OK** na obrazovce Extraction Deck Verification (Ověření plošiny pro extrakci).
24. Během automatizovaných kroků sledujte systém ML STAR.



Je nutné ručně zneplatnit přetečení vzorků, která nebyla před kontaminací okolních jamek zjištěna systémem.

25. Po posledním kroku vakuování vyjměte desku pro vazbu DNA a vyčistěte spodní povrch 70% etanolem.
26. Zapečete případné nezakryté jamky na desce pro vazbu DNA a potom desku pro vazbu DNA vložte do prázdné desky s hlubokými jamkami obsahující konečnou plazmu.
27. Odstřed'ujte sestavu desky pro vazbu DNA s deskou s konečnou plazmou při 5600 g po dobu 10 minut se zapnutou brzdou.
28. Vyberte tlačítko **OK**.
29. Během odstřed'ování desky pro vazbu DNA dokončete čištění vakuovací soustavy:
- Vyjměte vakuové sběrné potrubí a pak vyberte tlačítko **OK**.
 - Počkejte na dokončení automatické likvidace odpadu.
 - Vyčistěte vakuové sběrné potrubí a vnitřek vakuovacího systému 70% etanolem a poté vraťte vakuové sběrné potrubí na místo.

- d. Zaškrtnutím políčka **Manifold is on Vacuum** (Sběrné potrubí je na vakuovací soustavě) zahajte přenos desky pro eluci na vakuové sběrné potrubí a pak vyberte tlačítko **OK**.
30. Po odstředění na desce pro vazbu DNA odpečete jamky obsahující vzorky.
31. Umístěte desku pro vazbu DNA na desku pro eluci cfDNA, která je na vakuovém sběrném potrubí.
32. Vložte desku pro vazbu DNA s čárovým kódem vpravo a pak vyberte tlačítko **OK**.
33. Během automatizovaných kroků sledujte systém ML STAR.
34. Po inkubaci vyberte zaškrťovací pole **Plates are assembled as indicated** (Desky jsou sestaveny podle pokynů). Zkontrolujte, zda je sestava desky pro vazbu DNA s deskou pro eluci cfDNA na stojanu (pokud je to vyžadováno odstředivkou).
35. Zapečete nezakryté jamky na desce pro vazbu DNA.
36. Odstřed'ujte při 5 600 g po dobu 2 minut se zapnutou brzdou a pak vyberte tlačítko **OK**.
37. Vizualně zkontrolujte, zda jev každé jamce desky pro eluci cfDNA stejný objem. Očekávaný objem je přibližně 55 µl.
38. Zapečete a uschovejte desku pro eluci cfDNA pro účely přípravy knihovny.
39. Když vás k tomu vyzve software Workflow Manager, zkontrolujte, zda je vkládací plošina systému ML STAR zbavena všech překážek, aby mohl systém ML STAR vyložit držáky.
40. Výběrem příkazu **Unload** (Vyložit) vyložte plošinu.
41. Vyložte všechny držáky a vyčistěte plošinu systému ML STAR. Pak vyberte tlačítko **OK**.
42. Zadejte komentář k dotyčným jamkám a pak vyberte tlačítko **OK**.
43. Proveďte jeden z následujících kroků:
- Chcete-li pokračovat v přípravě knihoven, vyberte možnost **Yes** (Ano).
 - Pokud chcete skončit, vyberte možnost **Exit** (Konec).

BOD BEZPEČNÉHO PŘERUŠENÍ

Pokud musíte přerušit protokol, zapečete desku pro eluci cfDNA a uskladněte ji při teplotě –25 až –15 °C (až 7 dní).

Příprava knihoven

Příprava

- Očima prohlédněte sadu pro přípravu knihoven a sadu s příslušenstvím a ověřte, zda neuplynulo datum použitelnosti obou sad.
- Připravte následující reagenty: Popište nádoby a držáky s hlubokými jamkami názvy reagentů.

Reagenty	Skladování	Pokyny
A-Tailing Mix (Směs A-Tailing)	-25 až -15 °C	Zajistěte rozmrazení při pokojové teplotě. Míchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
Deska pro eluci cfDNA	-25 až -15 °C	Pokud byla deska již dříve skladována, ověřte, zda skladování netrvalo déle než 7 dní a zda rozmrazení proběhlo při pokojové teplotě. Míchejte ve vortexové třepačce při 1500 ot./min po dobu 1 minuty. Odstředte s nastavením 1 000 g po dobu 20 sekund.
End Repair Mix (Směs pro opravu konců)	-25 až -15 °C	Zajistěte rozmrazení při pokojové teplotě. Promíchejte ve vortexové třepačce.
Hybridization Buffer (Hybridizační pufr)	-25 až -15 °C	Zajistěte rozmrazení při pokojové teplotě. Promíchejte ve vortexové třepačce. Po použití opět uskladněte.
Ligation Mix (Ligační směs)	-25 až -15 °C	Zajistěte rozmrazení při pokojové teplotě. Míchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
NIPT DNA Adapter Plate (Deska adaptéru DNA NIPT)	-25 až -15 °C	Zajistěte rozmrazení při pokojové teplotě. Promíchejte ve vortexové třepačce. Odstředte s nastavením 1 000 g po dobu 20 sekund.
Resuspenzační pufr	2 až 8 °C	Promíchejte ve vortexové třepačce. Po použití opět uskladněte.
Sample Purification Beads (Částice pro purifikaci vzorku)	2 až 8 °C	Nechte odstát 30 minut, aby byla dosažena pokojová teplota. Před každým použitím důkladně promíchejte vortexovou třepačkou. Míchejte ve vortexové nebo překlápěcí třepačce, dokud nedosáhnete homogenního rozptýlení všech částic v suspenzi nebo směsi.

**UPOZORNĚNÍ**

Při rozpečetování desky adaptéru DNA NIPT dbejte zvýšené opatrnosti, aby nedošlo ke křížové kontaminaci aerosolem z jamky do jamky, která může vést k nesprávným výsledkům.

3. Pokud byla deska pro eluci cfDNA uložena ve zmrazeném stavu, připravte ji následujícím způsobem.
 - a. Zajistěte rozmrazení při pokojové teplotě.
 - b. Míchejte ve vortexové třepačce při 1500 ot./min po dobu 1 minuty.
 - c. Odstřed'ujte s nastavením 1 000 g po dobu 20 sekund.
4. Označte jednu novou desku s plným lemlem jako „Knihovny“ a nalepte čárový kód desky.
5. Připravte roztok 80% EtOH z čistého EtOH. Smíchejte 40 ml 100% etanolu s 10 ml vody prosté Dnáz/Rnáz. Promíchejte v překlopné třepačce.
6. Zkontrolujte, zda je zapnuto řízení teploty v systému ML STAR.

Ředění enzymů

1. Smíchejte směs A-Tailing a resuspenzační pufr ve zkumavce se šroubovacím uzávěrem. Míchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'ete.

Velikost dávky vzorků	Směs A-Tailing (µl)	Resuspenzační pufr (µl)
24, 48	900	1 200
96	1 800	2 400

2. Smíchejte ligační směs a resuspenzační pufr ve zkumavce se šroubovacím uzávěrem. Míchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'ete.

Velikost dávky vzorků	Ligační směs (µl)	Resuspenzační pufr (µl)
24, 48	230	1 713
96	440	3 278

Postup

1. Výběrem tlačítka **OK** spusťte přípravu knihoven. Pokud ještě není otevřena aplikace **VeriSeq NIPT Method**:
 - a. Spusťte aplikaci AppLauncher a vyberte položku **VeriSeq NIPT Method**.
 - b. Zadejte ID dávky a uživatelské jméno a pak vyberte tlačítko **OK**.
2. Zkontrolujte, zda je následující spotřební materiál připraven podle informací na obrazovce Reagent Preparation (Příprava reagensů):
 - Směs A-Tailing, ligační směs a 80% EtOH.
 - Částice pro purifikaci vzorku, směs pro opravu konců a deska adaptéru DNA NIPT.
3. Zaškrtněte políčka a pak vyberte tlačítko **OK**.
4. Naskenujte čárové kódy sady pro přípravu knihovny.

5. Zadejte uživatelské jméno nebo iniciály osoby připravující reagentie a pak vyberte tlačítko **OK**.
6. Naskenujte čárové kódy na sadě s příslušenstvím.
7. Zadejte uživatelské jméno nebo iniciály osoby připravující reagentie a pak vyberte tlačítko **OK**.
8. Vložte špičky do držáků špiček podle následujícího postupu a pak vyberte tlačítko **OK** pro každý držák.

Velikost dávky vzorků	Typ držáku	Dráha	Položka	Umístění
24	Špička	1–6	Špičky 50 µl	1
		7–12	Špičky 300 µl	1, 2
48	Špička	1–6	Špičky 50 µl	1, 2
		7–12	Špičky 300 µl	1, 2, 3, 4
96	Špička	1–6	Špičky 50 µl	1, 2, 3, 4
		7–12	Špičky 300 µl	1, 2, 3, 4, 5

9. Pokud jste přerušili protokol po dokončení postupu extrakce cfDNA, vložte spočítané špičky do držáků špiček podle následujícího postupu.

Velikost dávky vzorků	Typ držáku	Dráha	Položka	Umístění
24, 48, 96	Špička	49–54	Špičky 1000 µl	1
			Špičky 300 µl	2
			Špičky 50 µl	3

10. Zadejte umístění první a poslední špičky z každého zásobníku špiček a pak vyberte tlačítko **OK**.
11. Zkontrolujte, zda jsou přilepeny čárové kódy, a vložte desky (s čárovými kódy směřujícími doprava) na držák desky podle následujícího postupu. Pak vyberte tlačítko **OK**.

Velikost dávky vzorků	Typ držáku	Dráha	Položka	Umístění
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Deska pro eluci cfDNA, s čárovým kódem	1
			Deska adaptéru DNA, s čárovým kódem	2
			Nová deska s plným lemem a 96 jamkami, knihovny, s čárovým kódem	3
			Nové desky s plným lemem a 96 jamkami	4, 5

12. Vložte držák pro hluboké jamky podle následujícího postupu a pak vyberte tlačítko **OK**.

Velikost dávky vzorků	Typ držáku	Dráha	Položka	Umístění
24, 48, 96	Hluboké jamky	39–44	50 ml 80% etanolu v zásobníku s hlubokými jamkami	1
			Nové desky s plným lemem a 96 jamkami	2, 3, 4, 5

13. Vložte zkumavky na reagentie do držáku reagentií podle následujícího postupu a pak vyberte tlačítko **OK**.

Velikost dávky vzorků	Typ držáku	Dráha	Položka	Umístění
24, 48, 96	Reagentie	47	Směs pro opravu vzorků 2,5 ml	1
			Připravená směs A-Tailing (celkový objem)	2
			Připravená ligační směs (celkový objem)	3
			Částice pro purifikaci vzorku 10 ml	4
			Hybridizační pufr 12 ml	5

14. Zbytek hybridizačního pufru 12 ml (HT1) uschovejte v zásobníku pro vkládání do fondu.

15. Zajistěte, aby byly držáky, laboratorní pomůcky a reagentie vloženy podle pokynů, a poté na obrazovce Library Deck Verification (Ověření plošiny knihovny) vyberte tlačítko **OK**.

16. Počkejte na dokončení automatizované kontroly objemu reagentií.

17. Během automatizovaných kroků sledujte systém ML STAR.

18. Když vás k tomu vyzve software Workflow Manager, zkontrolujte, zda je vkládací plošina systému ML STAR zbavena všech překážek, aby mohl systém ML STAR vyložit držáky.

19. Výběrem příkazu **Unload** (Vyložit) vyložte plošinu.

20. Zkontrolujte, zda je v každé jamce desky s knihovnamy stejný objem.



UPOZORNĚNÍ

Pokud se objemy jamek neshodují, mohou vzorky vést k nesprávným výsledkům.

21. Při uskladnění desky s knihovnamy zapečete a uschovejte.

22. Vyložte držáky, vyčistěte plošinu a pak vyberte tlačítko **OK**.

23. Zadejte komentář k dotyčným jamkám a pak vyberte tlačítko **OK**.

24. Proved'te jeden z následujících kroků:

- Chcete-li pokračovat v kvantifikaci knihoven, vyberte možnost **Yes** (Ano).
- Pokud chcete skončit, vyberte možnost **Exit** (Konec).

BOD BEZPEČNÉHO PŘERUŠENÍ

Pokud musíte přerušit protokol, desku s knihovnamy před uskladněním zapečete. Deska s knihovnamy je stabilní až po dobu 7 dní od data přípravy při teplotě -25 až -15 °C.

Kvantifikace knihoven**Příprava**

1. Připravte následující reagenty:

Reagencie	Skladování	Pokyny
Reagencie kvantifikace DNA	2 až 8 °C	Chraňte před světlem. Nechte 30–150 minut rozmrazit při pokojové teplotě. (Na začátku postupu přípravy knihoven je doporučeno vyjmutí reagentů.) Míchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
Standard kvantifikace DNA	2 až 8 °C	Míchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
Resuspenzační pufr	2 až 8 °C	Promíchejte ve vortexové třepačce.

2. Pokud byla deska s knihovnamy uložena ve zmrazeném stavu, připravte ji následujícím způsobem.
 - a. Ověřte, zda skladování netrvalo déle než 7 dní a zda rozmrazení proběhlo při pokojové teplotě.
 - b. Promíchejte ve vortexové třepačce.
 - c. Odstředte při 1 000 g po dobu 1 minuty.
3. 10 minut před použitím zapněte fluorometr.
4. Přilepte čárový kód desky na novou desku s 384 jamkami.
5. Přilepte čárový kód desky na novou desku s plným lemem.

Postup

1. Výběrem tlačítka **OK** zahájíte kvantifikaci.
2. Pokud ještě není otevřena aplikace VeriSeq NIPT Method:
 - a. Spusťte aplikaci AppLauncher a vyberte položku **VeriSeq NIPT Method**.
 - b. Zadejte ID dávky a uživatelské jméno a pak vyberte tlačítko **OK**.
3. Naskenujte čárové kódy na sadě s příslušenstvím.
4. Zadejte uživatelské jméno nebo iniciály osoby připravující reagenty a pak vyberte tlačítko **OK**.

5. Vložte špičky do držáku špiček podle následujícího postupu a pak vyberte tlačítko **OK**.

Velikost dávky vzorků	Typ držáku	Dráha	Položka	Umístění
24, 48	Špička	1–6	Zásobník špiček 300 µl	1
			Zásobník špiček 50 µl	2
96	Špička	1–6	Zásobník špiček 300 µl	1
			Zásobník špiček 50 µl	2, 3

6. Zkontrolujte, zda jsou přilepeny čárové kódy.
 7. V případě potřeby odpečete desku s knihovnami.
 8. Vložte desky (s čárovým kódem směřujícím doprava) do multiflexového držáku podle následujícího postupu a pak vyberte tlačítko **OK**.

Velikost dávky vzorků	Typ držáku	Dráha	Položka	Umístění
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Nové desky s plným lemem, s čárovým kódem	1
			Nová deska s 384 jamkami, s čárovým kódem	2
			Deska s knihovnami, s čárovým kódem	3
			Nové desky s plným lemem a 96 jamkami	4, 5

9. Vložte zkumavky na reagentie bez uzávěrů do držáku zkumavek podle následujícího postupu a pak vyberte tlačítko **OK**.

Velikost dávky vzorků	Typ držáku	Dráha	Položka	Umístění
24, 48, 96	Zkumavka	46	Standard kvantifikace DNA	1
			Reagentie kvantifikace DNA	2

10. Vložte zkumavky na reagentie do držáku reagentií podle následujícího postupu a pak vyberte tlačítko **OK**.

Velikost dávky vzorků	Typ držáku	Dráha	Položka	Umístění
24, 48, 96	Reagentie	47	Nová zkumavka na reagentie (prázdná)	1
			Resuspenzační pufr 16 ml	2

11. Pokud jste přerušili protokol po dokončení postupu přípravy knihovny, vložte spočítané špičky do držáků špiček podle následujícího postupu.

Velikost dávky vzorků	Typ držáku	Dráha	Položka	Umístění
24, 48, 96	Špička	49–54	Špičky 1000 µl	1
			Špičky 300 µl	2
			Špičky 50 µl	3

12. Zadejte umístění první a poslední špičky z každého zásobníku špiček a pak vyberte tlačítko **OK**.
13. Zajistěte, aby byly držáky, laboratorní pomůcky a reagentie vloženy podle pokynů, a pak na obrazovce Quant Deck Verification (Ověření plošiny kvantifikace) vyberte tlačítko **OK**.
14. Počkejte na dokončení automatizované kontroly objemu reagentií.
15. Během automatizovaných kroků sledujte systém ML STAR.
16. Když vás k tomu vyzve software Workflow Manager, zkontrolujte, zda je vkládací plošina systému ML STAR zbavena všech překážek, aby mohl systém ML STAR vyložit držáky.
17. Výběrem příkazu **Unload** (Vyložit) vyložte plošinu.
18. Vyložte desku s knihovnamí.
- Zkontrolujte, zda je v každé jamce desky stejný objem.
 - Zapečete desku s knihovnamí a uskladněte ji při pokojové teplotě, dokud není dokončena analýza fluorometrických dat.
19. Vložte zbývající desky s 96 jamkami a zkontrolujte, zda je v každé jamce stejný objem.
Hrubé chyby objemu mohou ukazovat na problém s kroky pipetování.
20. Vyložte desku s 384 jamkami a zkontrolujte, zda se v příslušných jamkách nachází kapalina.
21. Zapečete desku těsnicí fólií.
22. Odstřed'ujte s nastavením 1 000 g po dobu 20 sekund.
23. Inkubujte 10 minut při pokojové teplotě, chraňte před světlem.
24. Vyložte všechny držáky.
25. Vyčistěte plošinu systému ML STAR. Pak vyberte tlačítko **OK**.



UPOZORNĚNÍ

Reagentie kvantifikace nelikvidujte, dokud nezískáte data. Reagentie budete potřebovat pro případ, kdy bude nutné provést opětovnou kvantifikaci.

26. Po inkubaci sejměte těsnicí fólii a vložte desku s 384 jamkami na čtečku mikrodosky. Ujistěte se, že jste použili fialovou desku adaptéru (kat. č. 0310-4336) dodanou společností Molecular Devices nebo ekvivalentní desku, pokud to použitý přístroj umožňuje.
- Zajistěte, aby při vkládání byla pozice A1 v levém horním rohu.
27. Dvojitým výběrem šablony VeriSeq NIPT ji otevřete v softwaru SoftMax Pro.

28. Na kartě Home (Domů) vyberte možnost **New Experiment** (Nový pokus).
29. Vyberte možnost **Read** (Číst).
30. Následujícím způsobem exportujte data ve formátu XML.
 - a. Pravým tlačítkem vyberte možnost **Plate** (Deska) a vyberte příkaz **Rename** (Přejmenovat).
 - b. Naskenujte čárový kód desky pro kvantifikaci a pak vyberte tlačítko **OK**.
 - c. V levém horním rohu obrazovky vyberte ikonu desky a v nabídce vyberte příkaz **Export** (Exportovat).
 - d. Zaškrtněte políčko **Expt name** (Název exportu), nastavte možnost data desky na nezpracované, nastavte výstupní formát na XML a pak vyberte tlačítko **OK**.
 - e. Zadejte cestu a název výstupního souboru a pak vyberte příkaz **Save** (Uložit).Počítač se systémem Hamilton musí mít přístup k umístění. Nepoužívejte v cestě ani názvu souboru mezery.

Analýza

1. Na obrazovce Scanner Information (Informace o skeneru) v systému ML STAR zadejte ID fluorometru.
2. Zadejte komentář k běhu fluorometru a pak vyberte tlačítko **OK**.
3. Přejděte k souboru *.xml kvantifikace, který obsahuje fluorometrická data, a pak vyberte tlačítko **OK**.
4. Zkontrolujte standardní křivku a výsledky analýzy koncentrace vzorku a pak vyberte tlačítko **OK**.
5. Pokud potřebujete desku přeskenovat, vyberte příkaz **Rescan** (Přeskenovat).

Vzorky jsou citlivé na stárnutí a působení světla. V případě nutnosti proveďte okamžité přeskenování.
6. Zadejte komentář k dotyčným jamkám a pak vyberte tlačítko **OK**.
7. Vyhodnoťte výsledky a postupujte podle následujících pokynů.
 - Pokud výsledky vyhovují specifikaci, pokračujte k části [Fondy knihoven na straně 38](#). Specifikace najdete v tabulce Metriky a meze kontroly kvality kvantitativního vyjádření v *Příručce k softwaru VeriSeq NIPT Solution v2 (dokument č. 1000000067940)*.
 - Pokud výsledky nevyhovují specifikaci, systém přeruší metodu. Zopakujte postupy kvantifikace počínaje částí [Příprava na straně 34](#).
8. Proveďte jeden z následujících kroků:
 - Chcete-li pokračovat k části [Fondy knihoven na straně 38](#), vyberte možnost **Yes** (Ano).
 - Pokud chcete skončit, vyberte možnost **Exit** (Konec).

BOD BEZPEČNÉHO PŘERUŠENÍ

Pokud musíte přerušit protokol, desku s knihovnami před uskladněním zapečetejte. Deska s knihovnami je stabilní až po dobu 7 dní kumulativního skladování při teplotě -25 až -15 °C.

Fondy knihoven

Příprava

1. Připravte následující reagensie:

Reagensie	Skladování	Pokyny
Hybridization Buffer (Hybridizační pufr)	-25 až -15 °C	Zajistěte rozmrazení při pokojové teplotě. Promíchejte ve vortexové třepačce. Po použití opět uskladněte.

2. Pokud byla deska s knihovnamí uložena ve zmrazeném stavu, připravte ji následujícím způsobem.
 - a. Ověřte, zda skladování netrvalo déle než 7 dní a zda rozmrazení proběhlo při pokojové teplotě.
 - b. Míchejte ve vortexové třepačce při 1500 ot./min po dobu 1 minuty.
 - c. Odstřed'ujte s nastavením 1 000 g po dobu 20 sekund.
 - d. Použitím pipety promíchejte.
3. Označte prázdnou zkumavku pro slučování jako „Fond A“. U 96 vzorků označte druhou prázdnou zkumavku pro slučování jako „Fond B“.
4. Uložte následující program denaturace do termocykléru s vyhříváním víkem.
 - a. Zvolte možnost předeřhátého víka a nastavte teplotu 102 °C.
 - b. Nastavte reakční objem na 50 µl.
 - c. Nastavte rychlost stoupaní teploty na maximum (≥2 °C za sekundu).
 - d. Inkubujte při teplotě 96 °C po dobu 10 minut a poté při teplotě 4 °C po dobu 5 sekund.
 - e. Udržujte při teplotě 4 °C.

Postup

1. Vložte desku s knihovnamí na předprogramovaný termocyklér a spusťte program denaturace. Desku s knihovnamí nedenaturujte dříve, než kvantifikace projde metrikami kontroly kvality, protože může být nutné provedení opětovné kvantifikace.
2. Odstřed'ujte desku s knihovnamí při 1 000 g po dobu 20 sekund.
3. Výběrem **OK** spusťte fondy knihoven.
4. Pokud není spuštěna aplikace VeriSeq NIPT Method:
 - a. Spusťte aplikaci AppLauncher a vyberte položku **VeriSeq NIPT Method**.
 - b. Zadejte ID dávky a uživatelské jméno a pak vyberte tlačítko **OK**.
5. Vyberte koncentraci fondu a pak vyberte tlačítko **OK**.
Cílová hustota klastru je 220–260 K/mm².

POZNÁMKA Pro dávky se 24 vzorky může být nutné zvýšit koncentrace a/nebo objemy fondů, aby se zachovala podobná hustota klastrů jako u dávek se 48/96 vzorky.

6. Pokud se zobrazí výzva softwaru Workflow Manager, proveďte jeden z následujících kroků:
- Chcete-li načíst seznam vzorků, vyberte seznam vzorků přidružený k dávce a pak vyberte příkaz **Load** (Načíst).
 - Chcete-li použít výchozí hodnoty systému pro zbývající typy vzorků, hlášení pohlaví nebo typ vyšetření, vyberte u každého nastavení příkaz **Use Default** (Použít výchozí).
Postup vytvoření seznamu vzorků je popsán v *Příručce k softwaru VeriSeq NIPT Solution v2 (dokument č. 1000000067940)*.

7. Výběrem možnosti **Start** (Zahájit) spustíte odpočet desky pro denaturaci.

8. Vložte špičky do držáků špiček podle následujících pokynů.

Velikost dávky vzorků	Typ držáku	Dráha	Položka	Umístění
24, 48, 96	Špička	7–12	Filtrační špičky 50 µl	1

9. Vložte desku s denaturovanou knihovnou (s čárovým kódem směřujícím doprava) do multiflexového držáku podle následujícího postupu a pak vyberte tlačítko **OK**.

Velikost dávky vzorků	Typ držáku	Dráha	Položka	Umístění
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Deska s denaturovanou knihovnou (s čárovým kódem)	1

10. Vložte zkumavky pro slučování do držáku zkumavek podle následujícího postupu a pak vyberte tlačítko **OK**.

Velikost dávky vzorků	Typ držáku	Dráha	Položka	Umístění
24, 48	Zkumavka	46	Nová 2ml zkumavka, fond A	1
96	Zkumavka	46	Nová 2ml zkumavka, fond A	1
			Nová 2ml zkumavka, fond B	2

11. Vložte zkumavky na reagentie do držáku reagentií podle následujícího postupu a pak vyberte tlačítko **OK**.

Velikost dávky vzorků	Typ držáku	Dráha	Položka	Umístění
24, 48, 96	Reagentie	47	Hybridizační pufr 3 ml	1

12. Vložte špičky do držáků špiček podle následujících pokynů.

Velikost dávky vzorků	Typ držáku	Dráha	Položka	Umístění
24, 48, 96	Špička	49–54	Filtrační špičky 1000 µl	1
			Filtrační špičky 300 µl	2
			Filtrační špičky 50 µl	3

13. Zadejte umístění první a poslední špičky z každého zásobníku špiček a pak vyberte tlačítko **OK**.
14. Zkontrolujte, zda jsou držáky, laboratorní pomůcky a reagentie vloženy podle pokynů.
15. Na obrazovce Pooling Deck Verification (Ověření plošiny slučování) vyberte tlačítko **OK**.
16. Během automatizovaných kroků sledujte systém ML STAR.
17. Zadejte komentář k dotyčným jamkám a pak vyberte tlačítko **OK**.
18. Když vás k tomu vyzve software Workflow Manager, zkontrolujte, zda je vkládací plošina systému ML STAR zbavena všech překážek, aby mohl systém ML STAR vyložit držáky.
19. Výběrem příkazu **Unload** (Vyložit) vyložte plošinu.
20. Vyložte držák zkumavek.
21. Nasadte uzávěry na všechny zkumavky pro slučování, promíchejte vortexovou třepačkou a poté krátce odstředte.
22. Vyberte tlačítko **OK**.
23. Sekvenujte knihovny co nejdříve po sloučení do fondu. Zapečete desku s knihovnami a skladujte ji při teplotě $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu maximálně 7 dní, aby bylo možno znovu provést opětovné sloučení do fondu.

BOD BEZPEČNÉHO PŘERUŠENÍ

Pokud musíte přerušit protokol, zavřete zkumavky pro slučování a uskladněte je při teplotě $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ (až 7 dní).

Příprava knihoven sloučených ve fondu na sekvenování

Příprava

1. Připravte následující reagentie:

Reagentie	Skladování	Pokyny
Zkumavky fondu	$-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$	Pokud byly zkumavky dříve skladovány, nechte je rozmrazit při pokojové teplotě. Krátce promíchejte ve vortexové třepačce. Krátce odstředte.

2. Připravte systém sekvenování nové generace vyplněním následujících polí v modulu Local Run Manager VeriSeq NIPT Module:
 - a. Run Name (Název běhu)
 - b. **[Volitelné]** Run Description (Popis běhu)
 - c. Pool Barcode (Čárový kód fondu)



UPOZORNĚNÍ

Čárový kód fondu zadaný v modulu LRM musí odpovídat čárovému kódu fondu zadanému v aplikaci Workflow Manager. Nesprávné konfigurace běhu jsou softwarem pro analýzu zamítnuty a vyžadují opětovné sekvenování.

Další informace k používání modulu Local Run Manager VeriSeq NIPT Module najdete v *Příručce k softwaru VeriSeq NIPT Solution v2 (dokument č. 1000000067940)*.

Postup

1. Zkombinujte následující objemy do kazety reagentů a poté je použitím pipety promíchejte.
 - Hybridizační pufr (900 µl)
 - 450 µl Fond A (450 µl)
2. Pokračujte v sekvenování pomocí systému pro sekvenování nové generace podle příručky k systému. referenční příručka přístroje pro sekvenování nové generace. Informace k systému *NextSeq 550Dx* najdete v *Referenční příručce přístroje NextSeq 550Dx (dokument č. 1000000009513)* nebo *příložené dokumentaci přístroje NextSeq 550Dx (dokument č. 1000000043133)*.
3. Když se zobrazí výzva, potvrďte správnou konfiguraci běhu.
4. V případě nutnosti tento postup opakujte pro fond B.
 - Za účelem dosažení cílového rozsahu hustoty klastru je možné desku knihovny opětovně sloučit do fondu pomocí jiné koncentrace slučování do fondu v systému Hamilton. Opětovné sloučení do fondu způsobí zneplatnění původního fondu.
 - Případně je možné poměr fondu pro HT1 (450 µl + 900 µl) změnit za účelem dosažení cílového rozsahu hustoty klastru.

Sekvenování nové generace

Test VeriSeq NIPT Solution v2 lze použít se systémem pro sekvenování nové generace s následujícími specifikacemi:

- možnost čtení párových konců s 2x 36 bázemi,
- kompatibilita s indexovými adaptéry v sadě pro přípravu vzorků VeriSeq NIPT,
- chemie založená na dvou kanálech,
- automatické vytváření souborů .BCL (nezpracovaná data z přístroje pro sekvenování),
- 400 milionů čtení párových konců na jeden běh,
- kompatibilita se softwarem VeriSeq NIPT Assay Software v2.

Systém NextSeq 550Dx je kompatibilní s testem VeriSeq NIPT Solution v2.

Analýza dat sekvenování

Po dokončení sekvenování jsou data sekvenování automaticky odeslána do softwaru VeriSeq NIPT Assay Software v2 k analýze a vytvoření výkazu. Součástí výkazu jsou klasifikace každého vzorku v dávce a hodnocení všech metrik kontroly kvality běhu. Proces analýzy od dokončení sekvenování až k získání konečných výsledků pro dávku 48 vzorků trvá přibližně 4 hodiny. Podrobné informace o analýze dat a výstupním souboru naleznete v příručce k softwaru *VeriSeq NIPT Solution v2 (dokument č. 1000000067940)*.

Interpretace výsledků

Algoritmus VeriSeq NIPT Solution v2 využívá propracovaný statistický model, který kombinuje několik různých typů informací z odběru párových konců sekvenovaných fragmentů knihovny. Tento model se používá k detekci oblastí genomu, které jsou v knihovně jednotlivého vzorku zastoupeny v příliš malé nebo velké míře. Důležité je, že tento model je odpovědný za to, zda míra nízkého nebo vysokého zastoupení je kvantitativně konzistentní s aneuploidní událostí ve fetálním genomu na úrovni fetální frakce odhadované pro knihovnu.

V případě všech chromozomů se data sekvenování párových konců uspořádají podle referenčního genomu (HG19). Jedinečná, neduplicitní uspořádaná čtení se agregují do 100kb košů. Odpovídající počty košů se upraví podle odchylky GC a podle dříve stanoveného genomického pokrytí v závislosti na oblasti. Při použití takových počtů normalizovaných košů se statistická skóre pro každý autozom odvozuje porovnáním oblastí pokrytí, které lze ovlivnit aneuploidii se zbytkem autozomů. LLR (věrohodnostní poměr) se vypočítá pro jednotlivé vzorky tak, že se zohlední tato skóre podle pokrytí a odhadovaná fetální frakce. LLR představuje pravděpodobnost ovlivnění vzorku na základě pozorovaného pokrytí a fetální frakce oproti pravděpodobnosti, že vzorek ovlivněný nebude na základě stejného pozorovaného pokrytí. Výpočet tohoto poměru zohledňuje také odhadovanou nepřesnost ve fetální frakci. V následných výpočtech se použije přirozený logaritmus tohoto poměru. Assay Software posoudí LLR každého cílového chromozomu a každého vzorku, aby mohl zajistit určení aneuploidie.

Při vytváření dávky musíte definovat typ vzorku (jednočetný nebo dvojče), typ vyšetření (základní nebo celogenomové) a hlášení pohlavního chromozomu pohlaví (Yes (Ano), No (Ne) a SCA (aneuploidie pohlavních chromozomů)) požadované pro jednotlivé vzorky. Společně tyto možnosti určují informace hlášené pro jednotlivé vzorky.

U všech typů vzorků typ vyšetření určuje, které autozomální anomálie budou hlášeny. U základního typu vyšetření jsou hlášeny pouze události trizomie celého chromozomu včetně chromozomů 13, 18 a 21. U typu celogenomového vyšetření je hlášena celá nebo částečná delece chromozomu nebo duplikace autozomálního chromozomu. Délka nejmenší vykazovatelné částečné delece nebo duplikace chromozomu je 7 Mb.

U vzorků jednočetných těhotenství můžete deaktivovat hlášení pohlavního chromozomu. Můžete také nakonfigurovat hlášení aneuploidii pohlavního chromozomu buď s hlášením pohlaví euploidních vzorků, nebo bez něj.

Pokud je v případě vzorků dvoučetných těhotenství vybrána u hlášení pohlavního chromozomu možnost Yes (Ano), je výsledek omezen na hlášení přítomnosti nebo nepřítomnosti chromozomu Y v knihovně. Aneuploidii pohlavního chromozomu nelze hlásit v případě vzorků dvoučetných těhotenství.

Výsledek ANOMALY DETECTED (Byla detekována anomálie) označuje, že je vyšetření vzorku pozitivní na jednu nebo více anomálií konzistentních s vybraným typem vyšetření a možností hlášení pohlavního chromozomu. Když je detekována anomálie, hlášení poskytne popis anomálie v cytogenetickém zápisu.

Software VeriSeq NIPT Assay Software v2 využívá k určení odhadované fetální frakce jednotlivých vzorků statistiku vytvořenou během sekvenování. Odhadovaná fetální frakce je odhadem složky cfDNA plodu, která je získána rozborem a vykázána jako zaokrouhlená procentní hodnota pro každý vzorek. Průměrná směrodatná odchylka tohoto odhadu přes všechny vzorky je 1,3 %. Odhadovaná fetální frakce není určena během izolace k vyloučení vzorků při vykazování výsledků.

Aby mohl software VeriSeq NIPT Assay Software v2 určit zastoupení chromozomů, používá individualizovanou zkoušku iFACT (Fetal Aneuploidy Confidence Test). Jde o metriku s dynamickým prahem, která označuje, zda systém s použitým odhadem fetální frakce každého vzorku vytvořil dostatečné pokrytí sekvenování. Negativní přiřazení je hlášeno, pouze pokud vzorek splňuje hranici iFACT. Pokud vzorek této prahové hodnoty nedosáhne, hodnocení kontroly kvality zobrazí zprávu FAILED iFACT (ZKOUŠKA iFACT NEÚSPĚŠNÁ) a systém nevytvoří žádný výsledek.

Kromě zkoušky iFACT provádí VeriSeq NIPT Assay Software v2 v průběhu analýzy hodnocení několika dalších metrik kontroly kvality. Mezi další metriky patří hodnocení rovnoměrnosti pokrytí referenčních genomických oblastí a rozdělení délek fragmentů cfDNA. Hodnocení kontroly kvality zobrazí buď příznak kontroly kvality, nebo chybu kontroly kvality pro každou metriku, která je mimo přípustný rozsah. V případě chyby kontroly kvality vzorku systém nevytvoří výsledek. Pokud vzorek neprojde kontrolou kvality, lze vzorek zpracovat znovu za předpokladu, že ve zkumavce s odebranou krví je dostatečný objem plazmy.

Test VeriSeq NIPT Solution v2 generuje data určená k použití v konečném výkazu. Negeneruje konečný výkaz pro pacienta. Za doručení návrhu a obsahu konečného výkazu k lékaři v místě poskytování péče zodpovídají zákazníci. Společnost Illumina nenese odpovědnost za přesnost formulací v konečném výkazu pro zákazníka.



UPOZORNĚNÍ

Zkontrolujte odhady fetální frakce všech vzorků. Pokud jsou odhady fetální frakce pro všechny vzorky v rámci běhu podobné, mohlo dojít ke sloučení vzorků, které ovlivnilo výsledky. Obráťte se na technickou podporu společnosti Illumina s žádostí o pomoc při řešení problémů.

Charakteristiky účinnosti

Následující data popsaná v částech věnovaných klinické a analytické účinnosti byla vytvořena pomocí protokolů a materiálů popsaných v návodu k použití vycházejících z plazmy. Všechna data sekvenování v této části byla vytvořena systémem pro sekvenování NextSeq 500/550 nebo systémem pro sekvenování NextSeq 550Dx s následujícími konfiguracemi:

	NextSeq 500/550	NextSeq 550Dx
Software přístroje	Řídicí software NextSeq 4.0	Obslužný software NextSeq 1.3

	NextSeq 500/550	NextSeq 550Dx
Verze sady reagensí	Sada reagensí NextSeq 500/550 High Output v2.5 (75 cyklů)	Sada reagensí NextSeq 550Dx High Output v2.5 (75 cyklů)
Metoda sekvenování	Běh sekvenování párových konců s 2x 36 bázemi v režimu vysokého výkonu	Běh sekvenování párových konců s 2x 36 bázemi v režimu vysokého výkonu

Klinická studie

Klinická přesnost testu VeriSeq NIPT Solution v2 byla prokázána vyhodnocením vzorků plazmy těhotných žen s jednočetnými či dvoučetnými těhotenstvími. Vzorky byly získány ze vzorků plazmy z banky, zbavených identifikace, které byly předtím zpracovány ze vzorků periferní plné krve. Pro zařazení do studie bylo zvažováno více než 45 000 vzorků. Tyto vzorky prošly předchozím prenatalním vyšetřením aneuploidii chromozomů plodu a částečných delecí a duplikací v 7 Mb nebo více. Všechny vzorky z postižených těhotenství a podskupina po sobě jdoucích vzorků z nepostižených těhotenství byly způsobilé pro testování, pokud byly k dispozici klinické výsledky a byla splněna kritéria vzorků. V testovací sadě pro analýzu bylo celkem 2 335 vzorků. 2 328 vzorků této sady pocházelo z jednočetných těhotenství a sedm vzorků z dvoučetných těhotenství.

28 (1,2 %, 28/2 335) z těchto vzorků neprošlo napoprvé kvalitou kontroly rozboru během analýzy dokončených dat sekvenování:

- 27 vzorků neprošlo zkouškou iFACT (jeden XO, 26 nepostiženo)
- U jedné chyby byla data mimo očekávaný rozsah

Demografické údaje a charakteristika těhotenství

Údaje o věku, délce těhotenství a trimestru těhotenství matky viz [Tabulka 7](#) pro vzorky v rámci celogenomového vyšetření včetně vzorků se známým mozaicizmem. Většina (98 %) testovaných vzorků je z prvního trimestru těhotenství.

Demografie byly hodnoceny mezi základními a celogenomovými kohortami a nevykázaly žádný statistický rozdíl. Demografické údaje a charakteristiky těhotenství byly podobné bez ohledu na to, zda byly zahrnuty nebo vyloučeny známé mozaiky.

Tabulka 7 Demografické údaje a charakteristika těhotenství

Souhrnná statistika	Celogenomová (včetně známé mozaiky)
Počet vzorků	2307*
Věk matky – roky	
Střední hodnota	35,08
Směrodatná odchylka	4,04
Medián	34,95
25. percentil, 75. percentil	32,31, 37,79
Minimum, maximum	20,22, 53,02
Délka těhotenství při odběru krve (v týdnech)	
Střední hodnota	10,93
Směrodatná odchylka	1,20
Medián	10,57
25. percentil, 75. percentil	10,29, 11,14
Minimum, maximum	10,00, 27,86
Trimestr těhotenství – n (%)	
< První (< 14 týdnů)	2,252 (98 %)
Druhý	54 (2 %)
Třetí (≥ 27 týdnů)	1 (0 %)

* Prezentované konečné vzorky obsahovaly 7 dvojčat.

Klinická účinnost

Výsledky zjištěné rozborem VeriSeq NIPT Solution v2 byly porovnány s klinickými referenčními standardními závěry. Všechny vzorky studie měly klinické referenční standardní závěry (klinická „pravda“) vztažené na stav aneuploidie chromozomů plodu a částečné delece a duplikace velikosti 7 Mb nebo vyšší. Klinické referenční standardní závěry pro vzorky zahrnuté ve studii závisely na výsledcích analýzy chromozomů nebo na fyzickém vyšetření novorozence prostřednictvím negativního vyšetření NIPT založeného na sekvenování nové generace (NGS). Vyškolení pracovníci v rámci studie provedli klasifikaci klinických referenčních standardních dat v souladu s dokumentem Kódy ve zdravotnictví od sponzora.

Metody analýzy chromozomů zahrnovaly určení karyotypu, fluorescenční in situ hybridizaci (FISH) nebo komparativní genomovou hybridizaci na mikročipu (CMA). Analýza chromozomů byla provedena na periferní krvi nebo slinách novorozenců nebo kojenců, vzorcích produktů koncepce (POC), amniocytech, choriových klcích, tkáních placenty nebo postnatální pupečnickové krvi.

Mozaicismus je definován jako přítomnost dvou nebo více buněčných linií odlišného chromozomálního složení u jedince. Buněčné linie mají původ ve stejné zygotě. Typ a úroveň mozaicismu se liší a závisí na načasování událostí souvisejících s mozaicismem během embryonálního vývoje a vývoje plodu. V prenatalních diagnózách se vyskytují různé typy mozaicismu v závislosti na distribuci abnormálních a normálních buněčných linií v cytotrofoblastu, mezenchymu nebo plodu.¹⁰ I když lze mozaicismus zaznamenat u každé chromozomální anomálie, jeho prevalence u vzácných trizomií je vyšší než u trizomií chromozomů 21, 18 a 13 (T21, T18 a T13).¹¹ Při vyhodnocování účinnosti byly do analýzy celého genomu zahrnuty případy mozaik, protože účelem tohoto typu vyšetření při tomto rozboru je zjištění vzácných autozomálních aneuploidií (RAA).

Účinnost základního vyšetření

U základního vyšetření jsou mezi anomálie zahrnuty trizomie T21, T18 a T13. V analýze bylo zahrnuto celkem 2 243 vzorků jednočetných a dvoučetných těhotenství. U všech sedmi dvoučetných těhotenství byla správně detekována trizomie chromozomu 21 (T21) a nejsou reportována v následující tabulce.

Tabulka 8 Citlivost a specifická testu VeriSeq NIPT Solution v2 pro detekci trizomií chromozomu 21, 18 a 13 při základním vyšetření u jednočetných těhotenství (včetně známé mozaiky)

	T21	T18	T13
Citlivost	> 99,9 % (130/130)	> 99,9 % (41/41)	> 99,9 % (26/26)
Oboustranný 95% interval spolehlivosti	97,1 %, 100 %	91,4 %, 100 %	87,1 %, 100 %
Specifická	99,90 % (1982/1984)	99,90 % (1995/1997)	99,90 % (2000/2002)
Oboustranný 95% interval spolehlivosti	99,63 %, 99,97 %	99,64 %, 99,97 %	99,64 %, 99,97 %

Účinnost rozboru u základního vyšetření uvedená v [Tabulka 8](#) je vypočtena bez podmnžiny 64 vzorků postižených vzácnými autozomálními aneuploidiemi, autozomálními částečnými delecemi či duplikacemi nebo známým mozaicismem. Těchto 64 vzorků zahrnovalo osm mozaik T21 a tři mozaiky T18. U pěti z těchto 11 vzorků bylo identifikováno postižení anomálií zjištěnou softwarem VeriSeq NIPT Assay Software v2.

Účinnost celogenomového vyšetření

V případě celogenomového vyšetření veškeré anomálie obsahují trizomie, monozomie a částečné delecce nebo duplikace v 7 Mb nebo více. Vzorky celogenomového vyšetření obsahovaly 36 vzorků se známým mozaicismem. Testováno bylo celkem 2 307 vzorků jednočetných a dvoučetných těhotenství. U všech sedmi dvoučetných těhotenství byla správně detekována anomálie chromozomu 21 a nejsou reportována v následujících tabulkách.

Účinnost celogenomového vyšetření pro libovolnou anomálii

Tabulka 9 Citlivost a specifická testu VeriSeq NIPT Solution v2 pro detekci libovolné anomálie při celogenomovém vyšetření (včetně známé mozaiky)

	Citlivost	Specifická
Odhad % (n/N)	95,5 % (318/333)	99,34 % (1954/1967)
Oboustranný 95% interval spolehlivosti	92,7 %, 97,3 %	98,87 %, 99,61 %

Účinnost celogenomového vyšetření pro vzácnou autozomální aneuploidii

Tabulka 10 Citlivost a specifická testu VeriSeq NIPT Solution v2 pro detekci vzácné autozomální aneuploidie (RAA) při celogenomovém vyšetření (včetně známé mozaiky)

	Citlivost	Specifická
Odhad % (n/N)	96,4 % (27/28)	99,80 % (2 001/2 005)
Oboustranný 95% interval spolehlivosti	82,3 %, 99,4 %	99,49 %, 99,92 %

Účinnost celogenomového vyšetření pro částečné delecce a duplikace

Tabulka 11 Citlivost a specifická testu VeriSeq NIPT Solution v2 pro detekci částečné delecce a duplikace v 7 Mb nebo více při celogenomovém vyšetření (včetně známé mozaiky)

	Citlivost	Specifická
Odhad % (n/N)	74,1 % (20/27)	99,80 % (2000/2004)
Oboustranný 95% interval spolehlivosti	55,3 %, 86,8 %	99,49 %, 99,92 %

Rozdíly v účinnosti základního a celogenomového vyšetření

Metodika vyhodnocování běžných trizomií a aneuploidií pohlavních chromozomů je u základního a celogenomového vyšetření stejná. Základní vyšetření aplikuje algoritmus pouze na trizomie T21, T18 a T13. Celogenomové vyšetření však tuto metodiku rozšiřuje na vyhodnocení všech trizomií a vzácných autozomálních aneuploidií i částečných duplikací a delecí.

Mezi uvedenou účinností základního a celogenomového vyšetření byly zaznamenány dva rozdíly. Zaprvé, u celogenomového vyšetření byly do metriky účinnosti zahrnuty vzorky se známým mozaicizmem jak u běžných trizomií, tak u vzácných autozomálních aneuploidií i částečných duplikací a delecí. Zadruhé, celogenomové vyšetření může přednostně vykazovat zjištění částečné duplikace nebo delecce před úplnou trizomií. Přítomnost úplné trizomie vedle částečné duplikace nebo delecce lze zjistit ze skóre LLR uvedeného v doplňující zprávě.

Zahrnutí mozaik do celogenomového vyšetření

Mozaicizmus je u tohoto rozboru uváděn jako omezení. Je-li mozaicizmus přítomen, fetální signál anomálie je zeslaben, a proto může být obtížnější ho zjistit bez zhoršení celkové specifity rozboru. Protože je však mozaicizmus pro rozšířený obsah relevantnější, byly vzorky s mozaicizmem do celogenomového vyšetření zahrnuty.

Ze 64 vzorků zahrnutých do celogenomového vyšetření, ale ne do základního vyšetření, bylo 36 vzorků podle klinického referenčního standardu identifikováno jako postižené mozaicizmem. 23 přiřazení z těchto 36 vzorků odpovídalo klinickému referenčnímu standardu.

Zjištění částečné delece nebo duplikace ve srovnání s aneuploidií celého chromozomu

Test VeriSeq NIPT Solution v2 disponuje možnostmi nabídky pro základní vyšetření i celogenomové vyšetření. Při základním vyšetření je nahlášen výsledek ZJIŠTĚNA ANOMÁLIE, pouze pokud je zjištěna úplná aneuploidie na chromozomech 21, 18 nebo 13 a pokud jsou splněny všechny metriky kontroly kvality. Při celogenomovém vyšetření systém zjišťuje aneuploidii ve všech autozomech a události částečné delece a duplikace dosahující alespoň 7 Mb.

Při použití celogenomového vyšetření v případech, kdy jak událost celého chromozomu, tak událost CNV v rámci téhož chromozomu překročí prahovou hodnotu LLR, poskytuje systém přednostně hlášení události částečné delece nebo duplikace před přiřazením celého chromozomu, pokud velikost částečné delece nebo duplikace pokrývá přibližně 75 % nebo méně chromozomu, na kterém je událost zjištěna. Pokud je zjištěná oblast částečné delece nebo duplikace větší než 75 % velikosti chromozomu, je událost nahlášena jako úplná trizomie nebo monozomie celého chromozomu, pokud je současně překročena prahová hodnota LLR pro celý chromozom. Z toho důvodu mohou značně velké delece a duplikace, které jsou menší nebo rovny 75 % velikosti chromozomu, poukazovat na aneuploidii celého chromozomu.

Ve všech vzorcích je skóre LLR pro klasifikaci celého chromozomu k dispozici v doplňující zprávě. Skóre LLR by před interpretací výsledku mělo být zkontrolováno s ohledem na prahovou hodnotu ([95% pravděpodobnost detekce pro průměrné oblasti podle velikosti pro test VeriSeq NIPT Solution v2 na straně 59](#)). Například přiřazení CNV, kde skóre LLR úrovně chromozomu překračuje prahovou hodnotu, dále podporují interpretaci konzistentní s aneuploidií celého chromozomu. Viz [Tabulka 12](#) jako příklad.

V klinické studii se vyskytovaly dva vzorky jednočetného těhotenství se značně velkými duplikacemi (jedna na chromozomu 21 a jedna na chromozomu 18), které byly menší než 75 % relativní velikosti chromozomu (viz [Tabulka 12](#)). Obě události nebyly nahlášeny jako úplné trizomie daného chromozomu, ale jako částečné duplikace. Skóre LLR těchto událostí jsou uvedena nad prahovou hodnotou konzistentně se závěrem pro poškození u úplné trizomie. U přiřazení částečné duplikace nebo úplné trizomie nabízí následná správa pozitivního přiřazení NIPT testování za účelem potvrzení u pacienta prostřednictvím prenatální diagnostiky.

Tabulka 12 Příklady významných událostí duplikace zjištěné při celogenomovém vyšetření

	Klinická pravda	Výstup systému pro celý genom	Velikost anomálie (Mb)	% chromozomu	Skóre LLR
Vzorek 1	Trizomie chr. 21, jednočetné těhotenství	Částečná duplikace chr. 21	22,50	48,9	19,43
Vzorek 2	Trizomie chr. 18, jednočetné těhotenství	Částečná duplikace chr. 18	47,00	60,2	12,99

Další informace k metrikám kontroly kvality použitým při hlášení výsledků aneuploidie najdete v příručce k softwaru VeriSeq NIPT Solution v2 (dokument č. 1000000067940).

Pohlavní chromozomy

Výsledky testu pohlavních chromozomů získané rozbořem VeriSeq NIPT Solution v2 byly porovnány s klinickým referenčním standardním závěrem a jsou shrnuty v následující tabulce. Procentní shoda byla vypočtena pro každý pohlavní chromozom v každém jednotlivém klinickém referenčním standardním závěru. Procentní shoda byla vypočtena jako počet vzorků, ve kterých výsledek testu pohlavních chromozomů VeriSeq NIPT Solution v2 souhlasil s klasifikací podle klinického referenčního standardu, dělený celkovým počtem vzorků se stejnou klasifikací podle klinického referenčního standardu.

Tabulka 13 Procentní shoda s klasifikací pohlaví plodu*

Klasifikace pohlaví plodu	Karyotyp	Fenotyp určený fyzickým vyšetřením novorozence		Cytogenetické výsledky							
		Ženské pohlaví	Mužské pohlaví	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY	Jiné**	Chybí
Nebyla zjištěna anomálie	XX	997	0	21	0	2	0	0	0	0	0
Nebyla zjištěna anomálie	XY	0	966	0	15	0	0	0	0	0	1
Byla zjištěna anomálie	XO	0	0	0	0	19	0	0	1	0	0
Byla zjištěna anomálie	XXX	0	0	0	0	0	17	0	0	1	0

Klasifikace pohlaví plodu		Fenotyp určený fyzickým vyšetřením novorozence		Cytogenetické výsledky							
Detekováno	Karyotyp	Ženské pohlaví	Mužské pohlaví	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY	Jiné**	Chybí
Byla zjištěna anomálie	XXY	0	0	0	0	0	0	23	0	1	0
Byla zjištěna anomálie	XYY	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0
Celkem		997	966	21	15	21	17	23	12	2	1
Procentní shoda		100	100	100	100	90,5	100	100	91,7	Není k dispozici	Není k dispozici

* U pěti dvoučetných těhotenství byla správně klasifikována přítomnost chromozomu Y. U dvou těhotenství byla správně klasifikována nepřítomnost chromozomu Y.

** Další cytogenetické výsledky byly XXXXX a XYYY.

Pozitivní prediktivní hodnota a negativní prediktivní hodnota testu VeriSeq NIPT Solution v2

Pozitivní prediktivní hodnota (PPH) a negativní prediktivní hodnota (NPH) testu poskytuje informace týkající se schopnosti testu provádět informovaná klinická rozhodnutí založená na citlivosti a specifitě testu a na pravděpodobnosti před testem, že je plod postižený trizomií (prevalence). Protože hodnoty PPH a NPH závisí na prevalenci a prevalence pro tyto aneuploidie může být v různých populacích osob různá, jsou hodnoty PPH a NPH vypočteny na základě citlivosti a specifity pozorované při základním vyšetření v rámci studie klinické přesnosti pro trizomii (bez známých mozaik). [Tabulka 17](#) je založena na celogenomovém vyšetření (včetně známých mozaik).

Tabulka 14 Prevalence trizomie 21, PPH a NPH v základním vyšetření (kromě známých mozaik)

Prevalence (%)	PPH (%)	NPH (%)
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

Tabulka 15 Prevalence trizomie 18, PPH a NPH v základním vyšetření (kromě známých mozaik)

Prevalence (%)	PPH (%)	NPH (%)
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

Tabulka 16 Prevalence trizomie 13, PPH a NPH v základním vyšetření (kromě známých mozaik)

Prevalence (%)	PPH (%)	NPH (%)
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

Tabulka 17 Prevalence veškerých anomálií, PPH a NPH v celogenomovém vyšetření (včetně známých mozaik)

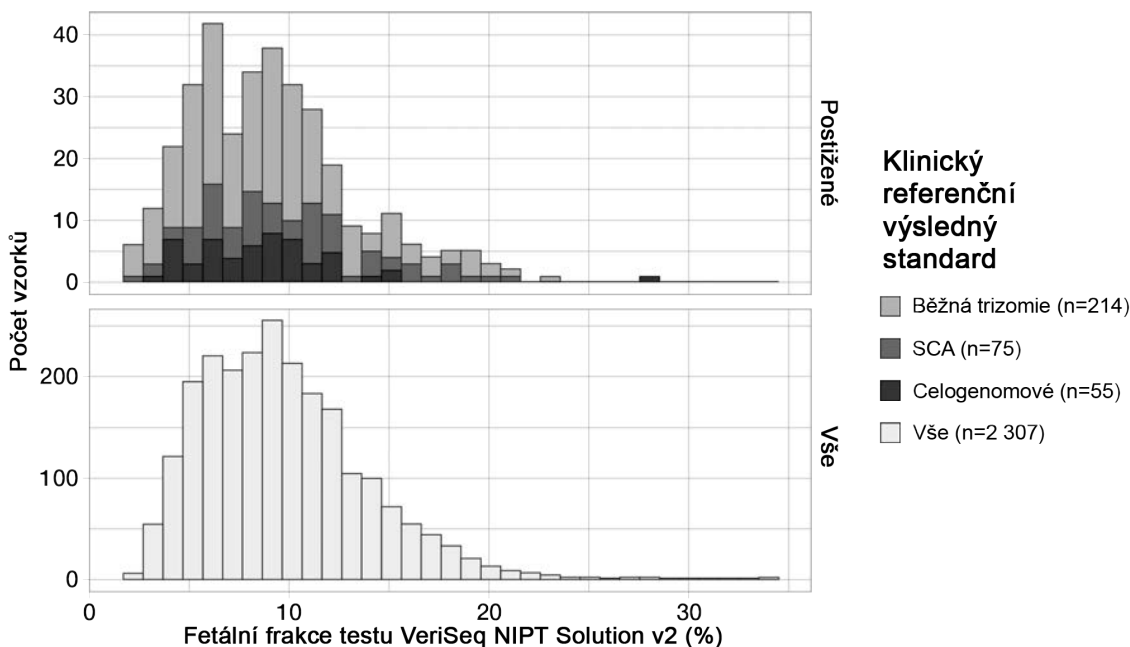
Prevalence (%)	PPH (%)	NPH (%)
0,01	1,42	> 99,99
0,02	2,81	> 99,99
0,05	6,74	> 99,99

Prevalence (%)	PPH (%)	NPH (%)
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

Distribuce fetální frakce

Odhady distribuce fetální frakce (FF) testu VeriSeq NIPT Solution v2 na základě celogenomového vyšetření s mozaikou jsou uvedeny v kategorii klinických referenčních standardních výsledků (Obrázek 1).

Obrázek 1 Distribuce fetální frakce



5 vzorků vykazovalo anomálie ve více kategoriích.
 Běžná trizomie zahrnuje vzorky s trizomií chromozomu 21, 18 a/nebo 13.
 Celogenomové vyšetření zahrnuje vzorky s vzácnou autozomální aneuploidií (RAA) nebo částečnými delecemi či duplikacemi.

Odhady FF mají celkový rozsah od 2 % do 34 % s mediánem 9 % a mezikvartilovým rozsahem od 6 % do 12 %. Odhad mediánu FF pro běžné trizomie a události zjištěné celogenomovým vyšetřením je 8 % a v případě SCA (aneuploidie pohlavních chromozomů) jde o 9 %. Rozsah odhadů FF byl konzistentní pro všechny výsledky. Nedochází k žádnému zjevnému posunu v distribuci FF mezi běžnými trizomiemi, SCA (aneuploidie pohlavních chromozomů), událostmi zjištěnými vyšetřením v rámci celého genomu ani ve všech vzorcích pro analýzu v rámci celého genomu.

Účinnost při dvoučetném těhotenství

Účinnost při odhadech trizomie pro chromozomy 13, 18, 21 a přítomnosti chromozomu Y u dvoučetných těhotenství

Vzhledem k nízké prevalenci trizomie chromozomů 21, 18 a 13 u dvoučetných těhotenství byl pro klinickou studii k dispozici pouze malý počet vzorků dvojčat. Aby bylo možné odhadnout účinnost testu VeriSeq NIPT Solution v2 u dvoučetných těhotenství, byly k simulaci populací dvoučetných těhotenství použity modely *in silico* (na základě počítačové simulace) založené na pozorováních klinických vzorků. Tato simulace byla v souladu se zamýšlenou populací použití. Distribuce fetální frakce byla stanovena z přibližně 4 500 vzorků dvoučetných těhotenství a porovnána s distribucí z přibližně 120 000 vzorků jednočetných těhotenství. Distribuce fetální frakce podmíněné stavem aneuploidie byla určena z jednočetných předpokládaných přiřazení (1 044 trizomií chromozomu 21, 307 trizomií chromozomu 18 a 192 trizomií chromozomu 13). Spojení obou rozdělení umožnilo odvodit zjištění aneuploidie u dvojčat.

Byly simulovány sady dizygotických a monozygotických dvojčat, přičemž k odhadu citlivosti byl použit vážený průměr představující jejich prevalenci v populaci zamýšleného použití (2 dizygotická: 1 monozygotická). Za účelem určení specifity byly simulovány sady nepostižených dvojčat.

Frakce každého simulovaného vzorku postiženého trizomií (tj. postižená frakce) byla vypočtena pro každou kategorii vzorků jinak:

- U monozygotických dvojčat byla postižená frakce každého vzorku nastavena na 1,0, protože v této situaci trizomie ovlivňuje obě dvojčata.
- U dizygotických dvojčat se předpokládalo, že bylo postiženo pouze jedno dvojče (postižení u obou dizygotických dvojčat je mimořádně vzácné). Hodnoty postižené frakce byly simulovány s použitím známé distribuce poměrů fetální frakce, jak je stanoveno z klinických vzorků dvoučetných těhotenství s nesouhlasným pohlavím. Pokud se předpokládalo, že postižené dvojče mělo vždy menší fetální frakci ze dvou dvojčat, byl přijat konzervativní přístup. Pro fetální frakce, které byly v průměru nižší u těhotenství s trizomií chromozomů 13 a 18, byl použit korekční faktor.
- U nepostižených dvojčat byla postižená frakce každého vzorku nastavena na nulu.

U dvojčat postižených buď trizomií chromozomu 18, nebo chromozomu 13 byla fetální frakce odpovídající postižené frakci vzorku redukována. Redukce byla poměrná vzhledem k průměrné redukci ve fetální frakci pozorované v klinických datech v trizomii chromozomu 18 nebo chromozomu 13 u jednočetných těhotenství vzhledem k euploidním jednočetným těhotenstvím.

Jak celková fetální frakce, tak postižená frakce každého simulovaného vzorku byla pak použita k výpočtu skóre aneuploidie pomocí standardního algoritmu VeriSeq NIPT Solution v2. Citlivost byla vypočtena na základě určení, jak často skóre aneuploidie překročilo u simulovaných postižených dvojčat příslušnou mezní hodnotu pro aneuploidii. Obdobně byla vypočtena specifita na základě určení, jak často bylo skóre aneuploidie u simulovaných postižených dvojčat pod příslušnou mezní hodnotou pro aneuploidii. (Tabulka 18). Intervaly 95% spolehlivosti byly odhadnuty na základě počtu skutečných klinických vzorků dvojčat v původní sadě dat, které byly klasifikovány buď jako postižené, nebo jako nepostižené příslušnou trizomií.

Za účelem odhadnutí citlivosti u vzorků dvojčat byly simulovány sady dvojčat XY/XY a XX/XY. Byl použit vážený průměr představující jejich prevalenci v populaci zamýšleného použití (1 XY/XY: 1 XX/XY). Za účelem odhadnutí specifity chromozomu Y u dvojčat byly simulovány sady dvojčat XX/XX. Celkové hodnoty fetální frakce byly simulovány podle známé distribuce fetální frakce v klinických vzorcích dvojčat.

Pro dvojčata XY/XY a XX/XY byla odpovídající skóre chromozomu Y odhadnuta pomocí známého vztahu mezi skóre fetální frakce a chromozomu Y v klinických vzorcích jednočetných těhotenství klasifikovaných jako mužské pohlaví. Pouze v případě dvojčat XX/XY byly hodnoty postižené frakce (tj. mužské) simulovány s použitím známé distribuce poměrů fetální frakce pozorovaných mezi dvojčaty ze stejného těhotenství, jak je stanoveno z klinických vzorků dvoučetných těhotenství s nesouhlasným pohlavím. Kdekoli byla postižená frakce vybrána tak, aby odpovídala menší frakci ze dvou dvojčat, byl přijat konzervativní přístup. Pro každý simulovaný vzorek XX/XY bylo skóre chromozomu Y násobeno postiženou frakcí.

Pro dvojčata XX/XX byla skóre chromozomu vzorkována ze skóre pozorovaných u klinických vzorků jednočetných těhotenství klasifikovaných jako ženské pohlaví. Skóre chromozomu Y a celková fetální frakce byly následně použity ke klasifikaci každého simulovaného vzorku podle přítomnosti nebo nepřítomnosti chromozomu Y prostřednictvím standardního algoritmu VeriSeq NIPT Solution v2.

Citlivost byla vypočtena na základě určení, jak často byla u simulovaných dvojčat XY/XY nebo XX/XY správně klasifikována přítomnost chromozomu Y. Specifita byla vypočtena na základě určení, jak často byla u simulovaných dvojčat XX/XX správně klasifikována nepřítomnost chromozomu Y. Intervaly 95% spolehlivosti byly odhadnuty na základě počtu skutečných klinických vzorků dvojčat v původní sadě dat, které byly klasifikovány buď jako vzorky s chromozomem Y, nebo jako vzorky bez chromozomu Y.

Tabulka 18 Odhady pro trizomii chromozomu 21, 18 a 13 na základě simulované populace dvoučetných těhotenství

	Trizomie chromozomu 21	Trizomie chromozomu 18	Trizomie chromozomu 13	Přítomnost Y
Citlivost	96,4 %	95,7 %	93,6 %	> 99,9 %
Oboustranný 95% interval spolehlivosti	(86,4 %, 98,9 %)	(68,3 %, 99,4 %)	(64,1 %, 98,9 %)	(99,9 %, > 99,9 %)
Specifita	99,9 %	> 99,9 %	> 99,9 %	> 99,9 %
Oboustranný 95% interval spolehlivosti	(99,8 %, > 99,9 %)	(99,9 %, > 99,9 %)	(99,9 %, > 99,9 %)	(99,7 %, > 99,9 %)

Bodové odhady a odhadované 95% intervaly spolehlivosti (Tabulka 18) pro citlivost a specifitu testu VeriSeq NIPT Solution v2 určeného k detekci trizomie chromozomu 21, 18 a 13 a přítomnosti chromozomu Y byly určeny na základě simulované populace dvoučetných těhotenství v souladu se zamýšlenou populací použití. Intervaly spolehlivosti byly odhadnuty na základě počtu klinických vzorků dvojčat s úspěšnou kontrolou kvality, které byly klasifikovány buď jako postižené, nebo jako nepostižené příslušnou trizomií. Výpočet citlivosti předpokládá, že dvě třetiny těhotenství s postiženými dvojčaty jsou dizygotická s jedním postiženým dvojčetem a jedna třetina těhotenství s postiženými dvojčaty je monozygotická s oběma postiženými dvojčaty.

Odhady uvedené v [Tabulka 18](#) se týkají pouze dvoučetných těhotenství. Vzhledem k nízké prevalenci byla data pro vícečetná těhotenství (trojčata a vyšší) nedostatečná pro stanovení vhodných statistických modelů pro odhad přesnosti detekce aneuploidie.

Analytická účinnost

Přesnost

Za účelem vyhodnocení a kvantifikace přesnosti rozboru byla provedena opětovná analýza dat pomocí softwaru pro plán analýzy VeriSeq NIPT Solution v2 ze dvou předchozích studií VeriSeq NIPT Solution:

- Multicentrická studie reprodukovatelnosti, která se skládala ze tří běhů provedených třemi pracovníky na třech pracovištích, kteří používali jednu šarži reagensů při devíti bězích.
- Studie vnitrolaboratorní přesnosti, která se skládala ze 12 běhů na jednom pracovišti s využitím dvou systémů ML STAR, dvou sekvenačních přístrojových systémů a tří šarží sekvenačních reagensů.

Cílem této studie přesnosti bylo kvantifikovat přesnost rozboru s ohledem na trizomie chromozomu 21 (T21) a chromozomu Y a odhadu variability s různými přístroji, soupravami pro přípravu knihoven a šaržemi sekvenačních reagensů.

Spojením cfDNA extrahované z krevní plazmy těhotných žen (s plodem postiženým T21) a cfDNA extrahované z krevní plazmy žen, které nebyly těhotné, byl vytvořen fond T21 s fetální frakcí 5 %. Byl také vytvořen fond cfDNA z 10% fetální frakce z mužského plodu matky (plod XY). Panel vzorků pro jednotlivou studii pro jednotlivé běhy zahrnoval čtyři repliky fondu postižených vzorků 5% fetální frakce trizomie T21 a 20 replik fondu cfDNA z 10% fetální frakce z mužského plodu matky. Testování probíhalo po dobu 10 dní a zahrnovalo celkem 21 běhů v obou dvou studiích celkem.

Trizomie T21 a přítomnost chromozomu Y byly zvoleny pro vyhodnocení na základě reprezentativnosti klinických podmínek a složitosti detekce anomálie. Vzhledem k tomu, že jde o nejmenší lidský autozom, má velikost chromozomu 21 přímý vliv na citlivost detekce trizomie T21, a to zejména při nízkých hodnotách fetální frakce jako v případě této studie. Chromozom Y, jak je přítomen v mateřské plazmě, má výhradně fetální původ, a proto je jeho detekce při rozboru snadnější.

Pozorované střední a směrodatné odchylky pro skóre chromozomu 21 LLR a normalizované hodnoty chromozomů (NCV) ukázaly, že největší zdroj variability představuje směrodatná odchylka (standard deviation, SD) repliky. Odchylka mezi pracovišti, přístroji a šaržemi reagensů přidala významnou míru variability, jak je patrné z rozdílu mezi hodnotami Celková SO a SO repliky viz [Tabulka 19](#) a [Tabulka 20](#).

Tabulka 19 Souhrn směrodatné odchylky (SO) multicentrické (reprodukovatelnost) odezvy sekvenování

Odezva	N	Střední hodnota	SD repliky	Celková SD reprodukovatelnosti*
Skóre chromozomu 21 LLR	36	34,43	11,36	11,36
NCV chromozomu Y	180	190,56	7,96	10,20

* Celková hodnota zahrnuje variabilitu způsobenou pracovištěm, pracovníkem, během, dnem a replikou.

Tabulka 20 Souhrn přesnosti odezvy sekvenování v rámci laboratoře

Odezva	N	Střední hodnota	SD repliky	Celková SD v rámci laboratoře*
Skóre chromozomu 21 LLR	48	36,01	9,07	10,25
NCV chromozomu Y	240	198,68	7,63	7,82

* Celková hodnota zahrnuje variabilitu způsobenou sekvenačním přístrojem, šarží reagensů, pracovníkem, během, dnem a replikou.

Byla provedena další studie za účelem porovnání přesnosti sekvenování testu VeriSeq NIPT Solution v2 (celková směrodatná odchylka) pomocí verze 2.0 průtokové kyvety ve srovnání s verzí 2.5. Studie zahrnovala dva typy průtokových kyvet (verze 2.0 a verze 2.5), tři šarže souprav pro sekvenování, čtyři přístrojové systémy a dva sekvenovací běhy na kombinaci celkem 48 běhů na jednom pracovišti. Z desek cfDNA, které byly připraveny ručně, byl připraven jeden fond sekvenování. Panel vzorků zahrnoval čtyři repliky fondu postižených vzorků 5% fetální frakce trizomie T21 a 20 replik fondu cfDNA z 10% fetální frakce z mužského plodu (plod XY) matky. Výsledky studie viz [Tabulka 21](#) podporují tvrzení, že nedochází k rozdílu v přesnosti sekvenování při použití průtokové kyvety verze 2.0 nebo verze 2.5.

Tabulka 21 Souhrn přesnosti odezvy sekvenování pro průtokovou kyvetu v2.0 ve srovnání s průtokovou kyvetou v2.5

Odezva	Počet pozorování u jednotlivých verzí	Celková SO pro v2.0*	Celková SO pro v2.5*	Statistický výsledek**
Skóre chromozomu 21 LLR	96	9,56	8,44	Statisticky ekvivalentní (hodnota p=0,25)
NCV chromozomu Y	480	7,74	7,38	Statisticky ekvivalentní (hodnota p=0,38)

* Celková hodnota zahrnuje variabilitu způsobenou sekvenačním přístrojem, šarží reagensů, během, dnem, replikou

**Na základě F-testu pro rovnost odchylek (směrodatné odchylky umocněné na druhou)

Křížová kontaminace

Křížová kontaminace byla vyhodnocena v rámci pracovního postupu přípravy vzorků testu VeriSeq NIPT Solution. Fondy plazmy z netěhotných žen (XX) a dospělých mužů (XY) byly testovány na šachovnicovém principu se 4 deskami s 96 jamkami. N=48 na každé desce pro ženské i mužské vzorky; celkem 192 ženských a 192 mužských vzorků. Žádný z ženských vzorků neukázal pokrytí chromozomu Y, které by bylo statisticky vyšší, než je odhadovaný základ, což naznačuje, že nedošlo ke křížové kontaminaci od mužských vzorků ze stejné desky. V testu VeriSeq NIPT Solution nebyla pozorována žádná detekovatelná křížová kontaminace.

Potenciálně interferující látky

Vliv potenciálně interferujících látek byl v testu VeriSeq NIPT Solution vyhodnocen posouzením účinnosti rozboru za přítomnosti takových látek.

Do fondů plazmy matky s nepostiženým ženským plodem (plod XX) byl vpraven albumin, bilirubin, hemoglobin nebo triglyceridy (endogenní). Byly testovány ve dvou koncentracích pro každou testovanou látku (n=16 pro každou látku). Nebylo pozorováno žádné ovlivnění účinnosti rozboru.

Tabulka 22 Potenciálně interferující látky (endogenní)

Testovaná látka	Nízká koncentrace testu (mg/ml)	Vysoká koncentrace testu (mg/ml)
Albumin	35	50
Bilirubin	0,01	0,15
Hemoglobin	100	200
Triglycerid	1,5	5

Účinnost rozboru může potenciálně ovlivňovat také přirozeně se vyskytující genomická DNA (gDNA) matky v plazmě, protože může být extrahována společně s cfDNA plodu. Úrovně genomické DNA 1,6, 3,3 a 4,9 ng na vzorek (odpovídající 1, 2 a 3 směrodatným odchylkám nad střední hodnotou očekávané koncentrace gDNA po 7 dnech skladování plné krve¹²) byly přidány k cfDNA extrahované z plazmy matky s nepostiženým ženským plodem (plod XX). Vzorky byly poté otestovány rozbohem VeriSeq NIPT Solution (n=16 pro každou koncentraci). V přítomnosti zvýšených úrovní gDNA nebylo pozorováno žádné ovlivnění účinnosti rozboru.

Podle protokolu EP7-A2 (Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline-Second Edition) bylo otestováno dvacet potenciálně interferujících látek (exogenních) založených na lécích, které jsou běžně používány nebo předepisovány v těhotenství. 20 potenciálních interferujících látek bylo zkombinováno do čtyř fondů, vpraveno do plazmy matky s nepostiženým ženským plodem (plod XX) a testováno rozbohem VeriSeq NIPT Solution (n=16 pro každý fond). V přítomnosti těchto exogenních látek nebylo pozorováno žádné ovlivnění účinnosti rozboru.

Tabulka 23 Potenciálně interferující látky (exogenní)

Fond 1	Fond 2	Fond 3	Fond 4
Acetaminofen	Difenhydramin	Albuterol	Cetirizin
Acetylcystein	Erytromycin	Bupropion	Dextrometorfan
Bisoprolol	Guaifenesin	Kofein	Kyselina L-askorbová
Citalopram	Heparin	Sertralin	Metoprolol
Desloratadin	Lidokain	Fluorid sodný	Nadolol

Limit detekce

Limit detekce (LOD) je definován jako úroveň fetální frakce, která odpovídá 95% pravděpodobnosti detekce sledovaného stavu, jako je například T21. Za účelem vyhodnocení limitu detekce (LOD) testu VeriSeq NIPT Solution v2 pro různé běžné stavy byly provedeny studie a statistické analýzy.

Pravděpodobnost detekce sledovaného stavu u vzorku s postižením prostřednictvím testu VeriSeq NIPT Solution v2 primárně závisí na třech faktorech:

- fetální frakce,
- hloubka sekvenování,
- velikost a složitost genomické oblasti zájmu.

Za předpokladu konstantní hloubky sekvenování je detekce dané odchylky ve vzorku s vyšším procentem fetální frakce snadnější než ve vzorku s nižším procentem fetální frakce. A naopak platí, že za předpokladu konstantní fetální frakce je detekce dané odchylky ve vzorku s vyšší hloubkou sekvenování snadnější než ve vzorku s nižší hloubkou sekvenování. Na závěr platí, že detekce odchylek v menších nebo složitějších genomických oblastech je obtížnější než detekce odchylek ve větších nebo méně složitých genomických oblastech, pokud budeme předpokládat konstantní fetální frakci a hloubku sekvenování.

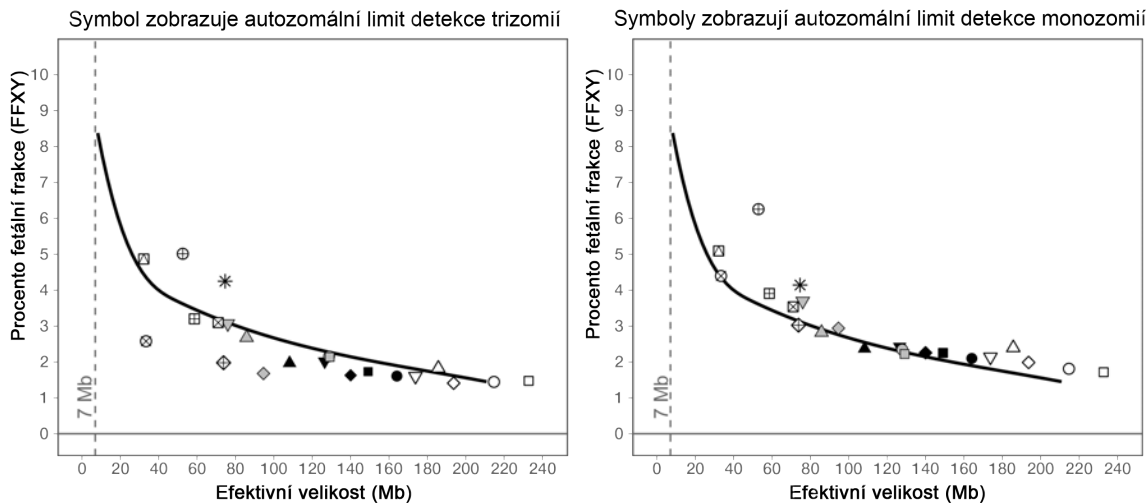
Za účelem určení limitu detekce (LOD) pro T21 byly analyzovány vzorky obsahující směsi sdružených vzorků T21 a sdružených vzorků bez postižení. Dva typy analytu byly smíchány v titrační řadě za účelem vytvoření sady sedmi úrovní fetální frakce (0, 2, 3, 4, 5, 6, a 10 %). Každá úroveň byla reprezentována celkem 10 replikami.

Za účelem dalšího zvýšení rozlišení mřížky fetální frakce pro analýzu limitu detekce (LOD) byla data z této studie rozšířena o data získaná z ředění in silico. Účinky experimentálního ředění a titrace byly simulovány řízeným smíšením dat sekvenování. Data z této titrace in silico pokrývala sadu 14 úrovní fetální frakce (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 a 4,50 %) s 32 replikami pro každou úroveň. Na výsledná data byla použita analýza probit za účelem stanovení limitu detekce (LOD) pro T21.

Nezávisle byl vyvinut statistický model využívající fetální frakci, hloubku sekvenování a velikost/složitost genomu, který umožní predikování pravděpodobnosti detekce jakékoli odchylky v jakémkoli vzorku. Tento model byl stanoven na základě dat odpovídajících sadě 1 405 vzorků XY. Limit detekce (LOD) pro T21, jak je predikováno tímto modelem, byl určen tak, aby se shodoval s odhadem založeným na analýze probit, který je popsán výše. K odhadu hodnot limitu detekce (LOD) pro aneuploidie na všech autozomech a pro částečné delece a duplikace byl použit statistický model.

Obrázek 2 zobrazuje 95% pravděpodobnost detekce pro průměrné oblasti podle velikosti a autozomální limity detekce pro všechny trizomie a monozomie.

Obrazek 2 95% pravděpodobnost detekce pro průměrné oblasti podle velikosti pro test VeriSeq NIPT Solution v2



Chr.	Symbol	Trizomie chromozomu		Monozomie	
		Krajní hodnota LLR	Limit detekce (%)	Krajní hodnota LLR	Limit detekce (%)
1	○	7	1.44	13.2	1.80
2	□	9	1.47	13.6	1.71
3	◇	5	1.41	13.8	1.99
4	△	7	1.82	15.2	2.39
5	▽	7.6	1.60	17	2.14
6	●	7.3	1.60	15.4	2.09
7	■	6.6	1.73	14	2.25
8	◆	5.8	1.63	14.8	2.25
9	▲	8	1.97	13.6	2.37
10	▼	8.8	2.01	14.7	2.42
11	●	12.2	2.14	15.7	2.35

Chr.	Symbol	Trizomie chromozomu		Monozomie	
		Krajní hodnota LLR	Limit detekce (%)	Krajní hodnota LLR	Limit detekce (%)
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

Řešení problémů

Řešení problémů s testem VeriSeq NIPT Solution v2

Poruchový režim	Možný výsledek	Výklad	Doporučený postup	Komentář
Insufficient input plasma (Nedostatek plazmy na vstupu)	Chyba kontroly kvality vzorku	Nedostatečný objem plazmy.	Zopakujte odběr.	Na základě vizuální kontroly objemu plazmy.
Blood tube failure (Chyba zkumavky na krev)	Krev není separována do vrstev	Vzorek nebyl odstředěn.	Zkontrolujte, zda se odstředivka spustila a zda se zkumavka otáčela při správném zrychlení. Zopakujte odběr vzorku.	
		Nesprávné skladování nebo přeprava vzorku (hemolýza vzorku).	Zopakujte odběr vzorku.	Zmrazené vzorky se neoddělují. Nesprávné podmínky při skladování nebo přepravě by mohly vést k hemolýze vzorků.

Poruchový režim	Možný výsledek	Výklad	Doporučený postup	Komentář
Sample clog or slow flow (Ucpání vzorkem nebo pomalý proud)	Kontaminace plazmy	Jednotlivé vzorky mohou ucpat vazebnou desku, pokud vzorek plazmy obsahuje významnou kontaminaci.	Prohlédněte vzorek. Pokud je zbylá plazma ve zkumavce červená nebo mléčná, vyřadte vzorek a požádejte o opakování odběru. Pokud se zdá vzorek v pořádku, zopakujte testování vzorku.	
	Přetečení vzorku	Nedostatečná vizuální kontrola vhodnosti vzorku pro jednotlivé zkumavky.	Zneplatněte veškeré vzorky v okolních jamkách, které byly zasaženy přetečením.	Vzorky mohly být před zpracováním nesprávně přepravovány nebo skladovány. Nevhodné vzorky ze zpracování vylučte.
	Hardwarová porucha	Nedostatečné zpracování materiálu během extrakce.	Zopakujte test vzorku. Pokud problém trvá ve stejné jamce i u jiných vzorků, obraťte se na technickou podporu společnosti Illumina.	

Poruchový režim	Možný výsledek	Výklad	Doporučený postup	Komentář
Individual Sample Analysis QC failure (Neúspěšná kontrola kvality analýzy jednotlivého vzorku)	Chyba kontroly kvality sekvenování	Možné příčiny jsou následující: <ul style="list-style-type: none"> Nedostatek vstupního genetického materiálu Chybný přenos během manipulace se vzorkem Chyba sekvenačních reagensů 	Zkontrolujte poznámky na vzorku. Zkontrolujte, zda se na stejné pozici na desce nevyskytují u předchozích vzorků podobné výsledky. Zopakujte test vzorku.	Označuje buď nedostatečný vstupní materiál vzorku, nebo chybný přenos v systému ML STAR. Příčinou nedostatku genetického materiálu může být nedostatek mimobuněčné DNA v plazmě nebo buněčná DNA, která způsobuje nadměrné zředění vzorku pro sekvenování.
	Nízký počet FF nebo nevyločených míst (NES)	Nedostatek generovaných dat k vytvoření přesného výkazu.	Zopakujte test z plazmy.	

Poruchový režim	Možný výsledek	Výklad	Doporučený postup	Komentář
Quantification QC failure (Chyba kontroly kvality kvantifikace)	Neúspěšný běh kvantifikace. Medián dávky je pod minimální hodnotou	Nedostatečný zisk ze zpracování.	Zopakujte kvantifikaci. Pokud se nezdaří ani opakovaný pokus, obraťte se na technickou podporu společnosti Illumina.	Neúspěšné splnění metrik standardní křivky ukazuje buď na problém s přípravou knihovny (tj. použití ethanolu jiné než biologické kvality), nebo problémy s procesem kvantifikace.
	Neúspěšný běh kvantifikace	Chyba standardní křivky.	Zopakujte kvantifikaci. Pokud se nezdaří ani opakovaný pokus, obraťte se na technickou podporu společnosti Illumina.	
Pooling failure (Chyba vkládání do fondu)	Nepodařilo se dokončit vkládání vzorků do fondu	Analýza vkládání nemůže vypočítat správné objemy ve fondu.	Znovu vyhodnoťte cílovou koncentraci ve fondu. Znovu spusťte analýzu vkládání.	

Řešení problémů se systémem VeriSeq NIPT Microlab STAR

Krok procesu	Kód chyby	Chybová zpráva	Popis	Uživatelské řešení
Vytvoření dávky	EM0044	The Batch ID entered contains forbidden characters. (Zadané ID dávky obsahuje zakázané znaky.)	Test VeriSeq NIPT Solution v2 umožňuje zadat ve všech datových polích pouze čísla, písmena, podtržítka a pomlčky.	Přejmenujte dávku názvem, který neobsahuje žádné zvláštní znaky.

Krok procesu	Kód chyby	Chybová zpráva	Popis	Uživatelské řešení
Vytvoření dávky	EM0051	The Batch ID is greater than 36 characters in length. (ID dávky obsahuje více než 36 znaků.)	V testu VeriSeq NIPT Solution v2 může název dávky obsahovat maximálně 36 znaků.	Přejmenujte dávku názvem, který obsahuje méně než 36 znaků.
Vytvoření dávky	EM0076	Unable to connect to VeriSeq Onsite Server v2 (Nelze se připojit k místnímu serveru VeriSeq v2)	Místní server VeriSeq v2 neodpovídá na datové požadavky softwaru Workflow Manager.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Zkontrolujte, zda je systém ML STAR připojen k síti. 2. Zkontrolujte, zda je server VeriSeq Onsite Server v2 zapnutý. 3. Zkontrolujte, zda se systém ML STAR může připojit k serveru VeriSeq Onsite Server v2 (odesláním příkazu Ping). 4. Zkontrolujte nádobku na odpad z vakuování. Pokud je nádobka na odpad z vakuování více než z poloviny plná, vyprázdněte ji. 5. Pokud předchozí kroky problém nevyřeší, kontaktujte technickou podporu společnosti Illumina.
Vytvoření dávky	EM0118	This batch has been failed and cannot be further processed. (Zpracování této dávky nebylo úspěšné a dávku již nelze zpracovat.)	Zpracování uvedené dávky již selhalo a dávku nelze dále zpracovat.	Záznam dávky na serveru VeriSeq Onsite Server v2 označuje, že zpracování vybrané dávky nebylo úspěšné. Není povoleno žádné další zpracování. Vytvořte další dávku s požadovanými vzorky.

Krok procesu	Kód chyby	Chybová zpráva	Popis	Uživatelské řešení
Vytvoření dávky	Nepoužívá se	This batch has already completed processing. Would you like to repool? (Zpracování této dávky již bylo dokončeno. Chcete zopakovat sloučení do fondu?)	Uvedená dávka byla zpracována prostřednictvím sloučení do fondu. Jediné přípustné zpracování je opětovné sloučení do fondu.	Opětovné sloučení do fondu proveďte následujícím způsobem. <ul style="list-style-type: none"> • Vyberte příkaz Re-Pool (Znovu sloučit do fondu). • Před opětovným sloučením do fondu přerušete metodu a zkontrolujte, zda je správný název dávky.
Izolace plazmy	WP0087	Duplicate sample barcodes loaded. (Byly načteny duplicitní čárové kódy vzorků.)	Do systému byly načteny vzorky s identickými čárovými kódy.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Podle pokynů softwaru Workflow Manager určete, které vzorky jsou duplicitní. 2. Odeberte duplicitní vzorky a změňte jejich označení nebo je vyměňte. 3. Znovu načtěte vzorky.
Izolace plazmy	EP0102	Samples specified in the Sample Sheet were not loaded. (Vzorky uvedené v seznamu vzorků nebyly načteny.)	Vzorky uvedené v seznamu vzorků nebyly obsaženy v načtených čárových kódech.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Podle pokynů softwaru Workflow Manager určete chybějící vzorky. 2. Proveďte jednu z těchto akcí: <ul style="list-style-type: none"> • Doplněte chybějící vzorky do dávky a znovu načtěte vzorky. • Přerušete prováděnou metodu a upravte seznam vzorků podle potřeby. Znovu spusťte metodu.

Krok procesu	Kód chyby	Chybová zpráva	Popis	Uživatelské řešení
Vložení desky	Nepoužívá se	Venus Barcode Mask Error (Chyba masky čárového kódu Venus)	Software Workflow Manager vynucuje správné přidružení desky k dávce pomocí masek čárového kódu Venus.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Kontrolou umístění desky ověřte, zda má deska správné uspořádání. 2. Zkontrolujte, zda je vložená deska správnou deskou pro uvedenou dávku.
Extrakce cfDNA	WE0150	Pressure in the vacuum chamber is too low. (Tlak ve vakuové komoře je příliš nízký.)	Software Workflow Manager nepokračuje v akci, pokud snímač ve vakuovém potrubí zjistí klidový tlak nižší než 400 torrů.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Zkontrolujte, zda není vakuové potrubí zauzlováno nebo zda v něm nejsou jiné překážky. 2. Otevřete uvolňovací spony odpadního potrubí, uvolněte tlak a potom uvolňovací spony potrubí zcela zavřete. 3. Zkontrolujte, zda je zapnutý regulátor vakua a pumpa. 4. Pokud potíže trvají, obraťte se na technickou podporu společnosti Illumina.
Extrakce cfDNA	WE0153	Pressure in the vacuum chamber is too high. (Tlak ve vakuové komoře je příliš vysoký.)	Pokud je před zahájením regulace tlaku změřen příliš vysoký tlak vakua, může jít o poruchu systému.	Všechny vakuové spojky a hadice na zadní části regulátoru musí být řádně připojeny.

Krok procesu	Kód chyby	Chybová zpráva	Popis	Uživatelské řešení
Extrakce cfDNA	WE0996	Vacuum failed to seal. (Utěsnění vakuem selhalo.)	Porucha utěsnění musí být před pokračováním odstraněna.	<p>Před výběrem tlačítka OK ověřte, zda je porucha utěsnění odstraněna.</p> <ol style="list-style-type: none"> Zkontrolujte, zda je deska pro vazbu zarovnána s vakuovým sběrným potrubím. S nasazenou rukavicí silou zatlačte na desku pro vazbu. Naslouchejte šumu vakua a sledujte proud vody skrz desku pro vazbu. V softwaru Workflow Manager otevřete zobrazení sledování. Poté co skutečný odečet tlaku dosáhne hodnotu nejméně o 50 tlakových jednotek nižší, než je odečet okolního tlaku, pokračujte v extrakci cfDNA výběrem tlačítka OK. Pokud během vyhrazené doby není dosažen požadovaný odečet tlaku, výběrem tlačítka OK pokračujte s načtením prvního lyzátu. Po rozptýlení lyzátu na desku pro vazbu pozastavte prováděnou metodu. Proveďte opětovné usazení a silou zatlačte na desku pro vazbu. Pokud lyzát neproudí přes desku, kontaktujte technickou podporu společnosti Illumina.

Krok procesu	Kód chyby	Chybová zpráva	Popis	Uživatelské řešení
Extrakce cfDNA	WM0219	If Vacuum is on, manually rest the pump. (Pokud je zapnuto vakuum, ručně vypněte pumpu.)	Vakuum může zůstat zapnuto po přerušení metody během extrakce.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Stisknutím vypínače na regulátoru vakua vypněte vakuum. 2. Počkejte 10 sekund a následně stisknutím vypínače opět vakuum zapněte.
Extrakce cfDNA	EE0477	An error has occurred while moving a plate. (Při pohybu desky došlo k chybě.) (iSWAP error) (Chyba iSWAP)	Pokud došlo k chybě iSWAP (pád desky, neúspěšné uchopení atd.), požádá systém uživatele o dokončení pohybu desky ručně.	<p>Zkontrolujte, zda lze desku znovu použít (nesmí na ní být rozlitý materiál).</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pokud nelze desku znovu použít, přerušte běh. • Pokud desku použít lze, podle zobrazených pokynů dokončete přenos desky ručně.
Extrakce cfDNA	EE0519	Scanned barcode does not match binding plate barcode on record. (Naskenovaný čárový kód neodpovídá čárovému kódu desky pro vazbu v záznamu.)	Vložená deska pro vazbu neodpovídá čárovému kódu vyjmuté desky pro vazbu.	Zajistěte, aby vkládaná deska odpovídala zaznamenanému čárovému kódu (viz protokol sledování pro očekávaný čárový kód).

Krok procesu	Kód chyby	Chybová zpráva	Popis	Uživatelské řešení
API	EA0372	Unable to connect to data server. (Nelze se připojit k datovému serveru.)	Místní server VeriSeq v2 neodpovídá na datové požadavky softwaru Workflow Manager.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Zkontrolujte, zda je systém ML STAR připojen k síti. 2. Zkontrolujte, zda je server VeriSeq Onsite Server v2 zapnutý. 3. Zkontrolujte, zda se systém ML STAR může připojit k serveru VeriSeq Onsite Server v2 (odesláním příkazu Ping).
	EA0774	Connection Error. The API server connection failed to validate. (Chyba připojení. Nepodařilo se ověřit připojení k serveru API.)	Místní server VeriSeq v2 přestal reagovat na datové požadavky softwaru Workflow Manager.	<p>Zkontrolujte splnění následujících podmínek:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Zkontrolujte, zda je systém ML STAR připojen k síti. 2. Zkontrolujte, zda se systém ML STAR může připojit k serveru VeriSeq Onsite Server v2 (odesláním příkazu Ping). 3. Zkontrolujte, zda je server VeriSeq Onsite Server v2 zapnutý.
	EA0780	403: Invalid Request The current transaction is not valid. (Neplatný požadavek. Aktuální transakce není platná.)	Odeslaná data porušují logiku pracovního postupu systému.	Další informace naleznete v podrobnostech o chybě. Mezi běžné příčiny této chyby patří zadané hodnoty, které jsou příliš dlouhé nebo které obsahují nepovolené znaky.

Literatura

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*, 4. vydání. 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. Americké sdružení porodníků a gynekologů (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 fetoplacental disease." Sci Transl Med 9 (2017): eaan1240.

Historie revizí

Dokument	Datum	Popis změny
Dokument č. 1000000078751 v08	Srpen 2022	Aktualizace kat. č. pracovního postupu Odstraněn pokyn k míchání pipetou v případě, kdy byla deska s knihovnamy zmražená.
Dokument č. 1000000078751 v07	Květen 2022	Rozdělení kapitoly Omezení postupu do části Vykazování testu VeriSeq NIPT Solution v2 a zahrnutí prvních dvou odrážek. Zbývající text je v nové části Omezení týkající se rozboru. Odebráno <ul style="list-style-type: none"> „VeriSeq“ ze všech značení reagentů. Použití čárového kódu na desce adaptéru VeriSeq NIPT v části Příprava kapitoly Příprava knihoven. Přidáno <ul style="list-style-type: none"> Slovo „certifikovaná“ k termínu voda prostá DNáz/RNáz. Některá z následujících čteček mikrodisek nebo ekvivalentní zařízení, SpectraMax M2, M3, M4, M5 a poznámka. V části VeriSeq NIPT Microlab STAR vysvětlení postupu při zpracování chyb. Poznámka o vizuální kontrole jamek. Pokyny pro dávky 24 a 48 vzorků ve všech částech protokolu. Kroky pro případ použití fialové nebo ekvivalentní desky adaptéru. Doplnění části Demografické údaje a charakteristiky těhotenství o výsledky z prvního trimestru těhotenství. Doplnění specifikací desek s hlubokými jamkami o odolnost proti zkroucení. Aktualizováno.
		<ul style="list-style-type: none"> Vysvětlení jedinečných názvů dávek pro lepší přehlednost a uvedení příkladu. Symbole a formátování poznámek, upozornění a varování. Výsledky dílčích testů. Guanidinthiokyanát na guanidinhydrochlorid. CVS na BVS (základní vakuovací soustava). Vysvětlení používání celogenomového vyšetření a skóre LLR. Specifikace: Specifikace zkumavky na reagentie, desky s hlubokými jamkami, desky s 384 jamkami, desky s 96 jamkami.

Dokument	Datum	Popis změny
Dokument č. 1000000078751 v06	Srpen 2021	Byla aktualizována adresa oprávněného zástupce v EU.
Dokument č. 1000000078751 v05	Prosinec 2020	<p>Části Principy postupu, Varování a preventivní opatření a Štítky na produktech byly aktualizovány a doplněny o další vysvětlení za účelem splnění regulačních požadavků.</p> <p>Byly provedeny aktualizace obsahu v protokolu, aby odpovídal aktuálnímu stylu a uspořádání podle společnosti Illumina.</p> <p>V části Přesnost analytické účinnosti byl opraven popis chromozomu 21 z „druhého nejmenšího lidského autozomu“ na „nejmenší lidský autozom“.</p> <p>Do částí Příprava na izolaci plazmy a Interpretace výsledků byla přidána prohlášení s upozorněními, která se týkají nesprávného používání zásobníků a rizik sloučení vzorků.</p> <p>Byla přidána nová katalogová čísla serveru a softwaru v rámci vydání nového modelu serveru a aktualizací katalogových čísel softwaru.</p> <p>Do protokolu a informací o řešení problému byla přidána upozornění týkající se řešení a prevence přetečení vzorků.</p> <p>V části Standard kvantifikace DNA v rámci sady s příslušenstvím byly aktualizovány účinné látky v reagentii, aby stav odpovídal bezpečnostním listům.</p> <p>Byly aktualizovány konvence pro pojmenování modulu Local Run Manager VeriSeq NIPT za účelem konzistence s ostatní dokumentací.</p> <p>Byla přidána historie revizí.</p>
Dokument č. 1000000078751 v04	Říjen 2020	Menší opravy.
Dokument č. 1000000078751 v03	Září 2020	Byl aktualizován seznam materiálů, aby obsahoval specifikace laboratorního vybavení se známými kompatibilními alternativami.

Dokument	Datum	Popis změny
Dokument č. 1000000078751 v02	Únor 2020	<p>Byla aktualizována prezentace informací v části Klinická účinnost, aby lépe vyjadřovala rozdíly mezi základním a celogenomovým vyšetřením.</p> <p>Byla přidána nová část Rozdíly v účinnosti základního a celogenomového vyšetření.</p> <p>Z části Principy postupu byly odstraněny rozporuplné informace o volitelnosti doplňkového výkazu.</p> <p>V celém dokumentu byly aktualizovány konvence pro pojmenování softwaru VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 za účelem zajištění stylistické konzistence.</p> <p>Bylo aktualizováno označení adres společností Illumina Australia a Illumina Netherlands, aby odpovídalo nedávným změnám.</p>
Dokument č. 1000000078751 v01	Srpen 2019	Byl odstraněn duplicitní krok v části Extrakce cfDNA, který byl způsoben chybou publikačního softwaru.
Dokument č. 1000000078751 v00	Květen 2019	První vydání.

Patenty a ochranné známky

Tento dokument a jeho obsah je vlastnictvím společnosti Illumina, Inc. a jejích přidružených společností (dále jen „Illumina“). Slouží výlučně zákazníkovi ke smluvním účelům v souvislosti s použitím zde popsaných produktů a k žádnému jinému účelu. Tento dokument a jeho obsah nesmí být používán ani šířen za žádným jiným účelem ani jinak sdělován, zveřejňován či rozmnožován bez předchozího písemného souhlasu společnosti Illumina. Společnost Illumina nepředává tímto dokumentem žádnou licenci na svůj patent, ochrannou známku, autorské právo či práva na základě zvykového práva ani žádná podobná práva třetích stran.

Pokyny v tomto dokumentu musí být důsledně a výslovně dodržovány kvalifikovaným a řádně proškoleným personálem, aby bylo zajištěno správné a bezpečné používání zde popsaných produktů. Veškerý obsah tohoto dokumentu musíte před použitím takových produktů beze zbytku přečíst a pochopit.

NEDODRŽENÍ POŽADAVKU NA PŘEČTENÍ CELÉHO TEXTU A NA DŮSLEDNÉ DODRŽOVÁNÍ ZDE UVEDENÝCH POKYNŮ MŮŽE VÉST K POŠKOZENÍ PRODUKTŮ, PORANĚNÍ OSOB, AŽ UŽ UŽIVATELŮ ČI JINÝCH OSOB, A POŠKOZENÍ JINÉHO MAJETKU A POUŽÍVÁNÍ KE ZNEPLATNĚNÍ JAKÉKOLI ZÁRUKY VZTAHUJÍCÍ SE NA PRODUKT.

SPOLEČNOST ILLUMINA NA SEBE NEBERE ŽÁDNOU ODPOVĚDNOST VYPLÝVAJÍCÍ Z NESPRÁVNÉHO POUŽITÍ ZDE POPSANÝCH PRODUKTŮ (VČETNĚ DÍLŮ TĚCHTO PRODUKTŮ NEBO SOFTWARE).

© 2022 Illumina, Inc. Všechna práva vyhrazena.

Všechny ochranné známky jsou vlastnictvím společnosti Illumina, Inc. nebo jejich příslušných vlastníků. Informace o konkrétních ochranných známkách naleznete na adrese www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktní údaje



Illumina

5200 Illumina Way

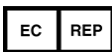
San Diego, Kalifornie 92122 USA

+1 800 809 ILMN (4566)

+1 858 202 4566 (mimo Severní Ameriku)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com



Illumina Netherlands B.V.

Steenoven 19

5626 DK Eindhoven

Nizozemsko

Australský sponzor

Illumina Australia Pty Ltd

Nursing Association Building

Level 3, 535 Elizabeth Street

Melbourne, VIC 3000

Austrálie

Štítky na produktech

Úplné reference k symbolům, které se objevují na balení a označení produktu, naleznete v klíči symbolů na adrese support.illumina.com na kartě *Documentation* (Dokumentace) příslušné sady.

Shrnutí bezpečnosti a výkonu (SSP) se po spuštění Evropské databáze zdravotnických prostředků (Eudamed) nachází na adrese <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>. Je spojeno se základním UDI-DI (0081627002NIPTRP).