

Pakkausseloste

IN VITRO -DIAGNOSTISEEN KÄYTTÖÖN

Aiottu käyttötarkoitus

VeriSeq NIPT Solution v2 on *in vitro* -diagnostiikkatesti, joka on tarkoitettu käytettäväksi seulontatutkimukseen sikiön genominlaajuisten geneettisten poikkeamien havaitsemiseksi. Tutkimus tehdään vähintään 10 viikkoa raskaana olleen naisen perifeerisestä kokoverinäytteestä. VeriSeq NIPT Solution v2 käyttää koko genomin sekvensointia havaitsemaan kaikkien autosomien osittaiset duplikaatiot ja deleetiot ja kaikkien kromosomien aneuploidiatilan. Testi sisältää mahdollisuuden pyytää sukupuolikromosomien aneuploidioiden (SCA, sex chromosome aneuploidy) raportointia. Tätä tuotetta ei tule käyttää ainoana diagnostiikkaperusteena tai raskauteen liittyvien päätösten perustana.

VeriSeq NIPT Solution v2 sisältää: VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 -ohjelmiston VeriSeq NIPT Microlab STAR -tuotteelle, VeriSeq NIPT Sample Prep -näytteenvalmistelupakkaukset ja VeriSeq Onsite Server v2 -palvelimen, jossa on VeriSeq NIPT Assay Software v2 -ohjelmisto. VeriSeq NIPT Solution v2 on tarkoitettu käytettäväksi uuden sukupolven sekvensointilaitteen kanssa.

Määrittelyn yhteenveto ja selitys

Sikiön kromosomipoikkeamat, erityisesti aneuploidia eli kromosomien poikkeava määrä, ovat yleinen syy hedelmöittymisen epäonnistumisen, synnynnäisten poikkeavuuksien, kehitysviiveiden ja älyllisen kehityksen puutteiden taustalla. Aneuploidia ilmenee noin yhdellä 300:sta elävänä syntyneestä, ja enemmän keskenmenotapauksissa ja kuolleena syntyneissä.^{1,2} Viime aikoihin asti on ollut kahdentyypisiä syntymää edeltäviä testejä näihin tiloihin: diagnostinen testaus tai seulonta. Diagnostinen testaus sisältää invasiivisia toimenpiteitä, kuten lapsivesinäyte tai sikiön suonikalvon nukkanäyte. Nämä testausmenetelmät katsotaan sikiön aneuploidian havaitsemisen kultaiseksi standardiksi. Niihin kuitenkin liittyy raskauden keskeytymisen riski 0,11–0,22 %:ssa tapauksista.³ Konventionaalisilla usean markkerin seulonnoilla ei ole raskauden keskeytymisen vaaraa, koska ne ovat kajoamattomia, mutta eivät yhtä tarkkoja kuin diagnostiset testit. Niiden havaitsemisaste trisomian 21 havaitsemisessa vaihtelee välillä 69–96 % käytetyn seulonnan, äidin iän ja testaushetken gestaatioiän perusteella.⁴ Mikä tärkeintä, niiden virheellisten positiivisten tulosten määrä on noin 5 %, mikä voi johtaa invasiiviseen diagnostiseen testaukseen varmistusta varten ja siten toimenpiteeseen liittyvään raskauden keskeytymiseen.⁴ Ultraääniseulonnat voivat myös havaita kromosomipoikkeavuuksia, mutta ne ovat vieläkin epävarmempia kuin nämä muut menetelmät.

Kromosomien 21, 18, 13, X ja Y sikiön aneuploidia voidaan havaita hyvin tarkasti kajoamattomalla syntymää edeltävällä testauksella (noninvasive prenatal testing, NIPT) käyttämällä soluttoman DNA:n koko genomin sekvensointia äidin plasmanäytteestä, joka on otettu 10. gestaatioviikolla tai myöhemmin. Viimeaikaisessa useiden kliinisten tutkimusten meta-analyysissä raportoitiin painotetut poolatut havaitsemisasteet ja

-tarkkuudet trisomian 21 ja 18 osalta yksösraskauksissa seuraavasti: trisomia 21 99,7 % ja 99,96 % sekä trisomia 18 97,9 % ja 99,96 %.⁵ Yhdessä tutkimuksessa ehdotettiin, että NIPT-testauksen käyttö ensisijaisena seulontana kaikissa raskauksissa voisi vähentää varmistukseksi tehtyjä invasiivisia toimenpiteitä 89 %:lla.⁶

Otaen huomioon merkittävä virheellisten positiivisten määrän väheneminen NIPT-testauksessa verrattuna konventionaaliseen usean markkerin seulontaan lukuisat ammattimaiset lääketieteelliset organisaatiot ovat julkaisseet mielipidelauselmia, joissa tuetaan useita NIPT-testauksen käytön indikaatioita.

Erityisesti International Society for Prenatal Diagnosis, American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) / Society for Maternal Fetal Medicine (SMFM), American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) ja European Society of Human Genetics / American Society of Human Genetics tukevat NIPT-testauksen tarjoamista kaikille raskaana oleville naisille.^{7,8,9} Testausta edeltävää neuvontaa, tietoista suostumusta ja diagnostista testausta positiivisen cfDNA-seulontatuloksen varmistamiseen suositellaan.⁴

VeriSeq NIPT Solution v2 on kajoamaton in vitro -diagnostinen (IVD) testi, joka hyödyntää cfDNA-fragmenttien koko genomien sekvensointia äidiltä aikaisintaan 10. gestatioviikolla saaduista perifeerisistä kokoverinäytteistä. Valittavissa on kaksi eri seulontatutkimustyyppiä: basic (perus) ja genomewide (koko genomi). Perusseulonta tutkii aneuploidiat vain kromosomeista 21, 18, 13, X ja Y. Koko genomien laajuudessa seulonnassa selvitetään kaikkien autosomien osittaiset deletiot ja duplikaatiot sekä kaikkien kromosomien aneuploidiat. Molemmissa seulontatyypeissä on mahdollisuus sukupuolikromosomien aneuploidian (SCA) raportoimiseen joko ilman sikiön sukupuolen raportoimista tai sen kanssa. Sukupuolikromosomien aneuploidian raportointivaihtoehto voidaan kytkeä pois. Jos sukupuolikromosomien aneuploidian raportointi kytketään pois, myöskään sikiön sukupuolta ei raportoida. Lisätietoa sukupuolen raportoinnin vaihtoehtoista on *VeriSeq NIPT Solution v2 -ohjelmiston ohjeessa (asiakirjanro 100000067940)*.

Menetelmän periaatteet

VeriSeq NIPT Solution v2 on automaattinen ratkaisu laboratorion NIPT-testaukseen, joka koostuu automaattisesta näytteenvalmistelusta ja sekvensointitietojen analyysistä. VeriSeq NIPT -näytteenvalmistelupakkaukset ovat erityisiä kertakäyttöisiä reagensseja, joita käytetään yhdessä VeriSeq NIPT Microlab STAR -laitteen kanssa valmistelemaan 24, 48 tai 96 näytteen erää uuden sukupolven sekvensointia varten. Koko genomien paritettujen päiden sekvensointitiedot analysoi erikoisohjelmisto VeriSeq NIPT Assay Software v2, joka luo raportin kvalitatiivisista tuloksista.

Työnkulku koostuu seuraavista toimenpiteistä: näytteenotto, plasman eristys, cfDNA:n eristäminen, kirjaston valmistelu, kirjaston kvantifiointi, kirjaston poolaus, sekvensointi ja analyysi, joista on seuraavassa lisätietoja:

- **Näytteenotto** — 7–10 ml äidin perifeeristä kokoverta otetaan Streck cell-free DNA Blood Collection Tube (BCT) -verinäyteputkeen, joka estää solujen lyysautumisen ja genomien kontaminaation ja vakauttaa kokoveren.
- **Plasman eristys** — 5 vuorokauden sisällä näytteenotosta plasma eristetään äidin perifeerisestä kokoverestä käyttämällä tavallisia sentrifugointitekniikoita. VeriSeq NIPT Microlab STAR aspiroi ja jakaa plasman 96-syväkuoppalevyyn myöhempää käsittelyä varten. Mikäli uudelleentestausta tarvitaan, jälkikäsiteltävät näytteet voidaan sulkea korkilla ja asettaa säilytykseen 4 °C:n lämpötilaan vielä 5 vuorokaudeksi (säilytys enintään 10 vuorokautta verinäytteen ottamisen jälkeen).

**HUOMIO**

Edellä mainittujen säilytysaikojen ylittäminen voi vaikuttaa negatiivisesti yksittäisen näytteen hylkäysasteeseen.

- **cfDNA:n eristäminen** — cfDNA:n puhdistus plasmasta tehdään adsorptiolla sidontalevyyn, pesemällä sidontalevystä kontaminaatiot ja eluoimalla.
- **Kirjaston valmistelu** — Puhdistetuille cfDNA-fragmenteille tehdään päidenkorjaus, jossa muutetaan 5'- ja 3'-päät tylpiksi. Seuraavaksi 3'-päihin lisätään deoksiadenosiininukleotidi yhden emäksen ulokkeen luomiseksi. Indeksoidut sovittimet, joissa on yhden emäksen 3'-deoksitymidiiniuloke, liitetään sitten käsiteltyihin cfDNA-fragmenteihin. Liitetty DNA puhdistetaan kiinteän faasin käänteisillä immobilisaatorakeilla. Jokainen näyte 24, 48 tai 96 näytteen joukosta saa yksilöllisen indeksoidun sovittimen. Sovittimilla on kaksi tarkoitusta:

**HUOMIO**

Ole erittäin varovainen estääksesi indeksien ristikontaminaation, joka voi johtaa virheellisiin tuloksiin.

- Indeksit mahdollistavat näytteen tunnistuksen myöhemmässä sekvensoinnissa.
- Indeksisovittimet sisältävät sekvenssejä, jotka mahdollistavat kirjaston kiinnittämisen sekvensoivan virtauskyvetin kiinteälle pinnalle klusterin luomista ja myöhempää sekvensointia varten.
- **Kvantifiointi** — kirjastotuote kvantifioidaan käyttämällä fluoresenssiväriä, jonka pitoisuus on määritetty vertaamalla DNA-standardikäyrään.
- **Kirjaston poolaus ja sekvensointi** — Näytekirjastot yhdistetään 24 tai 48 näytteen pooleihin säädettyinä määrinä kattavuuden variaation minimoimiseksi. Jokainen pooli sekvensoidaan sitten käyttämällä uuden sukupolven sekvensointijärjestelmää.
- VeriSeq NIPT Solution v2 ei sisällä sekvensointilaitetta tai tarvikkeita.
- **Analyysi** — Kunkin näytteen analyysi sisältää seuraavat:
 - kirjastofragmenttien tunnistus indeksisekvenssillä ja paritettujen päiden luentojen kohdistus ihmisen referenssigenomiin
 - kirjaston sikiöfraktion arviointi yhdistämällä kirjastofragmenttien tiedot sekä pituuksien että genomikoordinaattien jakaumasta
 - tunnettujen poikkeamien huomioon ottamisen jälkeen tilastollinen malli tunnistaa genomista alueita, jotka ovat ali- tai yliedustettuja kirjastossa ja viittaavat siten poikkeamaan sikiöfraktion arvioidulla tasolla
 - NIPT-raportissa on yhteenveto valitun testivalikon tuloksista, missä on mainittu ANOMALY DETECTED (Poikkeavuus havaittu) tai NO ANOMALY DETECTED (Poikkeavuutta ei havaittu) sekä sikiöfraktioarvio laadunvalvonnan läpäisseistä näytteistä
 - lisäraportissa on kvantitatiivisia metriikoita kustakin havaitusta poikkeavuudesta.

Menetelmän rajoitukset

Määrittelyn rajoitukset

- Testin herkkyys- ja spesifisyystodisteet koskevat yksös- ja kaksosraskauksia. Nämä käyttöohjeet eivät anna herkkyys- tai spesifisyystietoja kolmosista tai useamman sikiön raskauksista.
- VeriSeq NIPT Solution v2 -tuotetta ei ole tarkoitettu polyploidian, kuten triploidian, havaitsemiseen.
- VeriSeq NIPT Solution v2 -tuotetta ei ole tarkoitettu tasapainoisten kromosomien uudelleenjärjestäytymisten havaitsemiseen.
- Määrittely edellyttää äidin perifeerisiä kokoverinäytteitä, kun nainen on ollut raskaana vähintään 10 viikkoa.
- Peruseulonnoissa VeriSeq NIPT Solution v2 -testi etsii tiettyjä kromosomipoikkeavuuksia. Tulokset NO ANOMALY DETECTED (Poikkeavuutta ei havaittu) eivät sulje pois testattujen kromosomien kromosomipoikkeavuuksien mahdollisuutta. Negatiivinen tulos ei sulje pois mahdollisuutta, että raskaudessa on muita kromosomipoikkeavuuksia, geneettisiä tiloja tai syntymävikoja (esim. hermoputken sulkeutumishäiriö).
- Genominlaajuisissa seulonnoissa suuret deletiot ja duplikaatiot, jotka ovat alle 75 % kromosomin koosta, voivat viitata koko kromosomin aneuploidiaan.
- Genominlaajuisissa seulonnoissa tietyt alueet suljetaan pois analyysistä. Luettelo sulkulistalla olevista alueista on saatavilla Illuminan tuen verkkosivuilla. Genomisen poikkeavuuden havaitseminen tehdään vain ei-poissuljetuilta alueilta.
- Sikiön sukupuolen raportointi ei ole saatavilla kaikilla alueilla paikallisten sukupuolen raportointia koskevien säädösten mukaan.
- Kirjallisuuden todisteiden perusteella soluvapaaseen DNA:han perustuvat seulontatulokset voidaan lisätä tiettyihin äidin ja sikiön tekijöihin. Alle on lueteltu joitakin niistä, mutta ne eivät rajoitu seuraaviin:
 - äskettäinen äidin verensiirto
 - äidin elinsiirto / kantasolusiirto
 - äidin autoimmuunisairaus
 - äidin neoplasmat (hyvänlaatuiset ja pahanlaatuiset)
 - äidin mosaikismi
 - äidin jäljennösmäärien variaatio
 - fetoplasentaalinen mosaikismi / rajoitettu plasentaalinen mosaikismi
 - sikiön kuolema / katoava kaksonen

VeriSeq NIPT Solution v2 -raportointi

- VeriSeq NIPT Solution v2 on seulontatesti, eikä sitä pidä huomioida erikseen muista kliinisistä löydöksistä ja testituloksista. Johtopäätökset sikiön tilasta ja raskauden hoitopäätökset eivät saa perustua pelkästään NIPT-seulonnan tuloksiin.⁷
- VeriSeq NIPT Solution v2 raportoi seuraavista:
 - Perusseulontatestit kromosomien 13, 18 ja 21 yliedustuksesta.
 - Genominlaajuiset seulontatestit kaikkien autosomien ali- ja yliadustuksesta, mukaan lukien vähintään 7 Mb:n osittaiset deleetit ja duplikaatiot.
 - Yksösraskauksissa, joissa on valittu Yes (Kyllä) tai SCA sukupuolen raportointivaihtoehdoksi, on seuraavat sukupuolikromosomin poikkeavuudet: XO, XXX, XXY ja XYY.
 - Yksösraskauksissa, joissa on valittu Yes (Kyllä) sukupuolen raportointivaihtoehdoksi, raportoidaan sikiön sukupuoli.
 - Y-kromosomin läsnäolo kaksosraskauksissa.

Tuotteen osat

VeriSeq NIPT Solution v2 (osanro 20030577) sisältää seuraavat näytteenvalmistelupakkaukset:

- VeriSeq NIPT Sample Prep (24 samples) (osanro 20025895)
- VeriSeq NIPT Sample Prep (48 samples) (osanro 15066801)
- VeriSeq NIPT Sample Prep (96 samples) (osanro 15066802)

VeriSeq NIPT Solution v2 (osanro 20030577) sisältää seuraavat ohjelmistokomponentit:

- VeriSeq NIPT Assay Software v2 (osanro 20047024), esiasennettu VeriSeq Onsite Server v2 -palvelimeen.
 - VeriSeq Onsite Server v2 (osanro 20028403 tai 20047000) tai olemassa oleva VeriSeq Onsite Server (osanro 15076164 tai 20016240), joka päivitetään versioon 2.
- VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 (osanro 20044988), esiasennettu VeriSeq NIPT Microlab STAR -laitteeseen.
 - VeriSeq NIPT Microlab STAR (osanro Hamilton Company -yrityksen Renon toimipaikassa: 95475-01 (115V) & 95475-02 (230 V), Hamilton Company -yrityksen Bonaduzin toimipaikassa: 806288).
- Local Run Manager VeriSeq NIPT -moduuli (osanro 20044989).

Reagenssit

Mukana tulevat reagenssit

illumina toimittaa seuraavat reagenssit: VeriSeq NIPT Sample Prep (24 samples) (osanro 20025895), VeriSeq NIPT Sample Prep (48 samples) (osanro 15066801) ja VeriSeq NIPT Sample Prep (96 samples) (osanro 15066802). VeriSeq NIPT Sample Prer -näytteenvalmistelupakkaukset sopivat käytettäväksi VeriSeq NIPT Microlab STAR (ML STAR) -laitteen (osanro 95475-01, 95475-02 tai 806288) kanssa, jonka toimittaa Hamilton Company.

VeriSeq NIPT -näytteenvalmistelu, eristämislaitteisto

Taulukko 1 VeriSeq NIPT -eristämislaitteisto (24) ja (48), osanumero 20025869 ja 15066803

Reagenssin nimi etiketissä	Pakkauksessa olevien säiliöiden määrä	Aktiiviset ainesosat	Säilytys
Lysis Buffer (Lyysauspuskuri)	1	Guanidiinihydrokloridi puskuroidussa vesiliuoksessa	15–30 °C
Wash Buffer I (Pesupuskuri I)	1	Guanidiinihydrokloridi ja 2-propanoli puskuroidussa vesiliuoksessa	15–30 °C
Wash Buffer II (Pesupuskuri II)	1	Suoloja sisältävä puskuroitu vesiliuos	15–30 °C
Elution Buffer (Eluutiopuskuri)	1	Puskuroitu vesiliuos	15–30 °C
Proteinase Buffer (Proteinaasipuskuri)	1	Glyseroli puskuroidussa vesiliuoksessa	15–30 °C
Proteinase K (Proteinaasi K)	3	Kylmäkuivattu proteinaasi K	15–30 °C

Taulukko 2 VeriSeq NIPT -eristämislaitteisto (96), osanumero 15066807

Reagenssin nimi etiketissä	Pakkauksessa olevien säiliöiden määrä	Aktiiviset ainesosat	Säilytys
Lysis Buffer (Lyysauspuskuri)	1	Guanidiinihydrokloridi puskuroidussa vesiliuoksessa	15–30 °C

Reagenssin nimi etiketissä	Pakkauksessa olevien säiliöiden määrä	Aktiiviset ainesosat	Säilytys
Wash Buffer I (Pesupuskuri I)	1	Guanidiinihydrokloridi ja 2-propanoli puskuroidussa vesiliuoksessa	15–30 °C
Wash Buffer II (Pesupuskuri II)	2	Suoloja sisältävä puskuroitu vesiliuos	15–30 °C
Elution Buffer (Eluutiopuskuri)	1	Puskuroitu vesiliuos	15–30 °C
Proteinase Buffer (Proteinaasipuskuri)	1	Glyseroli puskuroidussa vesiliuoksessa	15–30 °C
Proteinase K (Proteinaasi K)	4	Kylmäkuivattu proteinaasi K	15–30 °C

VeriSeq NIPT -näytteenvalmistelu, kirjastonvalmistelulaatikko

Taulukko 3 VeriSeq NIPT -kirjastonvalmistelulaatikko (24) ja (48), osanumero 20026030 ja 15066809

Reagenssin nimi etiketissä	Pakkauksessa olevien säiliöiden määrä	Aktiiviset ainesosat	Säilytys
End Repair Mix (Lopun korjausseos)	1	DNA-polymeraasi ja dNTP:t puskuroidussa vesiliuoksessa	-25...-15 °C
A-Tailing Mix (A-hännänmuodostusseos)	1	DNA-polymeraasi ja dATP puskuroidussa vesiliuoksessa	-25...-15 °C
Ligation Mix (Ligaatioseos)	1	DNA-ligaasi puskuroidussa vesiliuoksessa	-25...-15 °C
Hybridization Buffer (Hybridisaatiopuskuri)	1	Puskuroitu vesiliuos	-25...-15 °C
NIPT DNA Adapter Plate (NIPT DNA -sovitinlevy)	1	Oligonukleotidit puskuroidussa vesiliuoksessa	-25...-15 °C

Taulukko 4 VeriSeq NIPT -kirjasto valmistelulaatikko (96), osanumero 15066810

Reagenssin nimi etiketissä	Pakkauksessa olevien säiliöiden määrä	Aktiiviset ainesosat	Säilytys
End Repair Mix (Lopun korjausseos)	1	DNA-polymeraasi ja dNTP:t puskuroidussa vesiliuoksessa	-25...-15 °C
A-Tailing Mix (A-hännänmuodostusseos)	2	DNA-polymeraasi ja dATP puskuroidussa vesiliuoksessa	-25...-15 °C
Ligation Mix (Ligaatioseos)	2	DNA-ligaasi puskuroidussa vesiliuoksessa	-25...-15 °C
Hybridization Buffer (Hybridisaatiopuskuri)	1	Puskuroitu vesiliuos	-25...-15 °C
NIPT DNA Adapter Plate (NIPT DNA -sovitinlevy)	1	Oligonukleotidit puskuroidussa vesiliuoksessa	-25...-15 °C

VeriSeq NIPT -näytteen valmistelu, lisävarustelaatikko

Taulukko 5 VeriSeq NIPT -lisävarustelaatikko, osanumero 15066811

Reagenssin nimi etiketissä	Pakkauksessa olevien säiliöiden määrä	Aktiiviset ainesosat	Säilytys
DNA Binding Plate (DNA:n sidontalevy)	1	Propyleenimikrolevy, jossa muokattu silikonikalvo	2-8 °C
Resuspension Buffer (Uudelleensuspensiopuskuri)	1	Puskuroitu vesiliuos	2-8 °C
Sample Purification Beads (Näytteen puhdistusrakeet)	1	Kiinteän faasin paramagneettiset rakeet puskuroidussa vesiliuoksessa	2-8 °C
DNA Quantification Reagent (DNA:n kvantifiointireagenssi)	1	DNA:n interkalaatioväri DMSO:ssa	2-8 °C
DNA Quantification Standard (DNA:n kvantifiointistandardi)	1	dsDNA-standardi, epäspesifinen DNA ja natriumatsidi puskuroidussa vesiliuoksessa	2-8 °C

VeriSeq NIPT -näytteenvalmistelu, työnkulun putket ja etiketit

Taulukko 6 Työnkulun putket ja etiketit, osanumero 15071543

Tuotteen nimi etiketissä	Tuotteiden määrä pakkauksessa	Säilytys
Label (LBL)–Plate Barcode (Etiketti (LBL) – levyn viivakoodi)	9	15–30 °C
Label (LBL)–Deep-well Plate Barcode (Etiketti (LBL) – syväkuoppalevyn viivakoodi)	12	15–30 °C
Tube (TB)–Empty Pooling Tube (Putki (TB) – tyhjä poolausputki)	5	15–30 °C

Erikseen hankittavat reagenssit

Erikseen hankittavat pakolliset reagenssit

- Uuden sukupolven sekvensointijärjestelmään (NGS) tarvittavat sekvensointireagenssit ja tarvikkeet
- Sertifioitu DNAasiton/RNAasiton vesi
- Etanoli, 100 % (200 proof), molekyylibiologialuokka

HUOMAUTUS Muu kuin molekyylibiologialuokan etanoli saattaa vaikuttaa negatiivisesti kokeen suorituskykyyn.

Erikseen hankittavat valinnaiset reagenssit

- Dulbecon fosfaattipuskuroitu suolaliuos (DPBS) mallineettomaan kontrolliin (NTC)

Säilytys ja käsittely

1. Huoneen lämpötilan määritelmänä on 15–30 °C.
2. Kaikki reagenssit ovat kertakäyttöisiä. Kun reagenssit on valmisteltu käyttöä varten, ne on käytettävä välittömästi.
3. Jos pakkaus tai VeriSeq NIPT Solution -tuotteen osat vaurioituvat tai vaarantuvat, ota yhteyttä Illuminan asiakaspalveluun.
4. Reagenssit ovat stabiileja pakkauksen merkinnöissä ilmoitettuun viimeiseen käyttöpäivään asti, kun niitä säilytetään ilmoitetuissa olosuhteissa. Katso säilytysolosuhteet taulukon Säilytys-sarakkeesta kohdasta [Reagenssit sivulla 6](#). Vanhentuneita reagensseja ei saa käyttää.

5. Toimitettujen reagenssien fyysisen ulkoasun muutos voi olla osoitus materiaalien huononemisesta. Jos ilmenee fyysisen ulkoasun muutoksia, kuten reagenssin värin ilmiselviä muutoksia tai mikrobikontaminaatiolle ominaista sakkaisuutta, älä käytä reagensseja.
6. Noudata seuraavia parhaita käytäntöjä, kun käsittelet näytteenpuhdistusrakeita:
 - Älä koskaan pakasta rakeita.
 - Anna rakeiden lämmentä huoneenlämpöiseksi ennen käyttöä.
 - Vorteksoi rakeita juuri ennen käyttöä, kunnes ne ovat hyvin suspendoituneet ja väri vaikuttaa tasaiselta.
7. Lyysauspuskuri, pesupuskuri I, pesupuskuri II, eluutiopuskuri ja proteinaasipuskuri voi muodostaa näkyviä saostumia tai kiteitä. Ennen käyttöä vorteksoi voimakkaasti ja tarkista sitten visuaalisesti, ettei näy saostumia.
8. Älä koskaan pakasta kokoverta näytteenoton jälkeen.
9. Sekvensoi kirjastot mahdollisimman pian poolauksen jälkeen. Poolatut kirjastot ovat stabiileja enintään 7 vuorokautta lämpötilassa -25...-15 °C. Lisädenaturaatiota ei tarvita, jos kirjastoja säilytetään tämä ajanjakso näissä olosuhteissa.

Välineet ja materiaalit

Tarvittavat välineet ja materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen

Tarvittavat laitteet, jotka eivät kuulu toimitukseen

Laitteet	Toimittaja
Seuraavan sukupolven sekvensointijärjestelmä (NGS), jolla on seuraavat ominaisuudet: <ul style="list-style-type: none"> • 2 x 36 bp parillisen pään sekvensointi • Yhteensopiva VeriSeq NIPT -näytteen valmistelun kaksoisindeksisovittimet • BCL-tiedostojen automaattinen tuotanto • Kahden kanavan kemia • 400 miljoonaa parillisen pään readia per ajo • Yhteensopiva VeriSeq NIPT Assay Software v2:n tai NextSeq 550Dx Sequencing System -järjestelmän kanssa 	Laitteen toimittaja tai Illumina, osanro 20005715
Pakastin, -25...-15 °C	Yleinen laboratoriotuottaja

Laitteet	Toimittaja
Mikrosentrifugi	Yleinen laboratoriotuottaja
Pipettiapu	Yleinen laboratoriotuottaja
Jääkaappi, 2–8 °C	Yleinen laboratoriotuottaja
20 µl:n yksikanavapipetit	Yleinen laboratoriotuottaja
200 µl:n yksikanavapipetit	Yleinen laboratoriotuottaja
1 000 µl:n yksikanavapipetit	Yleinen laboratoriotuottaja
Vorteksointilaite	Yleinen laboratoriotuottaja
Sentrifugi- ja roottorikokoonpano verinäytteenottoputkille	
Vastaava tuote:	Yleinen laboratoriotuottaja
<ul style="list-style-type: none"> Jäähdyttävä sentrifugi, jonka kapasiteetti on 1 600 × g ja johon kuuluu jarruton vaihtoehto Kääntyvä kauharoottori, joka on varustettu kauhoilla Kauhasisäkkeet, 24, 48 tai 96 putken kapasiteetti, 76 mm:n vähimmäissyvyys Vie sisään sovittimet tukemaan 16 x 100 mm:n verinäytteenottoputkia 	Beckman Coulter, tuotenro 392304 (120 V tai 230 V)
Suositus:	
<ul style="list-style-type: none"> Allegra X12R Series -sentrifugi, 1 600 g 	Beckman Coulter, tuotenro 369704
<ul style="list-style-type: none"> Allegra-sentrifugi GH-3.8, roottori ja kannatinkupit 	Beckman Coulter, tuotenro 392805
<ul style="list-style-type: none"> Allegra-sentrifugin kannatinkuppien kannet, kahden kpl:n sarja 	Beckman Coulter, tuotenro 359150
<ul style="list-style-type: none"> Allegra-sentrifugin sovitinkokoonpano, 16 mm, neljän kpl:n sarja 	

Sentrifugi- ja roottorikokoonpano mikrolevyille

Laitteet	Toimittaja
<p>Vastaava tuote:</p> <ul style="list-style-type: none"> Sentrifugi, jonka kapasiteetti on 5 600 × g Kääntyvä levyroottori 96 kuopan levytelineillä, 76,5 mm:n vähimmäissyvyys. Multifuge X4 Pro-MD 120V TX-1000BT Sorvall Legend XTR -sentrifugi <p>HIGHPlate 6000 -mikrolevyroottori</p> <p>Rotor high plate 6000</p> <p>Mikrolevyjen tukialusta</p> <ul style="list-style-type: none"> Suositus: <ul style="list-style-type: none"> MicroAmp 96 kuopan tukialusta 96 kuopan levyteline 	<p>Yleinen laboratoriotuottaja</p> <p>Thermo Scientific VWR, kuvastonro 76326-254</p> <p>Thermo Fisher Scientific, kuvastonro 75004521 (120 V) tai kuvastonro 75004520 (230 V)</p> <p>Thermo Fisher Scientific, kuvastonro 75003606</p> <p>Thermo Scientific VWR, kuvastonro 97040-244</p> <p>Thermo Fisher Scientific, kuvastonro 4379590</p> <p>Thermo Fisher Scientific, kuvastonro AB-0563/1000</p>
<p>Yksi seuraavista mikrolevylukijoista, tai vastaava, (fluoresenssimittari) SoftMax Pro v6.2.2:n tai sitä uudemman version kanssa:</p> <ul style="list-style-type: none"> Gemini XPS SpectraMax M2, M3, M4 ja M5. <ul style="list-style-type: none"> Violetti sisus sisältyy mikrolevylukijaan käytettäväksi työkulussa 	<p>Molekyyllilaitteet, osanro XPS</p> <p>Molekyyllilaitteet, osanro M2, M3, M4 ja M5</p>
SpectraMax-suurnopeus-USB, sarjasovitin	Molekyyllilaitteet, osanro 9000-0938
<p>Lämpöblokki seuraavin tiedoin:</p> <ul style="list-style-type: none"> Lämmitetty kansi 4...98 °C:n lämpötila-alue ±2 °C:n lämpötilatarkkuus Rampin nopeus vähintään 2 °C sekunnissa Yhteensopiva 96-kuoppaisen Twin.tec PCR -levyn kanssa, helmallinen 	Yleinen laboratoriotuottaja
VeriSeq NIPT Microlab STAR	Hamilton, osanro 95475-01 (115 V), osanro 95475-02 (230 V) tai osanro 806288 (Hamilton Company -yrityksen Bonaduzin toimipaikassa)
VeriSeq Onsite Server v2 -palvelin tai päivitetty VeriSeq Onsite Server -palvelin	illumina, osanro 20028403 tai 20047000 (v2) tai #15076164 tai # 20016240 (päivitetty)
<p>Jos käytössä on NextSeq 550Dx -sekvensointijärjestelmä:</p> <ul style="list-style-type: none"> NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 cycles) 	illumina, osanro 20028870

Valinnainen laitteisto, ei mukana

Laitteet	Toimittaja
Pluggo-korkinpoistojärjestelmä	LGP Consulting, osanro 4600 4450
SpectraMax SpectraTest FL1 -fluoresenssivalidointilevy	Molekyyllilaitteet, osanro 0200-5060
Putkirumpu/pyörityslaite, 15 ml:n putket, 40 rpm, 100–240 V	Thermo Scientific, kuvastonro 88881001 (US) tai kuvastonro 88881002 (EU)

Tarvittavat materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen

Tarvike	Toimittaja
1 000 µl:n konduktiiviset steriloimattomat suodatinkärjet	Hamilton, osanro 235905
300 µl:n konduktiiviset steriloimattomat suodatinkärjet	Hamilton, osanro 235903
50 µl:n konduktiiviset steriloimattomat suodatinkärjet	Hamilton, osanro 235948
Syväkuoppasäiliö seuraavin tiedoin: <ul style="list-style-type: none"> SLAS 1-2004 -mikrolevymalli, jossa on 96 pohjaltaan pyramidin- tai kartionmuotoista kuoppaa ja 240 ml:n vähimmäiskapasiteetti. Polypropeeni ja mieluiten alhainen DNA:n sitoutuminen kaikkien näytekontaktipintojen kohdalla. Sisämitat (nestetaso) ovat yhteensopivia automatisoidun aspiraation ja VeriSeq NIPT Microlab STARin annosteluvaiheiden kanssa. Korkeusmitat ovat yhteensopivia VeriSeq NIPT Microlab STARin automatisoitujen liikkeiden kanssa. 	Yleinen laboratoriotoimittaja Yhteensopivat säiliöt: <ul style="list-style-type: none"> Corning Axygen, tuotenro RES-SW96-HP-SI Agilent, tuotenro 201246-100
Reagenssiputki seuraavin tiedoin: <ul style="list-style-type: none"> Suippopohjainen, vähimmäiskapasiteetiltaan 20 ml:n putki, joka sopii tiukasti mutta ei voimaa käyttäen, VeriSeq NIPT Microlab STARin kantokoteloon. Polypropeenia, joka ei sisällä RNAasia/DNaasia. Sisäisen säiliön mitat (nestetaso) luovat nestetasoja käyttämällä määrityksen reagenssimääriä, jotka ovat yhteensopivia automatisoidun aspiraation ja VeriSeq NIPT Microlab STARin annosteluvaiheiden kanssa. Korkeusmitat ovat yhteensopivia VeriSeq NIPT Microlab STARin automatisoitujen liikkeiden kanssa. 	Yleinen laboratoriotoimittaja Yhteensopivat putket: <ul style="list-style-type: none"> Roche, tuotenro 03004058001

Tarvike	Toimittaja
<p>Syväkuoppalevyt seuraavin tiedoin:</p> <ul style="list-style-type: none">• SLAS 1–2004, 3–2004 ja 4–2004 -mikrolevymalli, jossa on 96 pohjaltaan pyramidin- tai kartionmuotoista kuoppaa ja 2 ml:n vähimmäiskapasiteetti.• Läpikuultava polypropeeni ja mieluiten alhainen DNA:n sitoutumismateriaali kaikkien näytekontaktipintojen kohdalla.• Kuopan mitat luovat nestetasoja, jotka ovat yhteensopivia automatisoidun aspiraation ja VeriSeq NIPT Microlab STARin annosteluvaiheiden kanssa.• Levyn helma, joka mahdollistaa levyn viivakoodien asettamisen vaadittuun paikkaan pitävällä kiinnityksellä tasaiselle pinnalle.• Väännönkestävä kehys kestää vähintään 5600 x g.• Levyn korkeusmitat ovat yhteensopivia VeriSeq NIPT Microlab STARin automatisoitujen liikkeiden kanssa.	<p>Yleinen laboratoriotuottaja</p> <p>Yhteensopivat levyt:</p> <ul style="list-style-type: none">• Eppendorf, osanro 0030505301• Eppendorf, osanro 30502302• USA Scientific, osanro 1896-2000
<p>384 kuopan levy seuraavin tiedoin:</p> <ul style="list-style-type: none">• 384 kuopan mikrolevy, joka on optimoitu pienille tilavuuksille 50 µl:n vähimmäiskuoppatilavuudella.• Musta, läpinäkymätön polypropeeni ja valonesto sekä alhainen DNA:n sitoutuminen kaikkien näytekontaktipintojen kohdalla.• Kuopan mitat luovat nestetasoja, jotka ovat yhteensopivia automatisoidun aspiraation ja VeriSeq NIPT Microlab STARin annosteluvaiheiden kanssa.• Levyn korkeusmitat ovat yhteensopivia VeriSeq NIPT Microlab STARin automatisoitujen liikkeiden kanssa.• Levyn helma, joka mahdollistaa levyn viivakoodien asettamisen vaadittuun paikkaan pitävällä kiinnityksellä tasaiselle pinnalle.	<p>Yleinen laboratoriotuottaja</p> <p>Yhteensopivat levyt:</p> <ul style="list-style-type: none">• Corning, tuotenro 3820

Tarvike	Toimittaja
96 kuopan levy seuraavin tiedoin: <ul style="list-style-type: none"> • Mikrolevy, jossa on väännönkestävä kehys ja joka kestää vähintään 5600 x g, ja 96 läpikuultavaa suippopohjaista kuoppaa, kohotetut reunat ja vähintään 150 µl:n kuoppakapasiteetti. • Polypropeeni, joka ei sisällä RNasea/DNasea ja mieluiten alhainen DNA:n sitoutuminen kaikkien näytekontaktipintojen kohdalla. • Kuopan mitat luovat nestetasoja, jotka ovat yhteensopivia automatisoidun aspiraation ja VeriSeq NIPT Microlab STARin annosteluvaiheiden kanssa. • Levyn korkeusmitat ovat yhteensopivia VeriSeq NIPT Microlab STARin automatisoitujen liikkeiden kanssa. • Levyn helma, joka mahdollistaa levyn viivakoodien asettamisen vaadittuun paikkaan pitävällä kiinnityksellä tasaiselle pinnalle. • Yhteensopiva lämpöblokkien kanssa denaturointia varten. 	Yleinen laboratoriotoimittaja Yhteensopivat levyt: <ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, osanro 0030129512 • Eppendorf, osanro 30129580 • Eppendorf, osanro 30129598 • Eppendorf, osanro 30129660 • Eppendorf, osanro 30129679 • Bio-Rad, osanro HSP9601
Yksi seuraavista peittimistä: <ul style="list-style-type: none"> • Microseal 'F' -kalvo • Kalvosulut 	Bio-Rad, kuvastonro MSF1001 Beckman Coulter, tuotenro 538619
Kuopaton DNA BCT CE	Streck, kuvastonro 218997
Työntökorkit	Sarstedt, tilausno 65.802
2 ml:n ruuvikorkkiputket	Yleinen laboratoriotoimittaja
20 µl:n suodatinkärjet 20 µl:n pipettorille	Yleinen laboratoriotoimittaja
200 µl:n suodatinkärjet 200 µl:n pipettorille	Yleinen laboratoriotoimittaja
1 000 µl:n suodatinkärjet 1 000 µl:n pipettorille	Yleinen laboratoriotoimittaja
Vastaava tuote: <ul style="list-style-type: none"> • Alkoholipohjainen nopea desinfiointisuihke • Desinfiointi-puhdistusaineliuos Suositus: <ul style="list-style-type: none"> • Deionisoitu vesi ja 70-prosenttinen etanoli 	Yleinen laboratoriotoimittaja

Valinnaiset materiaalit, ei mukana

Tarvike	Toimittaja
Dulbecon fosfaattipuskuroitu suolaliuos (DPBS) mallineettomaan kontrolliin (NTC)	Yleinen laboratoriotoimittaja

Tarvike	Toimittaja
Putki, ruuvikorkki, 10 ml (vain kontrollinäytteille)	Sarstedt, tilausno 60.551
Putki, ruuvikorkki, 50 ml	Yleinen laboratoriotoimittaja
25 ml:n serologiset pipetit	Yleinen laboratoriotoimittaja
10 ml:n serologiset pipetit	Yleinen laboratoriotoimittaja

Näytteiden ottaminen, kuljettaminen ja säilyttäminen



HUOMIO

Kaikkia näytteitä on käsiteltävä mahdollisesti tartuntavaarallisina aineina.

- 7–10 ml:n kokoverinäytteet on otettava Streck Cell-Free DNA BCT -näyteputkiin.
- Kokoveren kuljetuksessa on noudatettava kaikkia sovellettavia säädöksiä etiologisten aineiden kuljetuksesta. Nopeutettua lähetystä/kuljetusta suositellaan.
- Kuljetuksen aikana näytteitä on säilytettävä lämpötilassa 4–30 °C. Kun näytteet on vastaanotettu, niitä on säilytettävä 2–8 °C:ssa, kunnes niiden käsittely aloitetaan. Aika verinäytteen ottamisen ja ensimmäisen plasman erottelun välillä saa olla korkeintaan 5 vuorokautta.
- Mikäli uudelleentestausta tarvitaan, jälkikäsiteltävät näytteet voidaan sulkea korkilla ja asettaa säilytykseen 4 °C:n lämpötilaan vielä 5 vuorokaudeksi (säilytys enintään 10 vuorokautta verinäytteen ottamisen jälkeen).



HUOMIO

Edellä mainittujen säilytysaikojen ylittäminen voi vaikuttaa negatiivisesti yksittäisen näytteen hylkäysasteeseen.

Varoitukset ja varotoimet

- Tämä määräys sisältää proteinaasi K:ta. Aineen hengittäminen, nieleminen, ihokosketus tai silmäkosketus voi aiheuttaa vamman. Käytä hyvin tuuletetulla alueella, käytä suojavaatteita, vältä hengittämästä pölyä ja hävitä säiliöt ja käyttämätön sisältö sovellettavien kansallisten turvallisuusstandardien mukaisesti.
- Tämä määräys sisältää guanidiinikloridia. Henkilövahinkoja voi aiheutua hengittämisestä, nielemisestä sekä iho- ja silmäkosketuksesta. Käytä hyvin tuuletetulla alueella, käytä suojavaatteita ja hävitä säiliöt ja käyttämätön sisältö sovellettavien kansallisten turvallisuusstandardien mukaisesti.

- Tämä määrittäminen sisältää 2-propanolia, tulenarkaa kemikaalia. Pidettävä poissa lämmönlähteistä ja avotulesta. Henkilövahinkoja voi aiheutua hengittämisestä, nielemisestä sekä iho- ja silmäkosketuksesta. Käytä hyvin tuuletetulla alueella, käytä suojavaatteita ja hävitä säiliöt ja käyttämätön sisältö sovellettavien kansallisten turvallisuusstandardien mukaisesti.
- Tämä määrittäminen sisältää dimetyylisulfoksidia, syövyttävää ja syttyvää nestettä. Henkilövahinkoja voi aiheutua hengittämisestä, nielemisestä sekä iho- ja silmäkosketuksesta. Käytä hyvin tuuletetulla alueella, käytä suojavaatteita ja hävitä säiliöt ja käyttämätön sisältö sovellettavien kansallisten turvallisuusstandardien mukaisesti.
- Haitallisten kaasujen muodostumisen estämiseksi cfDNA:n eristämistä varten (sisältää guanidiinihydrokloridia) ei saa hävittää valkaisuainetta (natriumhypokloriittia) sisältävän jätteen kanssa.
- Kaikkia näytteitä on käsiteltävä mahdollisesti tartuntavaarallisina aineina.
- Noudata normaaleja laboratoriotyön varotoimia. Älä pipetoi suun avulla. Älä syö, juo tai tupakoi työhön varatuilla alueilla. Käytä kertakäyttöisiä hansikkaita ja laboratoriotakkeja, kun käsittelet näytteitä tai määritysreagensseja. Pese kädet huolellisesti näytteiden ja koereagenssien käsittelyn jälkeen.
- Määrityksen komponentteja ei saa käyttää määrityspakkauksen etiketissä mainitun viimeisen käyttöpäivämäärän jälkeen. Eri määrityserien komponentteja ei saa vaihtaa keskenään. Määrityserä on ilmoitettu määrityspakkauksen etiketissä. Määrityksen komponentteja on säilytettävä määrityksessä lämpötilassa.
- Näytteen tai reagenssin huononemisen estämiseksi on varmistettava, että puhdistuksen jättämät natriumhypokloriittihöyryt ovat haihtuneet täysin ennen protokollan aloittamista.
- Jos annettuja ohjeita ei noudateta, tuloksena voivat olla virheelliset tulokset tai näytteiden laadun merkittävä heikentyminen.
- Kaikki tähän tuotteeseen liittyvät vakavat onnettomuudet on välittömästi ilmoitettava Illuminalle ja toimivaltaisille viranomaisille siinä valtiossa, missä käyttäjä ja potilas ovat.
- Saat ympäristöä, terveyttä ja turvallisuutta koskevia tietoja käyttöturvallisuustiedotteesta (KTT) osoitteessa support.illumina.com/sds.html.

Toimenpidehuomautukset

Kontaminaation välttäminen

- Käytä uusia kärkiä ja laboratoriotarvikkeita.
- Käytä aerosoliresistenttejä kärkiä pienentämään siirtymisen ja näytteiden välisen ristikontaminaation vaaraa.
- Kontaminaatiopotentiaalin vuoksi ole erittäin varovainen, jotta sisältö pysyy kokonaan kuopassa. Älä läikytä sisältöä. Sentrifugoi vorteksoinnin jälkeen.

- Noudata sovellettavia säädöksiä oikeanlaisesta laboratoriokäytännöstä ja hygieniasta käsiteltäessä verta ja veripohjaisia valmisteita.
- Älä käytä valkaisuainesuihkeita, kun valmistelet kirjastoa. Valkaisuainekontaminaatiojäämät voivat saada määrityksen epäonnistumaan.
- Kun avaat levyjä, aseta levy tukevalle, tasaiselle pinnalle ja tartu levyyn tukevasti. Poista peitin hitaasti ja varmista, että peitin ei kosketa altistuneita kuoppia. Varo koskettamasta altistuneita kuoppia tai häiritsemästä sisältöä. Kuoppa-kuoppa-ristikontaminaatio voi aiheuttaa virheellisiä tuloksia.

VeriSeq NIPT Microlab STAR -laitteen alustan puhdistaminen

- Ennen käyttöä on tarkastettava alustan puhtaus. Viikoittainen kunnossapito on tehtävä vähintään kerran viikossa näiden puhdistusohjeiden mukaisesti.
- Irrota kaikki ei-poistettavat telineet, puhdista ne alkoholipohjaisella pikadesinfiointisuihkeella, deionisoidulla vedellä ja 70-prosenttisellä etanolilla ja anna niiden kuivua. Jos likaa on paljon, liota telineitä sen jälkeen desinfiointiaineeliuoksessa, huuhtelee ne alkoholipohjaisella desinfointiaineella ja anna niiden sitten kuivua.
- Avaa etukansi ja pyyhi alusta deionisoitu vedellä ja 70-prosenttisellä etanolilla kostutetulla liinalla. Erityisesti liukuloikkojen puhtaus on tarkistettava.
- Poista Basic Vacuum System (BVS) -putkisto ja puhdista putkisto, tiiviste ja BVS:n sisälokerot liinalla. Vältä tiivisteiden puhdistamista etanolilla, koska se voi haurastuttaa tiivisteiden materiaalia.
- Tyhjennä CORE 96 -pään kärkijäte ja erillinen kanava.
- Irrota kärkien jäteaseman erillisen kanavan kärjenpoistolevy ja puhdista se: suihkuta deionisoitua vettä ja 70-prosenttista etanolia suoraan levyn pinnalle ja pyyhi. Vedä uusi muovipussi kehyksen yli ja kiinnitä se uudelleen. Aseta puhdas kärjenpoistolevy takaisin paikoilleen.
- Suihkuta deionisoitua vettä ja 70-prosenttista etanolia suoraan CORE 96 -pään jätelaatikon ja jätekourun pinnalle ja pyyhi ne puhtaaksi.
 - Jos jäämien poistaminen kärkijätteestä on vaikeaa, käytä DNAasittomalla/RNAasittomalla vedellä kostutettua liinaa, kunnes jäämät ovat hävinneet. Hävitä liina asianmukaisesti. Jatka sterilointia alkoholipohjaisella desinfointiaineella.
- Kostuta nukkaamaton liina tai pumpulipuikko 70-prosenttisellä etanolilla. Pyyhi viivakoodinlukijan laserskannerin ikkuna. Puhdista CPAC-levyadapterin jokainen kuoppa samalla liinalla tai pumpulipuikolla. Jos käytät liinaa, paina se adapterin jokaiseen kuoppaan kynän päällä, jotta kuopan sisäpinta tulee varmasti puhdistettua.
- Erillisten kanavien puhdistaminen:
 - Puhdista erillisten kanavien kärjenpoistoholkki (pipetointikanavien ulompi osa) nukkaamattomalla liinalla, joka on kostutettu deionisoidulla vedellä ja 70-prosenttisellä etanolilla. (Katso *Hamilton Microlab STAR -viiteopas nro 15070074*.)

- Puhdista pysäytyslevy ja pipetointipään O-renkaat (pipetointikanavien ulompi osa) nukkaamattomalla liinalla, joka on kostutettu deionisoidulla vedellä ja 70-prosenttisella etanolilla.
- CORE 96 -pään puhdistaminen:
 - Puhdista 96-pään kotelo ja pysäytyslevyjen alapuoli samalla nukkaamattomalla liinalla, joka on kostutettu deionisoidulla vedellä ja 70-prosenttisella etanolilla.
 - Puhdista sitten O-renkaat pyörittämällä samaa liinaa tai liinasta repäistyä kaistaletta, joka on kostutettu deionisoidulla vedellä ja 70-prosenttisella etanolilla 96-pään pipettikanavien sivujen ympärillä. Toista tämä toimenpide 96-pään kaikkien pipettikanavien osalta.
- Suihkuta etupuoli ja sivusuojus deionisoidulla vedellä ja 70-prosenttisella etanolilla, ja pyyhi kuivaksi.
- Puhdista automaattitäytön suojanauha deionisoidulla vedellä ja 70-prosenttisella etanolilla kostutetulla liinalla ja pyyhi painamatta.
- Kun alusta ja komponentit ovat täysin kuivia, aseta telineet takaisin paikoilleen.

HUOMAUTUS ML STAR -tuotteen vääränlainen puhdistus ja kunnossapito voi aiheuttaa ristikontaminaatiota ja määrittelyn suorituskyvyn huononemista.

Laadunvalvonta

Kontrollimateriaalia, jonka suorituskykyominaisuudet tunnetaan, voidaan arvioida käsittelyerojen ja teknisten toimenpiteiden erojen havaitsemiseksi laboratoriossa.

Kontrollinäytteen tai mallittoman kontrollin ajaminen vähentää sellaisten tuntemattomien äitinäytteiden kokonais määrää, joka voidaan käsitellä kullakin näytteenvalmistelupakkauksella.

Yhdessä 24 tai 48 näytteen erässä ei saa olla enempää kuin kaksi NTC-näytettä tai 96 näytteen erässä neljä NTC-näytettä.

Käyttöohjeet

Vinkkejä ja tekniikoita

Ellei turvallista pysähtymispistettä ole määritetty protokollassa, jatka välittömästi seuraavaan vaiheeseen.

Viivakoodien lisääminen levyihin

- Helmallisten levyjen viivakoodit alkavat kirjaimilla PL.
- Syväkuoppalevyjen viivakoodit alkavat kirjaimilla DW.
- Lisää viivakoodit helmallisten levyjen ja syväkuoppalevyjen sivuun sarakkeeseen 12.
- Lisää levyt viivakoodi oikealle suunnattuna, jotta automaattinen skannaus on mahdollista.

Levyn peittäminen ja avaaminen

- Ole erittäin varovainen estääksesi ristikontaminaation – peittimen alla ei saa näkyä nestettä.
 - Varmista, että peittimen altistunut alapuoli ei kosketa altistuneita kuoppia.
 - Varo koskettamasta altistuneita kuoppia.
- Peitä 96-kuoppalevy aina ennen protokollan seuraavia vaiheita:
 - sentrifugointivaiheet
 - lämpöblokkivaiheet
- Peitä levy applikoimalla kalvosulku levyille ja tiivistämällä se. Varmista, että koko levyyn kohdistuu painetta ja että sulku on tiivis jokaisen kuopan kohdalla.
- Tee seuraavat toimet ennen levyn avaamista:
 - Sentrifugoi 96-kuoppalevyä lyhyesti voimalla 1000 × g 20 sekunnin ajan.
 - Aseta levy tasaiselle pinnalle ja poista sitten peitin hitaasti.

VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Ennen käyttöä tee ja dokumentoi tarvittava kunnossapito valmistajan ohjeiden mukaisesti.
- Tarkkaile ML STAR -laitetta automaattisten toimien aikana. Tarkkaile VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 -ohjelmiston käyttöliittymää kehotteiden ja ohjeiden varalta.
- Pidä etusuojus paikoillaan käytön aikana.
- Pidä alusta puhtaana kaikista esineistä toiminnan aikana.
- Jos virheenkäsittelytapahtuman aikana esiin tulee valintapainike **Exclude** (Älä sisällytä), älä missään olosuhteissa valitse tätä vaihtoehtoa. Jos menetelmää ei voida käsitellä virheenkäsittelytapahtuman ohitse ja käytössäsi on rajallisesti virheenkäsittelyvaihtoehtoja, keskeytä ajo.
- Jos levyjen imuvaiheiden aikana VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 niin kehottaa, auta levyn ja imuputkiston välisen tiivistyksen luomisessa manuaalisesti.
- Anna järjestelmän hävittää kärjet adapterista automaattisesti. Älä poista kärkiä manuaalisesti, ellei ohjelmisto niin neuvo.
- Poista käytetyt reagenssit ja kulutustarvikkeet työnkulun hallinnan kehotuksen mukaisesti.
- Tyhjennä imujätepullot päivittäin. Ensimmäinen pullo ei koskaan saa olla enempää kuin puoliksi täynnä. Imujätteen ylivuotaminen voi vahingoittaa imupumppua ja heikentää järjestelmässä syntyvää imua.
- 24, 48 ja 96 näytteen erän kohdalla lataa koko telineellinen yksittäin laskettuja 8-kanavaisia kärkiä ennen menetelmän aloittamista.

Näytteiden käsitteleminen

Toimenpide

1. Tee seuraavat toimet kaikille alikvooteille:
 - a. Sentrifugoi viivakoodillisia näytteitä voimalla 1600 × g 10 minuutin ajan lämpötilassa 4 °C jarru pois kytkettynä.
 - b. Poista näyteputket, kun sentrifugi pysähtyy kokonaan.
Aloita plasman eristys 15 minuutin sisällä sentrifugoinnin päättymisestä. Jos kuluu yli 15 minuuttia, sentrifugoi uudelleen.
2. Tarkista jokainen putki näytteen sopivuuden varalta tarkistamalla seuraavat vaatimukset:
 - Näytteen määrä on odotetunlainen.
 - Näytteiden punasolujen ja plasmakerrosten välillä näkyy selkeä ero sentrifugoinnin jälkeen.
 - Plasman taso on ainakin 1,5 ml buffy coat -kerroksen yläpuolella.
 - Näyte ei ole voimakkaasti hemolysoitunut (ts. plasma ei näytä syvänpunaiselta).
 - Näyte ei ole lipeeminen (eli plasma ei ole samean valkoista tai maitomaisen läpinäkymätöntä).
 - Näytteessä ei ole hyytymiä.



HUOMIO

Näytteet, joita on säilytetty tai käsitelty väärin, voivat muuttua epäsopiviksi. Jos työnkululla käsitellään epäsopivia näytteitä, ne voivat tukkia sidontalevyn eristämisen aikana, mikä johtaa näytteen ylivuotamiseen viereisiin kuoppiin.

3. Poista putkista korkit ja aseta ne putkitelineisiin. Aseta kaikki erän näytteet ja plasmakontrollit.



HUOMIO

Jo virheenkäsittelytapahtuman aikana esiin tulee Exclude (Älä sisällytä) -vaihtoehto, älä valitse sitä. Jos menetelmää ei voida käsitellä virheenkäsittelytapahtuman ohitse ja käytössäsi on rajallisesti virheenkäsittelyvaihtoehtoja, keskeytä ajo.

Plasman eristäminen

Valmisteleminen

1. Merkitse 1 syväkuoppalevy keskiplasmaksi ja lisää viivakoodi.
2. Merkitse 1 syväkuoppalevy lopulliseksi plasmaksi ja lisää viivakoodi.
3. 24, 48 ja 96 näytteen erän kohdalla lataa koko telineellinen yksittäin laskettuja 8-kanavaisia kärkiä ennen menetelmän aloittamista.

**HUOMIO**

Muista käyttää oikeaa levytyyppiä keskiplasmalle ja lopulliselle plasmalle. Syväkuoppasäiliön käyttäminen syväkuoppalevyn sijaan johtaa näytteiden yhdistymiseen ja voi tuottaa virheellisiä tuloksia.

Toimenpide

1. Avaa AppLauncher (Sovelluksen käynnistin) ja valitse **VeriSeq NIPT Method** (VeriSeq NIPT -menetelmä).
2. Anna yksilöllinen erätunniste ja käyttäjätunnus ja valitse **OK**.
Erätunnisteessa saa olla ≤ 26 merkkiä. Voit käyttää numeroita, kirjaimia, alaviivoja (_) tai väliviivoja (-).
Esimerkiksi: 2025-10-16_Batch3.
Erätunnuksesta kirjainkoolla ei ole merkitystä. Erätunnuksia, joiden kirjainkoolla on merkitystä, ei pidetä yksilöllisinä.
Erän nimien pitää olla yksilöllisiä eikä niiden ainoa ero saa olla isoin kirjaimin kirjoittamisessa. Esimerkiksi erän nimet Batch01 ja batch01 eivät ole yksilöllisiä. Sama sääntö koskee näytetunnuksen nimeämistä.
3. Valitse **New Batch** (Uusi erä).
4. Aloita plasman eristys käynnistyksen jälkeen valitsemalla **OK**.
5. Tee jokin seuraavista:
 - Lisää olemassa oleva näytearkki valitsemalla erään liittyvä näytearkki ja sitten **OK**.
 - Jatka valitsematta näytearkkia valitsemalla **No Sample Sheet** (Ei näytearkkia).

Lisätietoja näytearkin luomisesta on *VeriSeq NIPT Solution v2 -ohjelmisto-oppaassa (asiakirjanro 1000000067940)*.

HUOMAUTUS Näytteen tyyppi, yksönen tai kaksonen, on kirjattava tarkasti kustakin näytteestä, jotta tietojen analyysi on varmasti oikea. Jos valitset **No Sample Sheet** (Ei näytearkkia), muista määrittää oletusarvoiset näytearvot Workflow Manager (Työnkulun hallinta) -ohjelmiston Service Tools (Huoltotyökalut) -kohdassa. Katso lisätietoja *VeriSeq NIPT Solution v2 -ohjelmiston ohjeesta (asiakirjanro 1000000067940)*.

6. Valitse erän koko ja sitten **OK**.
7. Valitse mallinneettomien kontrollien (NTC) määrä ja valitse **OK**.
NTC-paikat ovat aina viimeisimmät valitut paikat. Esimerkiksi kun 24 näytteen ajossa on kaksi NTC:tä, ne ovat paikoissa 23 ja 24.
8. Tarkista, että kaikki viivakoodit on kiinnitetty, ja lisää näytteet, kärjet ja levyt (viivakoodi oikealle päin) telineeseen.

9. Valitse **OK** kunkin lisäysohjetteen jälkeen.

Näytteen eräkkö	Teline Tyyppi	Rata	Tuote	Paikka
24, 48, 96	Kärki	7–12	1000 µl:n kärjet	5
			1000 µl:n kärjet (vain 96-erä)	4, 5
	Putki	15	Valmistellut verinäyteputket 1–24 (kaikki eräkköt)	1–24
	Putki	16	Valmistellut verinäyteputket 25–48 (vain eräkköt 48 ja 96)	25–48
	Putki	17	Valmistellut verinäyteputket 49–72 (vain eräkkö 96)	49–72
	Putki	18	Valmistellut verinäyteputket 73–96 (vain eräkkö 96)	73–96
	Multiflex	19–24	Tyhjä syväkuoppalevy, lopullinen plasma – viivakoodillinen	4
	Multiflex	19–24	Tyhjä syväkuoppalevy, keskiplasma – viivakoodillinen	5
	Reagenssi	47	[Valinnainen] Dulbecon fosfaattipuskuroitu suolaliuos (DPBS) – käytetään mallineettomaan kontrolliin (NTC)	5

10. Varmista, että telineet, laboratoriotarvikkeet ja reagenssit on lisätty oikein.

11. Valitse **OK** Pre-Spin Deck Verification (Pyörittystä edeltävä alustan tarkistus) -näytössä.

12. Tarkkaile, kun ML STAR suorittaa automaattiset toimet.

13. Kun työnkulun hallinta niin kehottaa, tarkista, ettei ML STAR -laitteen latausalustalla ole esteitä, jotta ML STAR voi poistaa telineet.

14. Tyhjennä alusta valitsemalla **Unload** (Tyhjennä).

15. Poista keskiplasman syväkuoppalevy seuraavalla tavalla.

- Tarkista, että levyn kussakin kuopassa on sama määrä (ei pipetointivirheitä). Odotettu määrä on 1000 µl.
- Kirjaa epäyhdenmukaisuudet, kun plasman eristys on valmis.
- Peitä levy, aseta tasapaino ja sentrifugoi voimalla 5600 × g 10 minuutin ajan jarru pois käytöstä tai pienimmällä asetuksella.

16. Jatka lopullisen plasman valmisteluun valitsemalla **Yes** (Kyllä).

17. Poista levypeitin ja aseta levy uudelleen telineeseen.

Näytteen eräkkö	Teline Tyyppi	Rata	Tuote	Paikka
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Keskiplasman syväkuoppalevy	5

18. Valitse **Intermediate Plasma plate has been spun** (Keskiplasmalevy on pyöritetty) -valintaruutu ja sitten **OK**.
19. Tarkkaile, kun ML STAR suorittaa automaattiset toimet.
20. Kun työnkulun hallinta niin kehottaa, tarkista, ettei ML STAR -laitteen latausalustalla ole esteitä, jotta ML STAR voi poistaa telineet.
21. Tyhjennä alusta valitsemalla **Unload** (Tyhjennä).
22. Kun työnkulun hallinta niin kehottaa, poista telineet ja alusta.
23. Poista lopullisen plasman syväkuoppalevy.
24. Tarkista levy seuraavien virheiden varalta:
 - Toisistaan poikkeavat määrät kuopissa. Odotettu määrä on 900 µl.
 - Näkyvät solupelletit.
 - Liiallinen hemolyysi.Jos havaitset epänormaaleja näkyviä solupellettejä tai liiallista hemolyysiä, hylkää kyseinen näyte plasman eristysmenetelmän lopussa tai käytä erän hallintaa. Lisätietoa erän hallinnasta on *VeriSeq NIPT Solution v2 -ohjelmiston ohjeessa (asiakirjanro 1000000067940)*.
25. Kun työnkulun hallinta niin kehottaa, valitse **OK**.
26. Kirjoita huomautuksia kohdekuopista ja valitse sitten **OK**.
27. Tee jokin seuraavista.
 - Jatka cfDNA:n eristämiseen valitsemalla **Yes** (Kyllä).
 - Lopeta valitsemalla **Exit** (Sulje).

TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät, peitä lopullisen plasman levy ja aseta se säilytykseen 2–8 °C:seen enintään 7 vuorokaudeksi.

cfDNA:n eristäminen

Valmisteleminen

1. Tarkista eristämisen- ja lisävarustelaatikoista, että pakkauksen viimeinen käyttöpäivä ei ole mennyt.
2. Valmistele seuraavat reagenssit. Merkitse putkiin ja syväkuoppasäiliöihin reagenssien nimi.

Reagenssi	Säilytys	Ohjeet
Lopullisen plasman syväkuoppalevy	2–8 °C	Jos tarvikkeet olivat säilytyksessä viileässä, anna niiden lämmetä huoneenlämpöiseksi 30 minuutin ajan. Sentrifugoi voimalla 1000 x g 20 sekunnin ajan. Poista lopullisen plasman syväkuoppalevyn peitin ennen käyttöä.

3. Lisää hitaasti 3,75 ml proteinaasipuskuria kuhunkin proteinaasi K:n reagenssipulloon.
 - Valmistele 3 pulloa 24 ja 48 näytteelle.
 - Valmistele 4 pulloa 96 näytteelle.
4. Aseta korkki proteinaasi K:n pulloihin ja vorteksoi, kunnes se on suspendoitunut uudelleen.

**HUOMIO**

Älä kontaminoi kumitulppaa. Mikäli kumitulppaan pääsee muita aineita, se voi kontaminoida tulevat näytteet.

5. Kaada valmisteltu proteinaasi K kaikista pulloista reagenssisäiliöön ja merkitse se proteinaasi K:ksi.
6. Lisää 100 ml 100-prosenttista EtOH:a kuhunkin pesupuskurin II reagenssipulloon.
 - Valmistele 1 pullo 24 ja 48 näytettä varten.
 - Valmistele 2 pulloa 96 näytettä varten.
7. Sekoita pesupuskuri II -pullot kääntelemällä niitä.
8. Merkitse pesupuskuri II -pullojen valintaruudut.
9. Merkitse 1 uusi helmallinen levy keskitasoksi ja lisää levyn viivakoodi.
10. Merkitse 1 uusi helmallinen levy cfDNA:n eluutioksi ja lisää levyn viivakoodi.
11. Merkitse 1 uusi syväkuoppalevy uuton keskitasoksi ja lisää syväkuoppalevyn viivakoodi.
12. Lisää levyn viivakoodi DNA:n sidontalevyyn.
13. Käytä kalvosulkua käyttämättömiin kuoppiin 24 ja 48 näyte-erän kohdalla.
14. Valmistele 70-prosenttinen EtOH-puhdistusliuos (70 % EtOH, 30 % DNAasitonta/RNAasitonta vettä) imujärjestelmän puhdistamista varten.
15. Valmistele imujärjestelmä seuraavalla tavalla.
 - a. Poista imuputkisto ja puhdista 70-prosenttisellä EtOH:lla.
Vältä tiivisteen puhdistamista EtOH:lla, koska se voi haurastuttaa tiivisteen materiaalia.
 - b. Tyhjennä imujäte.
 - c. Tarkista, että ML STAR -imujärjestelmään on kytketty virta.

Toimenpide

1. Aloita cfDNA:n eristäminen valitsemalla **OK**.
2. Jos **VeriSeq NIPT Method** ei ole auki:
 - a. Avaa AppLauncher (Sovelluksen käynnistin) ja valitse **VeriSeq NIPT Method** (VeriSeq NIPT -menetelmä).
 - b. Anna erätunniste ja käyttäjätunnus ja valitse **OK**.
3. Lisää kärkiä kärkitelineisiin seuraavasti ja valitse sitten **OK**.



HUOMIO

Ennen menetelmän aloittamista 24, 48, ja 96 näyte-erän kohdalla lisää koko telineellinen 8-kanavaisia kärkiä.

Näytteen eräkoko	Teline Tyyppi	Rata	Tuote	Paikka
24	Kärki	1–6	1000 µl:n kärjet	1
		7–12	300 µl:n kärjet	1
48	Kärki	1–6	1000 µl:n kärjet	1, 2
		7–12	300 µl:n kärjet	1
96	Kärki	1–6	1000 µl:n kärjet	1, 2, 3, 4
		7–12	300 µl:n kärjet	1

4. Lisää lasketut kärjet kärkitelineisiin seuraavasti.

Näytteen eräkoko	Teline Tyyppi	Rata	Tuote	Paikka
24, 48, 96	Kärki	49–54	1000 µl:n kärjet	1
			300 µl:n kärjet	2
			50 µl:n kärjet	3

- Anna ensimmäisen ja viimeisen kärjen paikka kussakin kärkitelineessä ja valitse **OK**.
- Skannaa erottelulaatikon viivakoodit.
- Anna käyttäjätunnus tai reagenssien valmistelijan nimikirjaimet ja valitse **OK**.
- Skannaa lisävarustelaatikon viivakoodit.
- Anna käyttäjätunnus tai reagenssien valmistelijan nimikirjaimet ja valitse **OK**.
- Tarkista, että viivakoodit on kiinnitetty.
- Poista lopullisen plasman syväkuoppalevyn peitin tarvittaessa.
- Lisää levyt (viivakoodi oikealle suunnattuna) levytelineeseen seuraavasti ja valitse sitten **OK**.

Näytteen eräkoko	Teline Tyyppi	Rata	Tuote	Paikka
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Uusi helmallinen levy, keskitaso, viivakoodillinen	1
			Uusi helmallinen levy, cfDNA:n eluutio, viivakoodillinen	2
			Uusi syväkuoppalevy, erottelukeskitaso, viivakoodillinen	4
			Lopullisen plasman syväkuoppalevy, viivakoodillinen	5

13. Tarkista, että DNA:n sidontalevyssä on viivakoodi ja valitse sitten **OK**.
14. Osittaisissa levyerissä aseta leikattu levypeitin käyttämättömien kuoppien päälle (sarakeet 4–12 käytettäessä 24 näytteen erää ja sarakkeet 7–12 käytettäessä 48 näytteen erää).
15. Aseta DNA:n sidontalevy imuputkiston päälle viivakoodi oikealle suunnattuna.
16. Ennen kuin asetat sidontalevyn BVS-putkiston päälle, tarkista kuopat visuaalisesti mahdollisten tukosten varalta.
Tukokset voivat estää reagenssien virtauksen imun aikana.
17. Jos käytössä on 24 tai 48 näytteen erät, peitä käyttämättömät kuopat ja sulje kalvosululla. Valitse **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (Onko DNA:n sidontalevyn sarakkeet peitetty?) -valintaruutu ja valitse sitten **OK**.
18. Aseta reagenssiputket reagenssitelineeseen seuraavasti ja valitse **OK**.

Näytteen eräkoko	Teline Tyyppi	Rata	Tuote	Paikka
24, 48	Reagenssi	47	16 ml eluutiopuskuria	1
			11 ml proteinaasi K:ta	2
96	Reagenssi	47	16 ml eluutiopuskuria	1
			15 ml proteinaasi K:ta	2

19. Siirrä määritetyt reagenssit syväkuoppasäiliöihin ja aseta säiliöt syväkuoppatelineisiin seuraavasti.
20. Valitse **OK**.

Näytteen eräkoko	Teline Tyyppi	Rata	Tuote	Paikka
24, 48	Syväkuoppa	39– 44	125 ml pesupuskuria II	1
			125 ml pesupuskuria I	2
			60 ml 100 % EtOH	3
			100 ml lyysauspuskuri	4
			60 ml DNAasia/RNAasia sisältämätöntä vettä	5
96	Syväkuoppa	39– 44	200 ml pesupuskuria II	1
			125 ml pesupuskuria I	2
			100 ml 100 % EtOH	3
			100 ml lyysauspuskuri	4
			100 ml DNAasia/RNAasia sisältämätöntä vettä	5

21. Odota, että automaattinen reagenssimäärän tarkistus päättyy.
22. Tarkista, että imujäte on tyhjä (puoliksi täynnä suositellaan), ja valitse **OK**.

23. Tarkista kaikkien telineiden, laboratoriotarvikkeiden ja reagenssien sijoitus ja valitse sitten **OK** Extraction Deck Verification (Erottelualustan tarkistus) -näytössä.

24. Tarkkaile ML STAR -laitetta automaattisten toimien aikana.



Sinun on manuaalisesti kumottava näytteen ylivuodot, joita järjestelmä ei havaitse, ennen läheisten kuoppien kontaminaatiota.

25. Lopullisen imuvaiheen jälkeen poista DNA:n sidontalevy ja puhdista alapinta 70 %:n EtOH:lla.

26. Peitä kaikki peittämättömät kuopat DNA:n sidontalevyssä ja aseta sitten DNA:n sidontalevy tyhjän lopullisen plasman syväkuoppalevyn päälle.

27. Sentrifugoi DNA:n sidontalevyn ja lopullisen plasman levyn kokoonpanoa nopeudella 5600 × g 10 minuutin ajan jarru käytössä.

28. Valitse **OK**.

29. DNA:n sidontalevyn sentrifugoinnin aikana tee imupuhdistus:

a. Poista imuputkisto ja valitse **OK**.

b. Odota, että automaattinen jätteenhävitys päättyy.

c. Puhdista imuputkisto ja imujärjestelmän sisäpuoli 70 %:n EtOH:lla ja aseta sitten imuputkisto takaisin paikoilleen.

d. Käynnistä eluutiolevyn siirto imuputkistossa valitsemalla **Manifold is on Vacuum** (Putkistossa on imu) -valintaruutu ja valitse sitten **OK**.

30. Sentrifugoinnin jälkeen peitä kuopat, joissa on näytteitä DNA:n sidontalevyssä.

31. Aseta DNA:n sidontalevy imuputkiston päällä olevan cfDNA:n eluutiolevyn päälle.

32. Aseta DNA:n sidontalevy viivakoodi suunnattuna oikealle ja valitse sitten **OK**.

33. Tarkkaile ML STAR -laitetta automaattisten toimien aikana.

34. Valitse inkuboinnin jälkeen **Plates are assembled as indicated** (Levyt on koottu ohjeiden mukaan) -valintaruutu. Vahvista, että DNA:n sidonta- / cfDNA:n eluutiolevy on tukialustalla (jos sentrifugi niin edellyttää).

35. Peitä DNA:n sidontalevyn peittämättömät kuopat.

36. Sentrifugoi voimalla 5600 × g 2 minuutin ajan jarru käytössä ja valitse sitten **OK**.

37. Tarkista visuaalisesti, että cfDNA:n eluutiolevyssä on sama määrä kussakin kuopassa. Odotettu määrä on noin 55 µl.

38. Peitä ja säilytä cfDNA-eluutiolevy kirjaston valmistelua varten.

39. Kun työnkulun hallinta niin kehottaa, tarkista, ettei ML STAR -laitteen latausalustalla ole esteitä, jotta ML STAR voi poistaa telineet.

40. Tyhjennä alusta valitsemalla **Unload** (Tyhjennä).

41. Poista kaikki telineet ja puhdista ML STAR -laitteen alusta. Valitse sitten **OK**.

42. Kirjoita huomautuksia kohdekuopista ja valitse sitten **OK**.

43. Tee jokin seuraavista:

- Jatka kirjastojen valmistelemista valitsemalla **Yes** (Kyllä).
- Lopeta valitsemalla **Exit** (Sulje).

TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät, peitä cfDNA-eluutiolevy ja aseta se säilytykseen $-25...-15$ °C:seen enintään 7 vuorokaudeksi.

Kirjastojen valmistelu

Valmisteleminen

1. Tarkista kirjastonvalmistelu- ja lisävarustelaatikoista, että pakkauksen viimeinen käyttöpäivä ei ole ohittunut.
2. Valmistele seuraavat reagenssit. Merkitse säiliöputkiin ja syväkuoppasäiliöihin reagenssien nimi.

Reagenssi	Säilytys	Ohjeet
A-Tailing Mix (A-hännänmuodostusseos)	-25...-15 °C	Sulata huoneenlämmössä. Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
cfDNA:n eluutiolevy	-25...-15 °C	Jos levy on ollut aiemmin säilytyksessä, tarkista, ettei sitä ole säilytetty yli 7 vuorokautta, ja anna sen sulaa huoneenlämmössä. Vorteksoi nopeudella 1500 r/min 1 minuutin ajan. Sentrifugoi voimalla 1000 × g 20 sekunnin ajan.
End Repair Mix (Lopun korjausseos)	-25...-15 °C	Sulata huoneenlämmössä. Sekoita vorteksoimalla.
Hybridization Buffer (Hybridisaatiopuskuri)	-25...-15 °C	Sulata huoneenlämmössä. Sekoita vorteksoimalla. Palauta säilytykseen käytön jälkeen.
Ligation Mix (Ligaatioseos)	-25...-15 °C	Sulata huoneenlämmössä. Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
NIPT DNA Adapter Plate (NIPT DNA -sovitinlevy)	-25...-15 °C	Sulata huoneenlämmössä. Sekoita vorteksoimalla. Sentrifugoi voimalla 1000 × g 20 sekunnin ajan.
Resuspension Buffer (Uudelleensuspensiopuskuri)	2-8 °C	Sekoita vorteksoimalla. Palauta säilytykseen käytön jälkeen.
Sample Purification Beads (Näytteen puhdistusrakeet)	2-8 °C	Anna lämmetä huoneenlämpöiseksi 30 minuutin ajan. Vorteksoi voimakkaasti ennen jokaista käyttökertaa. Sekoita vorteksoimalla tai kääntelemällä ylösalaisin, kunnes kaikki rakeet ovat suspensiossa ja seos on homogeenistä.

**HUOMIO**

Kun poistat NIPT DNA -sovitinlevyn peittimen, ole erittäin varovainen estääksesi kuoppa-kuoppa-aerosolien ristikontaminaation, joka voi aiheuttaa virheellisiä tuloksia.

3. Jos cfDNA:n eluutiolevy säilytettiin pakastettuna, valmistele se seuraavalla tavalla.
 - a. Sulata huoneenlämmössä.
 - b. Vorteksoi nopeudella 1500 r/min 1 minuutin ajan.
 - c. Sentrifugoi voimalla 1000 × g 20 sekunnin ajan.
4. Merkitse yksi uusi helmallinen levy kirjastoksi ja lisää levyn viivakoodi.
5. Valmista 80-prosenttinen EtOH absoluuttisesta EtOH:sta. Yhdistä 40 ml 100 % EtOH:ta ja 10 ml DNAasi/RNAasi-vapaata vettä. Sekoita kääntelemällä.
6. Tarkista, että ML STAR -tuotteen lämpöohjaus on käytössä.

Entsyymien laimentaminen

1. Yhdistä A-hännänmuodostusseos ja uudelleensuspensiopuskuri kierrekorkkiputkesta. Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.

Näytteen eräkoko	A-hännänmuodostusseos (µl)	Uudelleensuspensiopuskuri (µl)
24, 48	900	1200
96	1800	2400

2. Yhdistä ligaatioseos ja uudelleensuspensiopuskuri kierrekorkkiputkesta. Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.

Näytteen eräkoko	Ligaatioseos (µl)	Uudelleensuspensiopuskuri (µl)
24, 48	230	1713
96	440	3278

Toimenpide

1. Aloita kirjaston valmistelu valitsemalla **OK**. Jos **VeriSeq NIPT Method** -menetelmä ei ole vielä auki:
 - a. Avaa AppLauncher ja valitse **VeriSeq NIPT Method** (VeriSeq NIPT -menetelmä).
 - b. Anna erätunniste ja käyttäjätunnus ja valitse **OK**.
2. Tarkista, että seuraavat kulutustarvikkeet on valmisteltu Reagent Preparation (Reagenssin valmistelu) -näytön ohjeiden mukaisesti:
 - A-hännänmuodostusseos, ligaatioseos ja 80 %:n EtOH
 - Näytteenpuhdistusrakeet, loppukorjausseos ja NIPT DNA -sovitinlevy
3. Valitse valintaruudut ja sitten **OK**.

4. Skannaaja kirjastonvalmistelulaatikon viivakoodit.
5. Anna käyttäjätunnus tai reagenssien valmistelijan nimikirjaimet ja valitse **OK**.
6. Skannaaja lisävarustelaatikon viivakoodit.
7. Anna käyttäjätunnus tai reagenssien valmistelijan nimikirjaimet ja valitse **OK**.
8. Lisää kärkiä kärkitelineisiin seuraavasti ja valitse sitten **OK** kunkin telineen osalta.

Näytteen eräkoko	Telineen tyyppi	Rata	Tuote	Paikka
24	Kärki	1–6	50 µl:n kärjet	1
		7–12	300 µl:n kärjet	1, 2
48	Kärki	1–6	50 µl:n kärjet	1, 2
		7–12	300 µl:n kärjet	1, 2, 3, 4
96	Kärki	1–6	50 µl:n kärjet	1, 2, 3, 4
		7–12	300 µl:n kärjet	1, 2, 3, 4, 5

9. Jos pysäytit protokollan cfDNA:n eristämisen jälkeen, lisää lasketut kärjet kärkitelineisiin seuraavasti.

Näytteen eräkoko	Telineen tyyppi	Rata	Tuote	Paikka
24, 48, 96	Kärki	49–54	1000 µl:n kärjet	1
			300 µl:n kärjet	2
			50 µl:n kärjet	3

10. Anna ensimmäisen kärjen paikka kussakin kärkitelineessä ja valitse **OK**.
11. Tarkista, että viivakoodit on kiinnitetty, ja lisää levyt (viivakoodi oikealle päin) levytelineeseen seuraavasti. Valitse sitten **OK**.

Näytteen eräkoko	Telineen tyyppi	Rata	Tuote	Paikka
24, 48, 96	Multiflex	19–24	cfDNA:n eluutiolevy, viivakoodillinen	1
			NIPT DNA -sovitinlevy, viivakoodillinen	2
			Uusi helmallinen 96-kuoppalevy, kirjastot, viivakoodilliset	3
			Uudet helmalliset 96-kuoppalevyt	4, 5

12. Lisää syväkuoppalevyteline seuraavasti ja valitse sitten **OK**.

Näytteen eräkoko	Telineen tyyppi	Rata	Tuote	Paikka
24, 48, 96	Syväkuoppa	39–44	50 ml 80 %:n EtOH:a syväkuoppasäiliössä	1
			Uudet helmalliset 96-kuoppalevyt	2, 3, 4, 5

13. Aseta reagenssiputket reagenssitelineeseen seuraavasti ja valitse **OK**.

Näytteen eräkoko	Telineen tyyppi	Rata	Tuote	Paikka
24, 48, 96	Reagenssi	47	2,5 ml lopun korjauseosta	1
			Valmisteltu A-hännänmuodostusseos (kokonaismäärä)	2
			Valmisteltu ligoatioseos (kokonaismäärä)	3
			10 ml:n näytteen puhdistusrakeet	4
			12 ml:n hybridisaatiopuskuri	5

14. Säästä loput säiliön 12 ml:n hybridisaatiopuskurista (HT1) poolausta varten.

15. Tarkista, että telineet, laboratoriotarvikkeet ja reagenssit on lisätty ohjeiden mukaan ja valitse **OK Library Deck Verification** (Kirjastoalustan tarkistus) -näytössä.

16. Odota, että automaattinen reagenssimäärän tarkistus päättyy.

17. Tarkkaile ML STAR -laitetta automaattisten toimien aikana.

18. Kun työnkulun hallinta niin kehottaa, tarkista, ettei ML STAR -laitteen latausalustalla ole esteitä, jotta ML STAR voi poistaa telineet.

19. Tyhjennä alusta valitsemalla **Unload** (Tyhjennä).

20. Tarkista, että kirjastolevyssä on sama määrä kussakin kuopassa.



HUOMIO

Jos kuoppien määrät eivät ole samat, näytteet voivat tuottaa virheellisiä tuloksia.

21. Jos kirjastolevy on tarkoitus säilyttää, peitä ja säästä se.

22. Poista telineet ja puhdistu alusta. Valitse sitten **OK**.

23. Kirjoita huomautuksia kohdekuopista ja valitse sitten **OK**.

24. Tee jokin seuraavista:

- Jatka kirjastojen kvantifioimista valitsemalla **Yes** (Kyllä).
- Lopeta valitsemalla **Exit** (Sulje).

TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät, peitä kirjastolevy ennen sen asettamista säilytykseen. Kirjastolevy on stabiili enintään 7 vuorokautta valmistelupäivästä, kun sitä säilytetään lämpötilassa –25...–15 °C.

Kirjastojen kvantifioiminen**Valmisteleminen**

1. Valmistele seuraavat reagenssit.

Reagenssi	Säilytys	Ohjeet
DNA Quantification Reagent (DNA:n kvantifiointireagenssi)	2–8 °C	Suojattava valolta. Sulata huoneenlämpötilassa 30–150 minuuttia. (Reagenssin poistamista kirjastojen valmistelun alussa suositellaan.) Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
DNA Quantification Standard (DNA:n kvantifiointistandardi)	2–8 °C	Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
Resuspension Buffer (Uudelleensuspensiopuskuri)	2–8 °C	Sekoita vorteksoimalla.

2. Jos kirjastolevy säilytettiin pakastettuna, valmistele se seuraavalla tavalla.
 - a. Tarkista, ettei levyä ole säilytetty yli 7 vuorokautta, ja anna sen sulaa huoneenlämmössä.
 - b. Sekoita vorteksoimalla.
 - c. Sentrifugoi arvolla 1 000 × g 1 minuutin ajan.
3. Kytke fluoromittariin virta 10 minuuttia ennen käyttöä.
4. Lisää levyn viivakoodi uuteen 384-kuoppalevyyn.
5. Lisää levyn viivakoodi uuteen helmalliseen levyyn.

Toimenpide

1. Aloita kvantifiointi valitsemalla **OK**.
2. Jos VeriSeq NIPT Method ei ole vielä auki:
 - a. Avaa AppLauncher ja valitse **VeriSeq NIPT Method** (VeriSeq NIPT -menetelmä).
 - b. Anna erätunniste ja käyttäjätunnus ja valitse **OK**.
3. Skannaa lisävarustelaatikon viivakoodit.
4. Anna käyttäjätunnus tai reagenssien valmistelijan nimikirjaimet ja valitse **OK**.

5. Lisää kärkiä kärkitelineisiin seuraavasti ja valitse sitten **OK**.

Näytteen eräkoko	Telineen tyyppi	Rata	Tuote	Paikka
24, 48	Kärki	1-6	300 µl:n kärkien teline	1
			50 µl:n kärkien teline	2
96	Kärki	1-6	300 µl:n kärkien teline	1
			50 µl:n kärkien teline	2, 3

6. Tarkista, että viivakoodit on kiinnitetty.
 7. Poista tarvittaessa kirjastolevyn peitin.
 8. Lisää levyt (viivakoodi oikealle suunnattuna) Multiflex-telineeseen seuraavasti ja valitse sitten **OK**.

Näytteen eräkoko	Telineen tyyppi	Rata	Tuote	Paikka
24, 48, 96	Multiflex	19-24	Uudet reunalliset levyt, viivakoodilliset	1
			Uusi 384-kuoppalevy, viivakoodillinen	2
			Kirjastolevy, viivakoodillinen	3
			Uudet helmalliset 96-kuoppalevyt	4, 5

9. Lisää korkittomia reagenssiputkia putkitelineeseen seuraavasti ja valitse sitten **OK**.

Näytteen eräkoko	Telineen tyyppi	Rata	Tuote	Paikka
24, 48, 96	Putki	46	DNA Quantification Standard (DNA:n kvantifiointistandardi)	1
			DNA Quantification Reagent (DNA:n kvantifiointireagenssi)	2

10. Aseta reagenssiputket reagenssitelineeseen seuraavasti ja valitse **OK**.

Näytteen eräkoko	Telineen tyyppi	Rata	Tuote	Paikka
24, 48, 96	Reagenssi	47	Uusi reagenssiputki (tyhjä)	1
			16 ml uudelleensuspensiopuskuria	2

11. Jos pysäytit protokollan kirjaston valmistelun jälkeen, lisää lasketut kärjet kärkitelineisiin seuraavasti.

Näytteen eräkoko	Telineen tyyppi	Rata	Tuote	Paikka
24, 48, 96	Kärki	49–54	1000 µl:n kärjet	1
			300 µl:n kärjet	2
			50 µl:n kärjet	3

12. Anna ensimmäisen ja viimeisen kärjen paikka kussakin kärkitelineessä ja valitse **OK**.
13. Tarkista, että telineet, laboratoriotarvikkeet ja reagenssit on lisätty ohjeiden mukaan ja valitse **OK Pooling Deck Verification** (Poolauspakan tarkistus) -näytössä.
14. Odota, että automaattinen reagenssimäärän tarkistus päättyy.
15. Tarkkaile ML STAR -laitetta automaattisten toimien aikana.
16. Kun työnkulun hallinta niin kehottaa, tarkista, ettei ML STAR -laitteen latausalustalla ole esteitä, jotta ML STAR voi poistaa telineet.
17. Tyhjennä alusta valitsemalla **Unload** (Tyhjennä).
18. Poista kirjastolevy.
- Tarkista, että levyssä on sama määrä kussakin kuopassa.
 - Peitä kirjastolevy ja säilytä sitä huoneenlämmössä, kunnes fluorometrianalyysi on valmis.
19. Poista loput 96-kuoppalevyt ja tarkista, että määrä on sama kussakin kuopassa. Suuren virheet määrässä voivat olla merkki ongelmasta pipetointivaiheessa.
20. Poista 384-kuoppalevy ja tarkista, että tarvittavissa kuopissa on nestettä.
21. Peitä levy foliopeittimellä.
22. Sentrifugoi voimalla 1000 × g 20 sekunnin ajan.
23. Inkuboi huoneenlämmössä 10 minuuttia suojattuna valolta.
24. Poista kaikki telineet.
25. Puhdista ML STAR -laitteen alusta. Valitse sitten **OK**.



HUOMIO

Älä hävitä kvantifiointireagensseja, ennen kuin olet saanut tietoja. Tarvitset reagensseja, jos kvantifiointi täytyy tehdä uudelleen.

26. Poista foliopeitin inkuboinnin jälkeen ja aseta 384-kuoppalevy mikrolevylukijaan. Varmista, että käytät Molecular Devicesin toimittamaa violettiä sovitinlevyä (osanro 0310-4336) tai vastaavaa, joka soveltuu käytettävään instrumenttiin.
- Tarkista, että A1 on vasemmassa yläkulmassa, kun asetat levyä.
27. Avaa VeriSeq NIPT -malli SoftMax Pro -ohjelmistossa kaksoisnapsauttamalla.
28. Valitse Home (Aloitus) -välilehdestä **New Experiment** (Uusi testi).
29. Valitse **Read** (Lue).

30. Vie tiedot XML-muotoon seuraavasti.

- a. Napsauta **Plate** (Levy) -kohtaa hiiren kakkospainikkeella ja valitse sitten **Rename** (Nimeä uudelleen).
- b. Skannaa kvantifiointilevyn viivakoodi ja valitse sitten **OK**.
- c. Valitse näytön vasemmasta yläkulmasta levykuvake ja sitten valikosta **Export** (Vie).
- d. Valitse **Expt name** (Vie nimi) -valintaruutu, aseta levyn päivämäärävalinta raa'aksi, aseta tuottomuoto XML:ksi ja valitse sitten **OK**.
- e. Määritä tuotettavan tiedoston polku ja nimi ja valitse **Save** (Tallenna).

Hamilton-tietokoneella täytyy olla pääsy tiedostosijaintiin. Älä käytä tiedoston nimessä tai tiedostopolussa välilyöntejä.

Analyysi

1. Anna fluorometrin tunniste ML STAR:in Scanner Information (Skannerin tiedot) -näyttöön.
2. Kirjoita huomautuksia fluoromittarin ajosta ja valitse sitten **OK**.
3. Siirry *.xml-kvantifiointitiedostoon, joka sisältää fluorometritiedot, ja valitse **OK**.
4. Tarkastele standardikäyrää ja näytteen pitoisuusanalyysin tuloksia ja valitse sitten **OK**.
5. Jos levy on skannattava uudelleen, valitse **Rescan** (Skannaa uudelleen).
Näytteet ovat aika- ja valoherkkiä. Uusintaskannaus on tarvittaessa tehtävä välittömästi.
6. Kirjoita huomautuksia kohdekuopista ja valitse sitten **OK**.
7. Arvioi tulokset ja jatka seuraavasti.
 - Jos tulokset läpäisevät määrittelyn, jatka kohtaan [Poolikirjastot sivulla 38](#). Katso määrittelyt kvantitoinnin laadunvalvontametriikoiden ja -rajojen taulukosta *VeriSeq NIPT Solution v2 -ohjelmistoppaasta (asiakirjanro 1000000067940)*.
 - Jos tulokset eivät läpäise määrittelyä, järjestelmä keskeyttää menetelmän. Toista kvantifiointitoimenpiteet alkaen kohdasta [Valmisteleminen sivulla 34](#).
8. Tee jokin seuraavista:
 - Siirry kohtaan [Poolikirjastot sivulla 38](#) valitsemalla **Yes** (Kyllä).
 - Lopeta valitsemalla **Exit** (Sulje).

TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät, peitä kirjastolevy ennen sen asettamista säilytykseen. Kirjastolevy on stabiili säilytettynä enintään 7 vuorokautta lämpötilassa -25...-15 °C.

Poolikirjastot

Valmisteleminen

1. Valmistele seuraavat reagenssit:

Reagenssi	Säilytys	Ohjeet
Hybridization Buffer (Hybridisaatiopuskuri)	-25...-15 °C	Sulata huoneenlämmössä. Sekoita vorteksoimalla. Palauta säilytykseen käytön jälkeen.

2. Jos kirjastolevy säilytettiin pakastettuna, valmistele se seuraavalla tavalla.
 - a. Tarkista, ettei levyä ole säilytetty yli 7 vuorokautta, ja anna sen sulaa huoneenlämmössä.
 - b. Vorteksoi nopeudella 1500 r/min 1 minuutin ajan.
 - c. Sentrifugoi voimalla 1000 × g 20 sekunnin ajan.
 - d. Sekoita pipetoimalla.
3. Merkitse tyhjä poolausputki pooliksi A. 96 näytteestä merkitse toinen tyhjä poolausputki pooliksi B.
4. Tallenna seuraava denaturointiohjelma lämpöblokkiin, jossa on lämmitetty kansi.
 - a. Valitse esilämmitetyn kannen vaihtoehto ja aseta lämpötilaksi 102 °C.
 - b. Aseta reaktiutilavuudeksi 50 µl.
 - c. Aseta nostonopeus maksimiin (≥ 2 °C sekunnissa).
 - d. Inkuboi lämpötilassa 96 °C 10 minuutin ajan ja sitten lämpötilassa 4 °C 5 sekunnin ajan.
 - e. Pidä lämpötilassa 4 °C.

Toimenpide

1. Aseta kirjastolevy esiohjelmoidun lämpöblokin päälle ja aja denaturointiohjelma.
Älä denaturoi kirjastolevyä, ennen kuin kvantifiointi on läpäissyt laadunvalvontametriikat, koska saatat haluta tehdä kvantifioinnin uudelleen.
2. Sentrifugoi kirjastolevyä voimalla 1000 × g 20 sekunnin ajan.
3. Käynnistä poolikirjastot valitsemalla **OK**.
4. Jos VeriSeq NIPT Method ei ole auki:
 - a. Avaa AppLauncher ja valitse **VeriSeq NIPT Method** (VeriSeq NIPT -menetelmä).
 - b. Anna erätunniste ja käyttäjätunnus ja valitse **OK**.
5. Valitse poolin pitoisuus ja sitten **OK**.
Klusterin kohditiheys on 220–260 k/mm².

HUOMAUTUS Poolauksen pitoisuuksia ja/tai tilavuuksia voidaan joutua lisäämään 24 näytteen erän kohdalla, jotta voidaan ylläpitää samoja klusterin tiheyksiä, jotka saatiin 48/96 näytteen erissä.

6. Mikäli työnkulun hallinta niin kehottaa, tee jokin seuraavista:

- Lisää näytearkki valitsemalla erään liittyvä näytearkki ja sitten **Load** (Lisää).
- Käytä muille näytetyypeille, sukupuolen raportointiin tai seulonnan tyyppiin järjestelmän oletusarvoja valitsemalla kullekin asetukselle **Use Default** (Käytä oletusta).

Lisätietoja näytearkin luomisesta on *VeriSeq NIPT Solution v2 -ohjelmisto-oppaassa (asiakirjanro 1000000067940)*.

7. Aloita denaturointilevyn ajoitus valitsemalla **Start** (Aloita).

8. Lisää kärjet kärkitelineisiin seuraavasti.

Näytteen eräkoko	Telineen tyyppi	Rata	Tuote	Paikka
24, 48, 96	Kärki	7–12	50 µl:n suodatinkärjet	1

9. Lisää denaturoitu kirjastolevy (viivakoodi oikealle suunnattuna) Multiflex-telineeseen seuraavasti ja valitse sitten **OK**.

Näytteen eräkoko	Telineen tyyppi	Rata	Tuote	Paikka
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Denaturoitu kirjastolevy (viivakoodillinen)	1

10. Lisää poolausputkia putkitelineeseen seuraavasti ja valitse sitten **OK**.

Näytteen eräkoko	Telineen tyyppi	Rata	Tuote	Paikka
24, 48	Putki	46	Uusi 2 ml:n putki, pooli A	1
96	Putki	46	Uusi 2 ml:n putki, pooli A	1
			Uusi 2 ml:n putki, pooli B	2

11. Aseta reagenssiputket reagenssitelineeseen seuraavasti ja valitse **OK**.

Näytteen eräkoko	Telineen tyyppi	Rata	Tuote	Paikka
24, 48, 96	Reagenssi	47	3 ml:n hybridisaatiopuskuri	1

12. Lisää kärjet kärkitelineisiin seuraavasti.

Näytteen eräkoko	Telineen tyyppi	Rata	Tuote	Paikka
24, 48, 96	Kärki	49–54	1000 µl:n suodatinkärjet	1
			300 µl:n suodatinkärjet	2
			50 µl:n suodatinkärjet	3

13. Anna ensimmäisen ja viimeisen kärjen paikka kussakin kärkitelineessä ja valitse **OK**.

14. Varmista, että telineet, laboratoriotarvikkeet ja reagenssit on lisätty osoitetulla tavalla.
15. Valitse **OK Pooling Deck Verification** (Poolausalustan tarkistus) -näytössä.
16. Tarkkaile ML STAR -laitetta automaattisten toimien aikana.
17. Kirjoita huomautuksia kohdekuopista ja valitse sitten **OK**.
18. Kun työnkulun hallinta niin kehottaa, tarkista, ettei ML STAR -laitteen latausalustalla ole esteitä, jotta ML STAR voi poistaa telineet.
19. Tyhjennä alusta valitsemalla **Unload** (Tyhjennä).
20. Poista putkiteline.
21. Aseta korkki kuhunkin poolausputkeen, vorteksoi ja sentrifugoi lyhyesti.
22. Valitse **OK**.
23. Sekvensoi kirjastot mahdollisimman pian poolauksen jälkeen. Peitä kirjastolevy ja säilytä sitä lämpötilassa $-25...-15\text{ °C}$ enintään 7 vuorokautta, jotta uudelleenpoolaus on mahdollista.

TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät, aseta poolausputkiin korkit ja aseta ne säilytykseen $-25...-15\text{ °C}$:seen enintään 7 vuorokaudeksi.

Poolattujen kirjastojen valmistelu sekvensointia varten

Valmisteleminen

1. Valmistele seuraavat reagenssit:

Reagenssi	Säilytys	Ohjeet
Poolausputket	$-25...-15\text{ °C}$	Jos ollut aiemmin säilytyksessä, sulatettava huoneenlämmössä. Vorteksoi lyhyesti. Sentrifugoi lyhyesti.

2. Valmistele seuraavan sukupolven sekvensointijärjestelmä täyttämällä seuraavat kentät Local Run Manager VeriSeq NIPT Module -moduulissa:
 - a. Run Name (Ajon nimi)
 - b. **[Valinnainen]** Ajon kuvaus
 - c. Pool Barcode (Poolin viivakoodi)



HUOMIO

LRM-moduuliin määritetyn poolin viivakoodin on oltava sama kuin Workflow Manageriin määritetty viivakoodi. Analyysiohjelmisto hylkää virheelliset ajomääritykset ja edellyttää uutta sekvensointia.

Lisätietoa Local Run Manager VeriSeq NIPT Module -moduulin käytöstä on *VeriSeq NIPT Solution v2 -ohjelmiston ohjeessa (asiakirjanro 1000000067940)*.

Toimenpide

1. Yhdistä seuraavat tilavuudet reagenssikasettiin ja sekoita pipetoimalla.
 - Hybridisaatiopuskuri (900 µl)
 - 450 µl poolia A (450 µl)
2. Jatka sekvensointia käyttämällä uuden sukupolven sekvensointijärjestelmää järjestelmäoppaan mukaisesti. uuden sukupolven sekvensointilaitteen viiteopas. NextSeq 550Dx -laitteen osalta katso ohjeita *NextSeq 550Dx -laitteen viiteoppaasta (asiakirjanro 1000000009513)* tai *NextSeq 550Dx -laitteen pakkausselosteesta (asiakirjanro 1000000043133)*.
3. Varmista kehotettaessa ajon oikea määrittäminen.
4. Toista tämä toimenpide tarvittaessa poolille B.
 - Kohdeklusterin tiheysalueen saavuttamiseksi kirjastolevy voidaan poolata uudelleen käyttämällä eri poolauspitoisuutta Hamiltonissa. Uudelleenpoolaus mitätöi alkuperäisen poolin.
 - Vaihtoehtoisesti poolauksen suhdetta HT1:een (450 µl+ 900 µl) voi muokata, jotta saavutetaan kohdeklusterin tiheysalue.

Uuden sukupolven sekvensointi

VeriSeq NIPT Solution v2 -järjestelmää voi käyttää uuden sukupolven sekvensointilaitteen kanssa, kun laitteen tekniset tiedot ovat seuraavat:

- kykenee 2 x 36:een paritetun pään luentaan
- yhteensopiva VeriSeq NIPT -näytteenvalmistelutarjan indeksisovittimien kanssa
- kahden kanavan kemia
- automaattinen .BCL-tiedostojen tuotanto (raakatiedot sekvensointilaitteesta)
- 400 miljoonaa parillisen pään lukua per ajo
- yhteensopiva VeriSeq NIPT Assay Software v2 -ohjelmiston kanssa.

NextSeq 550Dx on yhteensopiva VeriSeq NIPT Solution v2 -järjestelmän kanssa.

Sekvensoinnin tietanalyysi

Kun sekvensointi on valmis, sekvensointitiedot siirtyvät automaattisesti VeriSeq NIPT Assay Software v2 -ohjelmistoon analyysiä ja raportin generointia varten. Raportti sisältää luokitukset kaikista erän näytteistä sekä arvion kaikista ajon laadunvalvontametriikoista. Analyysiprosessi sekvensoinnista lopullisten tulosten saamiseen vie noin 4 tuntia 48 näytteen erässä. Lisätietoja tietojen analysoimisesta ja tuotetusta tiedostosta luomisesta on *VeriSeq NIPT Solution v2 -ohjelmisto-oppaassa (asiakirjanro 1000000067940)*.

Tulosten tulkinta

VeriSeq NIPT Solution v2 -algoritmi soveltaa edistynyttä tilastollista mallia, joka yhdistää useita erityyppisiä tietoja paritettujen päiden sekvensoitujen kirjastofragmenttien kokoelmasta. Tätä mallia käytetään havaitsemaan genomin alueita, jotka ovat ali- tai yliedustettuja kunkin näytteen kirjastossa. Mikä tärkeintä, tämä malli selittää, onko ali- tai yliedustuksen aste kvantitatiivisesti yhdenmukainen sikiön genomin aneuploidiatapahtumassa kirjastosta arvioidun sikiöfraktion tasolla.

Kaikkien kromosomien paired-end-sekvensointitiedot kohdistetaan viitegenomiin (HG19). Yksilölliset ja duplikoitumattomat kohdistetut readit kootaan 100 kt:n säilöihin. Vastaavien säilöjen määriä säädetään GC-painotuksen ja aiemmin määritetyn aluekohtaisen genomisen kattavuuden perusteella. Tällä tavoin normalisoituja säilömääriä käytettäessä tilastolliset tulokset kullekin autosomille saadaan vertaamalla muihin autosomeihin niitä kattavuusalueita, jotka ovat mahdollisia aneuploidien kohdealueita. Jokaiselle näytteelle lasketaan todennäköisyysuhde eli LLR (Log-Likelihood Ratio) -arvo ottamalla huomioon nämä kattavuuteen perustuvat arvot ja arvioitu sikiöfraktio. LLR edustaa todennäköisyyttä, jolla näyte on uskottava, kun siihen kohdistuvat havaittu kattavuus ja sikiöfraktio, verrattuna siihen todennäköisyyteen, että se ei ole uskottava, kun siihen kohdistuu sama havaittu kattavuus. Tämän suhteen laskennassa otetaan huomioon myös sikiöfraktion arvioitu epävarmuus. Myöhemmissä laskennoissa käytetään tämän suhteen luonnollista logaritmia. Määrittelyohjelmisto arvioi kunkin kohdekromosomin ja kunkin näytteen LLR-arvon aneuploidiamäärittystä varten.

Erän luonnin aikana on määritettävä kustakin näytteestä näytteen tyyppi (yksönen vai kaksonen), seulontatyyppi (perus vai genomilaajuinen) ja sukupuolikromosomin raportointi (kyllä, ei tai SCA). Yhdessä nämä vaihtoehdot määrittävät kustakin näytteestä raportoitavat tiedot.

Kaikkien näytetyyppien osalta seulontatyyppi määrittää, mitkä autosomaaliset poikkeamat raportoidaan. Perusseulontatyyppissä raportoidaan vain koko kromosomin trisomiatapahtumat kromosomeissa 13, 18 ja 21. Genomilaajuisessa seulontatyyppissä raportoidaan täydellinen tai osittainen kromosomin deleetio tai duplikaatio kaikista autosomaalisista kromosomeista. Pienimmän raportoitavissa olevan osittaisen kromosomin deleetion tai duplikaation pituus on 7 Mb.

Yksösnäytteissä sukupuolikromosomin raportointi voidaan poistaa käytöstä. Voit myös valita raportoitavaksi sukupuolikromosomien aneuploidiat joko euploidinäytteiden sukupuolen raportoinnin kanssa tai ilman sitä.

Jos kaksosnäytteissä valitaan Yes (Kyllä) sukupuolikromosomin raportointiin, tulos on rajoitettu Y-kromosomin läsnäolon tai puuttumisen raportointiin kirjastossa. Sukupuolikromosomian aneuploidiaa ei voi raportoida kaksosnäytteistä.

Tulos ANOMALY DETECTED (Poikkeavuus havaittu) osoittaa, että näytteestä on seulottu yksi tai useampi valittua seulontatyyppiä ja sukupuolikromosomin raportointivaihtoehtoa vastaava poikkeavuus. Kun poikkeavuus havaitaan, raportissa on kuvaus poikkeavuudesta sytogeneettisessä huomautuksessa.

VeriSeq NIPT Assay Software v2 käyttää sekvensoinnin aikana luotuja tilastoja tuottamaan sikiöfraktioarvion (FFE) kustakin näytteestä. FFE on arvioitu sikiön cfDNA:n komponentti, jonka määrittäminen löytää ja raportoi pyörästettynä prosenttilukuna kustakin näytteestä. Tämän arvion keskimääräinen keskihajonta kaikissa näytteissä on 1,3 %. FFE:tä ei tule käyttää yksinään näytteiden poissulkemiseen tuloksia raportoidessa.

Kromosomiedustus päätösten tekemisessä VeriSeq NIPT Assay Software v2 käyttää yksilöllistä sikiön aneuploidian luottamustestiä (individualized Fetal Aneuploidy Confidence Test, iFACT). Se on dynaaminen kynnysmetriikka, joka osoittaa, onko järjestelmä generoinut riittävän sekvensointikattavuuden ottaen huomioon kunkin näytteen sikiöfraktioestimaatin. Negatiivisia päätöksiä raportoidaan vain, jos näyte täyttää iFACT-kynnyksen. Jos näyte ei saavuta tätä kynnystä, laadunvalvonta-arvio näyttää ilmoituksen FAILED iFACT (iFACT epäonnistui) ja järjestelmä ei generoi tulosta.

iFACT:n lisäksi VeriSeq NIPT Assay Software v2 arvioi useita muita laadunvalvontametriikoita analyysin aikana. Lisämetriikka sisältää arviot kattavuuden yhdenmukaisuudesta genomien viitealueella ja cfDNA-fragmenttien pituuksien jakaumasta. Laadunvalvonta-arvio näyttää joko laadunvalvontamerkin tai laadunvalvonnan hylkäyksen hyväksyttävän alueen ulkopuolella olevista metriikoista. Laadunvalvonnan hylkäyksen tapauksessa järjestelmä ei generoi tulosta näytteestä. Jos näyte ei läpäise laadunvalvontaa, näyte voidaan käsitellä uudelleen, kunhan verinäyteputkessa on riittävästi plasmata.

VeriSeq NIPT Solution v2 generoi tietoja käytettäväksi loppuraportissa. Se ei generoi loppuraporttia potilaalle. Asiakkaat ovat vastuussa terveydenhuoltopisteen lääkärille toimitettavan loppuraportin mallista ja sisällöstä. Illumina ei ole vastuussa loppuraportin antaman viestin tarkkuudesta.



HUOMIO

Tarkista kaikkien näytteiden sikiöfraktioestimaatit. Jos sikiöfraktioestimaatit ovat samankaltaisia kaikissa ajon näytteissä, näytteet ovat mahdollisesti yhdistyneet, mikä on vaikuttanut tuloksiin. Ota yhteyttä Illuminan tekniseen tukeen, jos tarvitset apua vianmäärityksessä.

Suorituskykyominaisuudet

Seuraavat kliinisen suorituskyvyn ja analyttisen suorituskyvyn osioiden tiedot laadittiin käyttämällä käyttöohjeissa mainittuja protokollia ja materiaaleja alkaen plasmasta. Kaikki tämän osion sekvensointitiedot luotiin NextSeq 500/550 -sekvensointijärjestelmällä tai NextSeq 550Dx -sekvensointijärjestelmällä, jonka kokoonpano oli seuraavanlainen:

	NextSeq 500/550	NextSeq 550Dx
Laitteen ohjelmisto	NextSeq Control Software 4.0	NextSeq Operating Software 1.3
Reagenssipakkauksen versio	NextSeq 500/550 High Output v2.5 (75 cycle) Reagent Kit	NextSeq 550Dx High Output v2.5 (75 cycle) Reagent Kit
Sekvensointimenetelmä	2 x 36 paritetun pään sekvensointiajoa suurtehotilassa	2 x 36 paritetun pään sekvensointiajoa suurtehotilassa

Kliininen tutkimus

VeriSeq NIPT Solution v2 -järjestelmän kliininen tarkkuus osoitettiin arvioimalla plasmanäytteitä yksös- tai kaksosraskauksissa. Näytteet saatiin näytepankissa olevista plasmanäytteistä, jotka oli aiemmin käsitelty perifeerisistä kokoverinäytteistä ja joista oli tunnistetiedot poistettu. Tutkimukseen otettiin mukaan yli 45 000 näytettä. Näille näytteille tehtiin aiempi prenataalin seulonta sikiön kromosomianeuploidioiden ja vähintään 7 Mb:n osittaisten deleetioiden ja duplikaatioiden varalta. Kaikki näytteet kyseisistä raskauksista ja myöhempien näytteiden alijoukko muista raskauksista kelpuutettiin testaukseen, jos kliiniset tulokset olivat saatavilla ja näytekriteerit täyttyivät. Testausanalyysijoukossa oli yhteensä 2 335 näytettä. Tästä näytejoukosta 2 328 näytettä oli yksös- tai kaksosraskauksista ja seitsemän kaksosraskauksista.

Näistä näytteistä 28 (1,2 %, 28/2335) hylättiin määrityksen laadunvalvonnassa valmiiden sekvensointitietojen ensimmäisellä analyysikerroksella:

- 27 iFACT-hylkäystä (yksi XO, 26 kohdetta sisältämätöntä)
- Yksi hylkäys odotetun alueen ulkopuolisten tietojen vuoksi

Väestötiedot ja raskauden ominaisuudet

[Taulukko 7](#) sisältää äidin iän, gestatioiän ja raskauskolmanneksen yhteenvetotiedot genomilaajuiseen seulontaan sisällytettyjen näytteiden (mosaikisminäytteet mukaan luettuina) osalta. Enemmistö (98 %) testinäytteistä edustaa ensimmäistä raskauskolmannesta.

Väestötiedot arvioitiin perus- ja genomilaajuisten kohorttien välillä, ja niissä ei ollut tilastollista eroa.

Väestötiedot ja raskauden ominaisuudet olivat samanlaisia, otettiinpa mukaan tunnetut mosaikismit tai ei.

Taulukko 7 Väestötiedot ja raskauden ominaisuudet

Yhteenvetotilasto	Genominlaajuinen (mosaikimit mukaan luettuina)
Näytteiden määrä	2307*
Äidin ikä – vuotta	
Keskiarvo	35,08
Keskihajonta	4,04
Mediaani	34,95
25. persentiili, 75. persentiili	32,31; 37,79
Minimi, maksimi	20,22; 53,02
Gestaatioikä verinäytteen ottohetkellä – viikkoa	
Keskiarvo	10,93
Keskihajonta	1,20
Mediaani	10,57
25. persentiili, 75. persentiili	10,29; 11,14
Minimi, maksimi	10,00; 27,86
Raskauskolmannes – n (%)	
< Ensimmäinen (< 14 viikkoa)	2252 (98 %)
Toinen	54 (2 %)
Kolmas (≥ 27 viikkoa)	1 (0 %)

* Lopulliset esitetyt näytteet sisälsivät seitsemät kaksoset.

Kliininen suorituskyky

VeriSeq NIPT Solution v2 -järjestelmän tuottamia tuloksia verrattiin kliinisen referenssistandardin tuloksiin. Kaikilla tutkimusnäytteillä oli kliiniset referenssistandardin tulokset (kliininen totuus) sikiön kromosomianeuploidiatilasta, osittaisista deleetioista ja vähintään 7 Mb:n duplikaatioista. Tähän tutkimukseen otettujen näytteiden kliiniset referenssistandarditulokset määräytyivät kromosomianalyysin tulosten tai vastasyntyneen lääkärintarkastuksen ja NGS-pohjaisen NIPT-negatiivisen seulonnan perusteella. Koulutettu tutkimushenkilöstö luokitteli kliiniset referenssistandarditiedot toimeksiantajan lääketieteellisen koodauksen asiakirjan mukaisesti.

Kromosomin analyysimenetelmät sisälsivät karyotyyppityksen, fluoresenssin in situ -hybridisaation (FISH) tai komparatiivisen genomisen hybridisaation kromosomimikroryhmän (CMA). Kromosomianalyysi tehtiin vastasyntyneen tai vauvan ääreisverestä tai syljestä, hedelmöitystulosten (POC) näytteistä, amniosyyteistä, sikiön suonikalvon nukkalisäkkeestä, istukkakudoksista tai postnataalisesta napanuoraverestä.

Mosaikismiksi määritetään eri kromosomikoostumuksen kahden tai useamman solulinjan läsnäolo yksilössä. Solulinjat ovat peräisin samasta tsygootista. Mosaikismin tyyppi ja taso vaihtelevat ja riippuvat mosaiikitapahtumien ajoituksesta embryogeneesiin ja sikiön kehityksen aikana. Erityyppistä mosaikismia ilmenee prenataaleissa diagnooseissa epänormaalien versus normaalien solulinjojen jakauman perusteella sytotrofoblastissa, mesenkyymissä tai sikiössä.¹⁰ Vaikka mosaikismia voi esiintyä minkä tahansa kromosomipoikkeavuuden yhteydessä, mosaikismin esiintyvyys harvinaisissa trisomioissa on suurempaa kuin kromosomien 21, 18 ja 13 trisomioissa (T21, T18 ja T13).¹¹ Suorituskyvyn arvioinnissa mosaikismitapaukset otettiin mukaan genomilaajuiseen analyysiin, koska tämän seulontatyyppin tarkoitus tässä määrittelyssä on havaita harvinaiset autosomaaliset aneuploidiat (RAA:t).

Perusseulonnan suorituskyky

Perusseulonnessa poikkeavuudet ovat T21, T18 ja T13. Analyysiin otettiin yhteensä 2 243 yksös- ja kaksosnäytettä. Kaikki seitsemän kaksosraskautta havaittiin oikein T21:ksi, eikä niitä ole raportoitu seuraavassa taulukossa.

Taulukko 8 VeriSeq NIPT Solution v2 -järjestelmän herkkyys ja spesifisyys havaita trisomiat 21, 18 & 13 yksösraskauksien perusseulonnessa (pois lukien tunnetut mosaikismit)

	T21	T18	T13
Herkkyys	> 99,9 % (130/130)	> 99,9 % (41/41)	> 99,9 % (26/26)
2-puolinen 95 %:n CI	97,1 %, 100 %	91,4 %; 100 %	87,1 %; 100 %
Spesifisyys	99,90 % (1982/1984)	99,90 % (1995/1997)	99,90 % (2000/2002)
2-puolinen 95 %:n CI	99,63 %; 99,97 %	99,64 %; 99,97 %	99,64 %; 99,97 %

Määrittelyn suorituskyky perusseulonnessa, kuten [Taulukko 8](#) esittää, on laskettu pois lukien 64 näytteen alijoukko, joissa oli harvinaisia autosomaalisia aneuploidioita (RAA), autosomaalisia osittaisia deleetioita tai duplikaatioita tai tunnettua mosaikismia. Nämä 64 näytettä sisälsivät kahdeksan T21- ja kolme T18-mosaiikkia. Viiden näistä 11 näytteestä tunnistettiin sisältävän VeriSeq NIPT Assay Software v2 -ohjelmiston havaitseman poikkeavuuden.

Genominlaajuisen seulonnan suorituskyky

Genominlaajuisessa seulonnassa kaikki poikkeavuudet sisältävät trisomiat, monosomiat ja osittaiset deleetiot tai duplikaatiot kooltaan vähintään 7 Mb. Genominlaajuinen seulonta sisälsi 36 näytettä, joissa oli tunnetusti mosaikismia. Yhteensä 2307 yksös- ja kaksosnäytettä testattiin. Kaikki seitsemän kaksosraskautta havaittiin oikein kromosomin 21 poikkeavuudeksi, eikä niitä ole raportoitu seuraavassa taulukossa.

Genominlaajuisen seulonnan suorituskyky kaikissa poikkeavuuksissa

Taulukko 9 VeriSeq NIPT Solution v2 -järjestelmän herkkyys ja spesifisyys havaita kaikki poikkeavuudet genominlaajuisessa seulonnassa (mukaan lukien tunnetut mosaikismit)

	Herkkyys	Spesifisyys
Arvio % (n/N)	95,5 % (318/333)	99,34 % (1954/1967)
2-puolinen 95 %:n CI	92,7 %; 97,3 %	98,87 %; 99,61 %

Genominlaajuisen seulonnan suorituskyky harvinaisissa autosomaalisissa aneuploidioissa

Taulukko 10 VeriSeq NIPT Solution v2 -järjestelmän herkkyys ja spesifisyys havaita harvinainen autosomaalinen aneuploidia (RAA) genominlaajuisessa seulonnassa (mukaan lukien tunnetut mosaikismit)

	Herkkyys	Spesifisyys
Arvio % (n/N)	96,4 % (27/28)	99,80 % (2001/2005)
2-puolinen 95 %:n CI	82,3 %; 99,4 %	99,49 %; 99,92 %

Genominlaajuisen seulonnan suorituskyky osittaisten deleetioiden ja duplikaatioiden osalta

Taulukko 11 VeriSeq NIPT Solution v2 -järjestelmän herkkyys ja spesifisyys havaita vähintään 7 Mb:n osittaiset deleetiot ja duplikaatiot genominlaajuisessa seulonnassa (mukaan lukien tunnetut mosaikismit)

	Herkkyys	Spesifisyys
Arvio % (n/N)	74,1 % (20/27)	99,80 % (2000/2004)
2-puolinen 95 %:n CI	55,3 %; 86,8 %	99,49 %; 99,92 %

Perus- ja genominlaajuisten seulontojen väliset suorituskykyerot

Yleisten trisosomioiden ja sukupuolikromosomien aneuploidioiden pisteytysmenetelmä on sama sekä perus- että genominlaajuisissa seulonnoissa. Perusseulonta käyttää algoritmia vain T21:een, T18:aan ja T13:een. Genominlaajuinen seulonta kuitenkin laajentaa tätä menetelmää kaikkien trisomioiden ja harvinaisten autosomaalisten aneuploidioiden sekä osittaisten duplikaatioiden ja deleetioiden arvioimista varten.

Perus- ja genominlaajuisten seulontojen välisessä suorituskykyraportoinnissa on kaksi eroa. Ensinnäkin genominlaajuisessa seulonnassa näytteet, joissa oli tunnettua mosaikismia sekä yleisten trisomioiden että harvinaisten autosomaalisten aneuploidioiden ja osittaisten deleetioiden ja duplikaatioiden osalta, poissuljettiin suorituskykyometriikasta. Toiseksi genominlaajuinen seulonta voi preferentiaalisesti raportoida osittaisen duplikaation tai deleetion havainnon täyden trisomian sijaan. Täyden trisomian läsnäolo osittaisen duplikaation tai deleetion lisäksi voidaan huomata tarkistamalla lisäraportissa ilmoitetut LLR-pisteet.

Mosaikkien sisällyttäminen genomilaajuiseen seulontaan

Mosaikismi on mainittu tämän määrittelyn rajoituksena. Kun näytteessä on mosaikismia, poikkeavuuden sikiösignaali heikkenee ja siten voi olla haastavampaa havaita se vaarantamatta määrittelyn kokonaisspesifisyyttä. Koska mosaikismi on kuitenkin relevantimpaa laajennetussa sisällössä, mosaikismia sisältäviä näytteitä sisällytettiin genomilaajuiseen seulontaan.

Genomilaajuiseen seulontaan, mutta ei perusseulontaan, sisällytetyistä 64 näytteestä 36 näytteen tunnistettiin kliinisen referenssistandardin avulla sisältävän mosaikismia. Näistä 36 näytteestä 23 päätöstä vastasi kliinistä referenssistandardia.

Osittainen deleetio tai duplikaatio versus koko kromosomin aneuploidian havaitseminen

VeriSeq NIPT Solution v2 -järjestelmässä on valikkovaihtoehtoja sekä perusseulonnalle että genomilaajuiselle seulonnalle. Perusseulonnassa ohjelmisto raportoi ANOMALY DETECTED (Poikkeavuus havaittu) -tuloksen vain, kun kromosomeissa 21, 18 tai 13 havaitaan täysi aneuploidia ja jos kaikki laadunvalvontametriikat täyttyvät. Genomilaajuisessa seulonnassa järjestelmä havaitsee aneuploidian kaikissa autosomeissa ja osittaisen deleetion ja duplikaation vähintään 7 Mb:n laajuisena.

Käytettäessä genomilaajuista seulontaa tapauksissa, joissa sekä koko kromosomin tapahtuma että saman kromosomin CNV-tapahtuma ylittävät LLR-kynnyksen, järjestelmä raportoi ensisijaisesti osittaisen deleetion tai duplikaation koko kromosomia koskevan päätöksen sijaan, jos osittaisen deleetion tai duplikaation koko kattaa enintään 75 % siitä kromosomissa, missä tapahtuma havaittiin. Jos havaittu osittaisen deleetion ja duplikaation alue on suurempi kuin 75 % kromosomin koosta, ohjelmisto raportoi tapahtuman täytenä trisomiana tai koko kromosomin monosomiana, jos samanaikaisesti myös koko kromosomin LLR-kynnys ylittyy. Siksi merkittävien suuret deleetiot ja duplikaatiot, jotka ovat enintään 75 % kromosomin koosta, voivat viitata koko kromosomin aneuploidiaan.

Kaikissa näytteissä koko kromosomin luokituksen LLR-pisteet ovat saatavilla lisäraportissa. LLR-pisteitä on tarkasteltava suhteessa kaaviossa [95 %:n tunnistustodennäköisyys keskimääräisillä alueilla koon mukaan käytettäessä VeriSeq NIPT Solution v2 -järjestelmää sivulla 58](#) määritettyyn rajan ennen tuloksen tulkittamista. Jos esimerkiksi CNV-tunnistuksen kromosomitasoiset LLR-pisteet ovat yli rajan, ne antavat lisätukea koko kromosomin aneuploidiaan viittaavalle tulkinnalle. Katso esimerkkinä [Taulukko 12](#).

Kliinisessä tutkimuksessa oli kaksi yksösraskausnäytettä, joissa oli merkittävän laajat duplikaatiot (yksi kromosomissa 21 ja yksi kromosomissa 18), kuitenkin alle 75 % kromosomin suhteellisesta koosta (katso [Taulukko 12](#)). Molemmat tapahtumat raportoitiin osittaisina duplikaatioina eikä kyseisen kromosomin täytenä trisomiana. Näiden tapahtumien LLR-pisteet olivat rajan yläpuolella, mikä viittasi täyden trisomian tulokseen. Osittaisen duplikaation tai täyden trisomian päätöksen osalta positiivisen NIPT-päätöksen seurantahoito tarjoaa potilaalle varmistustestauksen prenataalisen diagnoosin kautta.

Taulukko 12 Esimerkkejä genomilaajuudessa seulonnassa tunnistetuista suurista duplikaatioista

	Kliininen totuus	Genomilaajuinen järjestelmätulos	Poikkeavuuden koko (Mb)	% kromosomista	LLR-pisteet
Näyte 1	Trisomia 21 yksönen	Osittainen duplikaatio 21:ssa	22,50	48,9	19,43
Näyte 2	Trisomia 18 yksönen	Osittainen duplikaatio 18:ssa	47,00	60,2	12,99

Katso VeriSeq NIPT Solution v2 -ohjelmisto-oppaasta (asiakirjanro 1000000067940) lisätietoja laadunvalvontametriikoista, joilla raportoidaan aneuploidiatuloksia.

Sukupuolikromosomit

VeriSeq NIPT Solution v2 -järjestelmän sukupuolikromosomituloksia verrattiin kliinisen referenssistandardin tuloksiin, ja tästä on esitetty yhteenveto seuraavassa taulukossa. Yhtäpitävyysprosentti laskettiin kunkin sukupuolikromosomin osalta kunkin kliinisen referenssistandardin tuloksen sisällä. Yhtäpitävyysprosentti laskettiin niiden näytteiden määränä, joissa VeriSeq NIPT Solution v2 -järjestelmän kromosomipäätös vastasi kliinisen referenssistandardin luokitusta jaettuna niiden näytteiden kokonaismäärällä, joilla oli sama kliinisen referenssistandardin luokitus.

Taulukko 13 Sikiön sukupuolen luokituksen yhtäpitävyysprosentti*

Sikiön sukupuolen luokitus	Karyotyyppi	Fenotyyppi vastasyntyneen lääkärintarkastuksessa		Sytogeneettiset tulokset							
		Nainen	Mies	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY	Muu**	Puuttuu
Poikkeavuutta ei havaittu	XX	997	0	21	0	2	0	0	0	0	0
Poikkeavuutta ei havaittu	XY	0	966	0	15	0	0	0	0	0	1
Poikkeavuus havaittu	XO	0	0	0	0	19	0	0	1	0	0
Poikkeavuus havaittu	XXX	0	0	0	0	0	17	0	0	1	0
Poikkeavuus havaittu	XXY	0	0	0	0	0	0	23	0	1	0
Poikkeavuus havaittu	XYY	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0

Sikiön sukupuolen luokitus		Fenotyyppi vastasyntyneen lääkärintarkastuksessa		Sytogeneettiset tulokset							
		Nainen	Mies	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY	Muu**	Puuttuu
Havaittu	Karyotyyppi										
Yhteensä		997	966	21	15	21	17	23	12	2	1
Yhtäpitävyysprosentti		100	100	100	100	90,5	100	100	91,7	Ei sovelleta.	Ei sovelleta.

* Viisi kaksosraskautta luokiteltiin oikein Y-kromosomin sisältäväksi. Kaksi raskautta luokiteltiin oikein ei sisältävän Y-kromosomia.

** Muut sytogeneettiset tulokset olivat XXXXX ja XXYY.

VeriSeq NIPT Solution v2 -ohjelmiston positiivisen tuloksen ennustearvo ja negatiivisen tuloksen ennustearvo

Testin positiivisen tuloksen ennustearvo (PPV) ja negatiivisen tuloksen ennustearvo (NPV) antavat tietoa testin kyvystä ilmoittaa kliinisistä päätöksistä testin herkkyyden ja spesifisyyden perusteella sekä testiä edeltävän todennäköisyyden, että sikiöllä on trisomia (esiintyvyys). Koska positiivisen ja negatiivisen tuloksen ennustearvo riippuvat esiintyvyydestä ja näiden aneuploidoiden esiintyvyys voi vaihdella eri kohdeväestöissä, kliinisen tarkkuuden tutkimuksessa ennustearvot laskettiin lukuisille uskottaville esiintyvyyksisarvoille perusseulonnessa (ilman tunnettuja mosaikismeja) havaittujen herkkyyden- ja spesifisyyksisarvojen perusteella. [Taulukko 17](#) perustuu genomilaajuiseen seulontaan (johon sisältyvät tunnetut mosaikismit).

Taulukko 14 Trisomian 21 esiintyvyys, PPV ja NPV perusseulonnessa (ilman tunnettuja mosaikismeja)

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

Taulukko 15 Trisomian 18 esiintyvyys, PPV ja NPV perusseulonnassa (ilman tunnettuja mosaikismeja)

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

Taulukko 16 Trisomian 13 esiintyvyys, PPV ja NPV perusseulonnassa (ilman tunnettuja mosaikismeja)

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

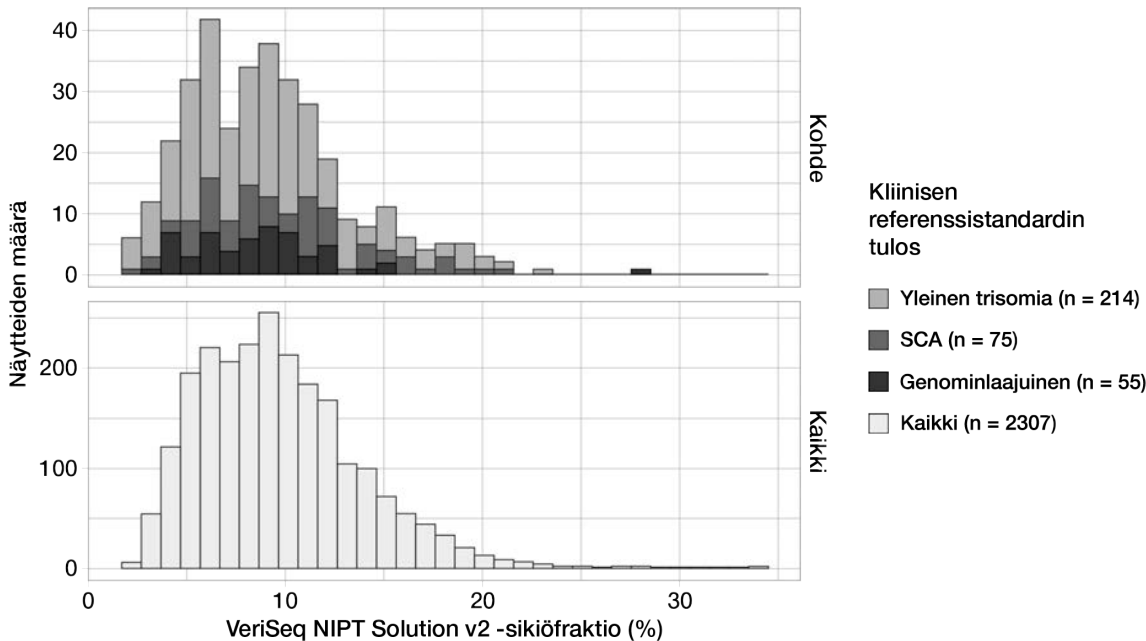
Taulukko 17 Minkä tahansa poikkeavuuden esiintyvyys, PPV ja NPV genomilaajuisessa seulonnassa (mukaan lukien tunnetut mosaikismit)

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

Sikiöfraktion jakauma

Kuva 1 esittää VeriSeq NIPT Solution v2 -järjestelmän sikiöfraktion (FF) arviot kliinisen referenssistandardin tulosluokan mukaan genomilaajuisesta seulonnasta, johon sisältyi mosaikismeja.

Kuva 1 Sikiöfraktion jakauma



Viidessä näytteessä oli poikkeavuuksia useissa luokissa. Yleinen trisomia sisältää näytteet, joissa on trisomia 21, 18 ja/tai 13. Genominlaajuinen sisältää näytteet, joissa on harvinainen autosomaalinen aneuploidia tai osittaisia deleetioita ja/tai duplikaatioita.

Sikiöfraktioarviot olivat yhteensä 2–34 %, mediaani 9 % ja kvartiilien välinen (IQ) alue 6–12 %. Yleisten trisomioiden ja tapahtumien mediaani sikiöfraktioarvio oli genominlaajuisessa seulonnassa 8 % ja sukupuolikromosomien aneuploidiassa 9 %. Sikiöfraktioarvioiden vaihteluväli oli yhdenmukainen kaikkien tulosten osalta. Sikiöfraktioiden jakaumassa ei ole ilmeistä siirtymää yleisissä trisomioissa, sukupuolikromosomien aneuploidioissa, genominlaajuisen seulonnan havaitsemisissa tapahtumissa tai kaikissa näytteissä genominlaajuisessa analyysissä.

Suorituskyky kaksosraskauksissa

Trisomian 13, 18 ja 21 sekä Y-kromosomin suorituskyvyn arvioiminen kaksosraskauksissa

Kaksosraskauksien trisomian 21, 18 ja 13 matalan esiintyvyyden vuoksi vain pieni määrä kyseisiä kaksosnäytteitä oli saatavilla kliiniseen tutkimukseen. Jotta voitiin arvioida VeriSeq NIPT Solution v2 -tuotteen suorituskykyä kaksosraskauksissa, kaksosraskauksien simuloimiseen käytettiin *in silico* -malleja, jotka perustuivat havaintoihin kliinisistä näytteistä. Tämä simulaatio oli käyttötarkoituksiryhmän mukainen. Sikiöfraktion jakauma määritettiin noin 4 500 kaksosnäytteestä, ja sitä verrattiin noin 120 000 yksösnäytteen jakaumaan. Sikiöfraktion jakauma aneuploidiatilan mukaan määritettiin yksösiä koskevista otaksutuista päätöksistä (1 044 trisomiaa 21, 307 trisomiaa 18 ja 192 trisomiaa 13). Kahden jakauman yhdistäminen mahdollisti

aneuploidian tunnistuksen päättelyn kaksosilla. Sama- ja erimunaisia kaksosia simuloitiin ja herkkyuden arvioinnissa käytettiin painotettua keskiarvoa, joka edusti niiden esiintymistä kohderyhmässä (2 erimunaista; 1 samamunainen). Spesifisyyttä varten simuloitiin ei-kohdekaksosjoukkoja.

Kunkin simuloidun trisomianäytteen fraktio (ts. kohdefraktio) laskettiin eri tavalla kussakin näyteluokassa:

- Samamunaisilla kaksosilla kunkin näytteen kohdefraktioksi määritettiin 1,0, koska tässä tilanteessa trisomia on molemmilla kaksosilla.
- Erimunaisilla kaksosilla oletettiin, että vain toisella kaksosella oli trisomia (on erittäin harvinaista, että molemmilla erimunaisilla kaksosilla olisi trisomia). Kohdefraktioarvoja simuloitiin käyttämällä tunnettuja sikiöfraktioasteen jakaumia, jotka määritettiin ei-sukupuolikohtaisista kliinisistä kaksosnäytteistä. Lähestymistapa oli konservatiivinen, eli oletettiin, että trisomiakaksosella oli aina pienempi sikiöfraktio kahdesta kaksosesta. Sikiöfraktioihin käytettiin korjauskerrointa, joka oli keskimäärin pienempi trisomia 13- ja 18-raskauksissa.
- Ei-trisomiakaksosten osalta kunkin näytteen kohdefraktio asetettiin nolnaan.

Trisomia 18- tai 13 -kaksosilla näytteen kohdefraktiota vastaava sikiöfraktio oli pienempi. Pienennys oli suhteessa keskimääräiseen sikiöfraktion pienenemään, joka havaittiin kliinisissä tiedoissa trisomiassa 18 tai 13 yksösissä verrattuna euploidisiin yksösiin.

Sikiöfraktiota yhteensä sekä kunkin simuloidun näytteen kohdefraktiota käytettiin laskemaan aneuploidiapisteet käyttämällä VeriSeq NIPT Solution v2 -vakioalgoritmia. Herkkyys laskettiin määrittämällä, kuinka usein simuloitujen kohdekaksosten aneuploidiapisteet olivat vastaavan aneuploidiarajan yläpuolella. Spesifisyys laskettiin vastaavasti määrittämällä, kuinka usein simuloitujen ei-kohdekaksosten aneuploidiapisteet olivat alle vastaavan aneuploidiarajan ([Taulukko 18](#)). 95 %:n luottamusväli arvioitiin alkuperäisen tietojoukon todellisten kliinisten kaksosnäytteiden määrän perusteella. Näytteet luokiteltiin joko asianomaisen trisomian sisältäväksi tai sisältämättömäksi.

Y-kromosomin herkkyuden arvioimiseksi kaksosnäytteistä simuloitiin XY/XY- ja XX/XY-kaksosten joukkoja. Laskettiin painotettu keskiarvo, joka edusti niiden esiintyvyyttä kohdeväestössä (1 XY/XY: 1 XX/XY). Kaksosten Y-kromosomin spesifisyyden arvioimiseksi simuloitiin XX/XX-kaksosten joukko. Sikiöfraktion kokonaisarvot simuloitiin kliinisten kaksosnäytteiden sikiöfraktion tunnetun jakauman mukaan.

XY/XY- ja XX/XY-kaksosten osalta vastaavat Y-kromosomipisteet arvioitiin käyttämällä tunnettua suhdetta sikiöfraktion ja Y-kromosomipisteiden välillä miehiksi luokitelluista kliinisistä yksösnäytteistä. XX/XY-kaksosten osalta kohdesikiöfraktion arvot (ts. miesten) simuloitiin käyttämällä tunnettuja sikiöfraktioasteen jakaumia, joita oli havaittu saman raskauden kaksosten välillä määritettynä erisukupuolisten kaksosten kliinisistä näytteistä. Tutkimuksessa käytettiin konservatiivista lähestymistapaa, jossa kohdefraktio valittiin niin, että se vastasi kahdesta kaksosesta pienempää. Kunkin simuloidun XX/XY-näytteen osalta Y-kromosomipisteet kerrottiin kohdefraktiolla.

XX/XX-kaksosten osalta Y-kromosomipisteet poimittiin naisiksi luokiteltujen kliinisten yksösnäytteiden pisteistä. Y-kromosomipisteitä ja kokonaissikiöfraktiota käytettiin sitten luokittelemaan kukin simuloitu näyte Y-kromosomin sisältäväksi tai Y-kromosomi puuttuvaksi VeriSeq NIPT Solution v2 -vakioalgoritmin avulla.

Herkkyys laskettiin määrittämällä, kuinka usein simuloitunut XY/XY- tai XX/XY-kaksoset luokiteltiin oikein Y-kromosomin sisältäviksi. Spesifisyys laskettiin määrittämällä, kuinka usein simuloitunut XX/XX-kaksoset luokiteltiin oikein Y-kromosomipuutteisiksi. 95 %:n luottamusvälit arvioitiin alkuperäisen tietojoukon sellaisten todellisten kliinisten kaksosnäytteiden määrän perusteella, jotka oli luokiteltu joko Y-kromosomin sisältäviksi tai ei sisältäviksi.

Taulukko 18 Trisomia 21:n, 18:n ja 13:n arviot simuloituissa kaksosraskauksissa

	Trisomia 21	Trisomia 18	Trisomia 13	Y:n läsnäolo
Herkkyys	96,4 %	95,7 %	93,6 %	> 99,9 %
2-puolinen 95 %:n CI	(86,4 %; 98,9 %)	(68,3 %; 99,4 %)	(64,1 %; 98,9 %)	(99,9 %; > 99,9 %)
Spesifisyys	99,9 %	> 99,9 %	> 99,9 %	> 99,9 %
2-puolinen 95 %:n CI	(99,8 %; > 99,9 %)	(99,9 %; > 99,9 %)	(99,9 %; > 99,9 %)	(99,7 %; > 99,9 %)

Taulukko 18 on esittä pistestimaimat ja arvioidut 95 %:n luottamusvälit VeriSeq NIPT Solution v2 -järjestelmän herkkyydestä ja spesifisyydestä havaita trisomia 21, 18, 13 sekä Y-kromosomi simuloituissa kaksosraskauksissa, jotka vastaavat kohdeväestöä. Luottamusvälit arvioitiin sen määrän perusteella, jonka laadunvalvonta hyväksyi asianomaisen trisomian sisältäväksi tai sisältämättömäksi kliiniseksi kaksosnäytteeksi. Herkkyyslaskennassa oletetaan, että kaksi kolmannesta kohdekaksosraskauksista ovat kaksimunaisia ja sisältävät yhden kohdekaksosen, kun taas kolmannes kohdekaksosraskauksista on yksimunaisia ja molemmat kaksoset ovat kohdekaksosia.

Taulukko 18 luettelee arvioita, jotka koskevat vain kaksosraskauksia. Vielä pienemmän esiintyvyyden vuoksi useamman sikiön raskauksien (kolmosten tai sitä suuremman määrän) tiedot eivät riittäneet määrittämään sopivia tilastomalleja aneuploidian tunnistustarkkuuden arvioimiseen.

Analyttinen suorituskyky

Tarkkuus

Määrittystarkkuuden arviointia ja kvantifiointia varten tehtiin uusinta-analyysi käyttämällä VeriSeq NIPT Solution v2 -analyysiohjelmistoa kahdesta aiemmasta VeriSeq NIPT Solution -tutkimuksesta:

- toistettavuuden monikeskustutkimus, joka koostui kolmen käyttäjän tekemästä kolmesta ajosta kolmessa laitoksessa käyttämällä yhtä reagenssierää eli yhteensä yhdeksästä ajosta.
- laboratorion sisäinen tarkkuustutkimus, joka koostui 12 ajosta yhdessä laitoksessa kahdella ML STAR -laitteella, kahdella sekvensointijärjestelmällä ja kolmella sekvensointireagenssierällä.

Tarkkuustutkimuksen tavoitteena oli kvantifioida määrittämisen tarkkuus trisomian 21 (T21) ja kromosomin Y osalta ja arvioida eri laitteiden, kirjastonvalmistelupakkausten ja sekvensointireagenssierien välinen vaihtelevuus.

5 %:n sikiöfraktio-T21-pooli luotiin yhdistämällä raskaana olevien naisten (joilla oli T21-sikiö) plasmasta uutettu cfDNA ja ei raskaana olleiden naisten plasmasta uutettu cfDNA. Myös 10 %:n sikiöfraktio äiti-mies (XY-sikiö) cfDNA-pooli luotiin. Kunkin tutkimuksen kunkin ajon näytepaneeliin sisältyi 4 replikaattia 5 %:n sikiöfraktiosta T21-näytepoolista ja 20 replikaattia 10 %:n sikiöfraktion äiti-mies-cfDNA-poolista. Testaus tehtiin 10 vuorokauden aikana niin, että kahdessa tutkimuksessa tehtiin yhteensä 21 ajoa.

T21:n ja Y-kromosomin läsnäolo valittiin arvioitavaksi kliinisten olosuhteiden ja poikkeavuudentunnistuksen monimutkaisuuden edustavuuden perusteella. Pienimpänä ihmisen autosomina kromosomin 21 koolla on suora vaikutus T21:n tunnistamiseen, erityisesti matalilla sikiöfraktioarvoilla, kuten tässä tutkimuksessa käytetyillä. Äidin plasmassa esiintyvä Y-kromosomi on peräisin ainoastaan sikiöstä ja siten määrittely on helpompi havaita se.

Kromosomin 21 LLR-pisteiden ja Y-kromosomin normalisoitujen kromosomiarvojen (NCV) havaittu keskiarvo ja keskihajonta osoittivat, että replikaatin keskihajonta (SD) oli suurin vaihtelevuuden lähde. Laitosten, laitteiden ja reagenssierien välinen vaihtelu lisäsi merkityksettömän määrän vaihtelevuutta, minkä osoitti ero kokonaiskeskihajonnan ja replikaatin keskihajonnan välillä; katso [Taulukko 19](#) ja [Taulukko 20](#).

Taulukko 19 Yhteenveto useiden laitosten (toistettavuus-) sekvensointivasteen keskihajonnasta (SD)

Vaste	N	Keskiarvo	Replikaatin SD	Toistettavuuden SD yhteensä*
Kromosomin 21 LLR-pisteet	36	34,43	11,36	11,36
Y-kromosomi NCV	180	190,56	7,96	10,20

* Kokonaismäärä sisältää laitoksen, käyttäjän, ajon, päivän ja replikaatin aiheuttaman vaihtelevuuden.

Taulukko 20 Yhteenveto laboratorion sisäisestä sekvensointivasteen tarkkuudesta

Vaste	N	Keskiarvo	Replikaatin SD	Laboratorion sisäinen SD yhteensä*
Kromosomin 21 LLR-pisteet	48	36,01	9,07	10,25
Y-kromosomi NCV	240	198,68	7,63	7,82

* Kokonaismäärä sisältää sekvensointilaitteen, reagenssierän, käyttäjän, ajon, päivän ja replikaatin aiheuttaman vaihtelevuuden.

VeriSeq NIPT Solution v2 -järjestelmän sekvensointitarkkuutta (keskihajonta yhteensä) virtauskyvetin version 2.0 ja version 2.5 välillä vertailtiin lisätutkimuksessa. Tutkimukseen otettiin kahdentyyppisiä virtauskyvettejä (v2.0 ja v2.5), kolme sekvensointipakkauserää ja neljä laitejärjestelmää. Tutkimuksessa tehtiin kaksi sekvensointiajoa yhdistelmää kohti niin, että yhdessä laitoksessa tehtiin 48 ajoa. Yksi sekvensointipooli oli manuaalisesti valmistelluista cfDNA-levyistä. Näytepaneeliin sisältyi 4 replikaattia 5 %:n sikiöfraktiosta T21-näytepoolista ja 20 replikaattia 10 %:n sikiöfraktion äiti-mies-cfDNA-poolista (XY-sikiö). Tutkimuksen tulokset esittää [Taulukko 21](#), ja ne tukevat johtopäätöstä, että sekvensointitarkkuudessa ei ole eroa käytettäessä virtauskyvettä v2.0 tai v2.5.

Taulukko 21 Yhteenvedo sekvensointivasteen tarkkuudesta käytettäessä virtauskyvettä v2.0 versus v2.5

Vaste	Havaintomäärä versiota kohti	v2.0:n keskihajonta yhteensä*	v2.5:n keskihajonta yhteensä*	Tilastollinen tulos**
Kromosomin 21 LLR-pisteet	96	9,56	8,44	Tilastollisesti vastaava (p-arvo = 0,25)
Y-kromosomi NCV	480	7,74	7,38	Tilastollisesti vastaava (p-arvo = 0,38)

* Kokonaismäärä sisältää sekvensointilaitteen, reagenssierän, ajon, päivän ja replikaatin aiheuttaman vaihtelevuuden.

** Perustuu varianssin yhtäsuuruuden F-testiin (keskihajonnan neliö).

Ristikontaminaatio

Ristikontaminaatiota arvioitiin VeriSeq NIPT Solution -tuotteen näytteenvalmisteluolosuhteissa. Ei-raskaana olevien naisten (XX) ja aikuisten miesten (XY) plasmapoolit testattiin ruudukkokuviolla 96-kuoppalevyn muodossa neljällä levyllä. N = 48 sekä naisten että miesten näytteiden osalta per levy; yhteensä 192 naisten näytettä ja 192 miesten näytettä. Mikään naisten näytteistä ei osoittanut Y-kromosomin kattavuusastetta, joka oli tilastollisesti korkeampi kuin arvioitu tausta, mikä osoitti, ettei ristikonaminaatiota samalla levyllä olevista miesten näytteistä ollut. VeriSeq NIPT Solution -tuotteessa ei todettu havaittavaa ristikonaminaatiota.

Mahdollisesti häiritsevät aineet

Mahdollisesti häiritsevien aineiden vaikutusta VeriSeq NIPT Solution -järjestelmässä arvioitiin testaamalla määrityksen suorituskykyä sellaisten aineiden läsnäollessa.

Albumiinia, bilirubiinia, hemoglobiinia ja triglyseridejä (endogeenisiä) lisättiin kutakin sellaisten äitien plasmapooleihin, joilla ei ollut naispuolista kohdesikiötä (XX-sikiö). Niitä testattiin kahdella pitoisuudella kutakin testiainetta kohden (n = 16 kutakin). Häiriöitä määrityksen suorituskyvyssä ei havaittu.

Taulukko 22 Mahdollisesti häiritsevät aineet (endogeeniset)

Testattu aine	Pieni testipitoisuus (mg/ml)	Suuri testipitoisuus (mg/ml)
Albumiini	35	50
Bilirubiini	0,01	0,15
Hemoglobiini	100	200
Triglyseridi	1,5	5

Plasmassa luontaisesti ilmenevä äidin genomisen DNA (gDNA) voi myös mahdollisesti häiritä määrityksen suorituskykyä, koska se voidaan eristää sikiön cfDNA:n ohella. Genomista DNA:ta lisättiin ei-kohdesikiön (XX-sikiö) äidin plasmasta eristettyyn cfDNA:han tasoilla 1,6, 3,3 ja 4,9 ng per näyte (mikä vastaa 1, 2 ja 3 keskihajontaa yli odotettua gDNA-pitoisuutta 7 vuorokauden kokoverinäytteen säilytyksen jälkeen¹²). Näytteet testattiin sitten VeriSeq NIPT Solution -järjestelmällä (n = 16 kunkin pitoisuuden osalta). Häiriöitä määrityksen suorituskyvyssä ei havaittu kohonneiden gDNA-tasojen läsnäollessa.

20 lääkepohjaista mahdollista häiritsevää ainetta (eksogeenisiä), joita käytetään tai määrätään yleisesti raskauden aikana, testattiin yhtä EP7-A2:ta kohden (häiritsevien aineiden testaus kliinisessä kemiassa, hyväksytty ohje, toinen painos [Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline-Second Edition]). 20 mahdollista häiritsevää ainetta yhdistettiin neljäksi pooliksi, joihin lisättiin ei-kohdesikiöjen (XX-sikiö) äidin plasmaa, ja ne testattiin VeriSeq NIPT Solution -järjestelmällä (N = 16 kunkin poolin osalta). Häiriötä määrityksen suorituskyvyssä ei havaittu näiden eksogeenisten aineiden läsnäollessa.

Taulukko 23 Mahdollisesti häiritsevät aineet (eksogeeniset)

Pooli 1	Pooli 2	Pooli 3	Pooli 4
Asetaminofeeni	Difenhydramiini	Albuteroli	Setiritsiini
Asetyylikysteiniini	Erytromysiini	Bupropioni	Dekstrometorfaani
Bisoprololi	Guaifenesiini	Kofeiini	L-askorbiinihappo
Sitalopraami	Hepariini	Sertraliini	Metoprololi
Desloratadiini	Lidokaiini	Natriumfluoridi	Nadololi

Määrityksen tunnistusraja

Määrityksen tunnistusraja (LOD) on se sikiöfraktion taso, joka vastaa 95 %:a kohdetilan, kuten T21:n, tunnistuksen todennäköisyydestä. VeriSeq NIPT Solution v2 -järjestelmän tunnistusrajan arvioimiseksi erilaisissa yleisissä tiloissa tehtiin tutkimuksia ja tilastollisia analyyssejä.

Kohdetilan tunnistuksen todennäköisyys VeriSeq NIPT Solution v2 -järjestelmällä käsitellystä kohdenäytteestä määräytyy ensisijaisesti kolmen tekijän perusteella:

- sikiöfraktio
- sekvensointisyvyys
- genomisen mielenkiintoalueen koko ja monimutkaisuus

Kun oletetaan sekvensointisyvyyden olevan vakio, tietty poikkeama on helpompi tunnistaa näytteestä, jossa on suurempi sikiöfraktioprosentti, kuin näytteestä, jossa sikiöfraktioprosentti on pienempi. Sitä vastoin kun oletetaan sikiöfraktion olevan vakio, tietty poikkeama on helpompi tunnistaa näytteestä, jossa on suurempi sekvensointisyvyys, kuin näytteestä, jossa sekvensointisyvyys on pienempi. Poikkeamat pienemmillä tai monimutkaisemmilla genomialueilla ovat vaikeampia tunnistaa kuin poikkeamat suuremmilla tai vähemmän monimutkaisilla genomialueilla, jos sikiöfraktio ja sekvensointisyvyys oletetaan vakioksi.

T21:n tunnistuksen tunnistusrajan (LOD) määrittämistä varten analysoitiin näytteitä, jotka koostuivat poolatuista T21-näytteistä ja poolatuista ei-kohdenäytteistä. Kahdentyyppiset analyytit sekoitettiin titraussarjassa, jotta saatiin luotua seitsemän sikiöfraktiotasoa (0, 2, 3, 4, 5, 6 ja 10 %). Kutakin tasoa edusti yhteensä 10 replikaattia.

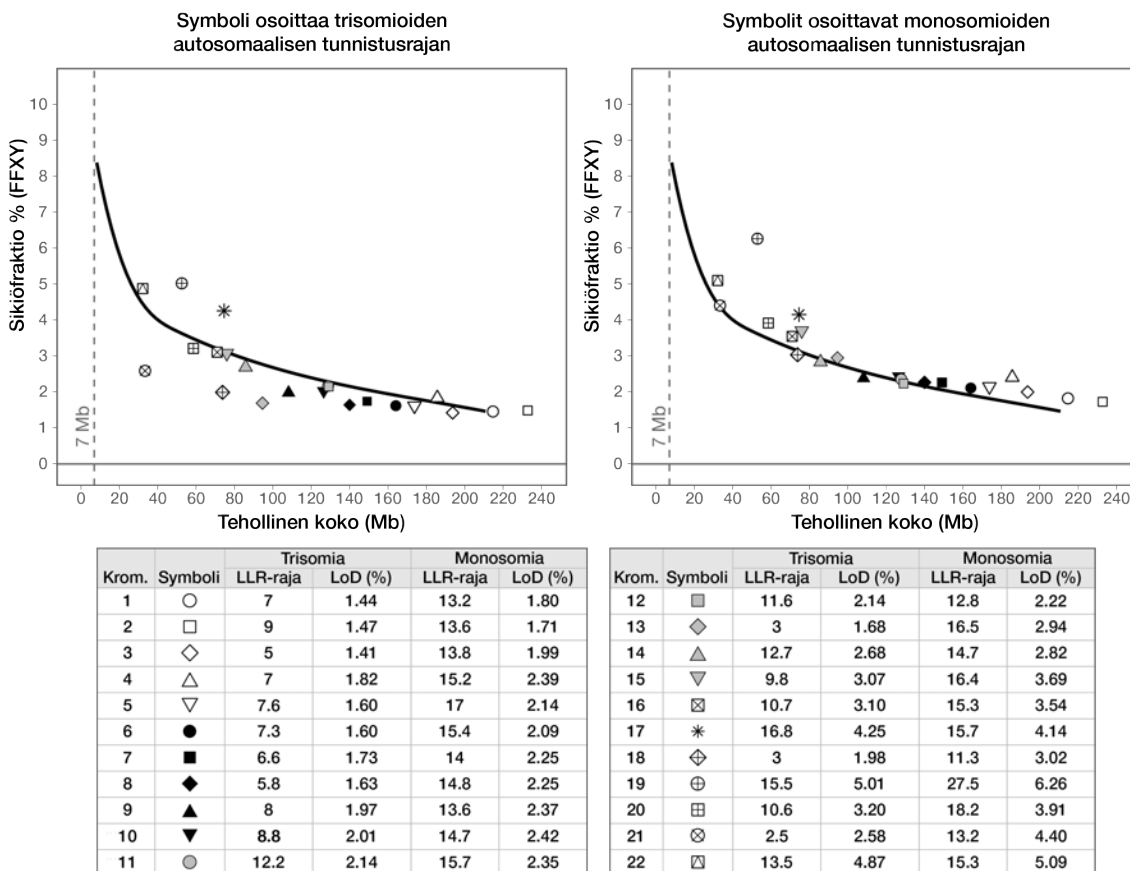
Jotta voitiin lisätä sikiöfraktiomatriisiin tarkkuutta tunnistusrajan analyysia varten, tämän tutkimuksen tietoihin lisättiin in silico -laimennuksesta saadut tiedot. Kokeellisen laimennuksen ja titrauksen vaikutuksia simuloitiin kontrolloidulla sekvensointitietojen sekoituksella. Tiedot tästä in silico -titrauksesta kattoivat 14

sikiöfraktiotasoa (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 ja 4,50 %) ja 32 replikaattia kullakin tasolla. Probit-analyysia käytettiin saatuihin tietoihin T21:n tunnistusrajan määrittämiseksi.

Minkä tahansa näytteen minkä tahansa poikkeaman tunnistustodennäköisyyden ennustamiseen kehitettiin erikseen tilastollinen malli käyttämällä sikiöfraktiota, sekvensointisyvyyttä ja genomien kokoa/monimutkaisuutta. Tämä malli määritettiin tiedoista, jotka vastasivat 1 405 XY-näytteen joukkoa. Tämän mallin ennustaman T21:n tunnistusrajan määritettiin olevan yhtäpitävä edellä kuvatun probit-pohjaisen arvion kanssa. Tällä tilastollisella mallilla arvioitiin tunnistusraja-arvot kaikkien autosomien aneuploidioiden ja osittaisten deleetioiden ja duplikaatioiden osalta.

Kuva 2 esittää 95 %:n tunnistustodennäköisyyden keskimääräisillä alueilla koon mukaan ja autosomaaliset tunnistusrajat kaikista trisomioista ja kaikista monosomioista.

Kuva 2 95 %:n tunnistustodennäköisyys keskimääräisillä alueilla koon mukaan käytettäessä VeriSeq NIPT Solution v2 -järjestelmää



Vianmääritys

VeriSeq NIPT Solution v2 -järjestelmän vianmääritys

Vikatila	Mahdollinen tulos	Tulkinta	Suosittelut toimenpiteet	Huomautuksia
Riittämätön lähdeplasman määrä	Näytteen laadunvalvontavika	Riittämätön plasman määrä.	Ota näyte uudelleen.	Perustuu plasman määrän visuaaliseen tarkastukseen.
Veriputken vika	Verta ei ole eroteltu kerroksiin	Näytettä ei sentrifugoitu.	Tarkista, että sentrifugi käynnistyi ja putkea pyöritettiin oikealla voimalla. Ota näyte uudelleen.	
		Virheellinen näytteen säilytys tai kuljetus (näytteen hemolyysi).	Ota näyte uudelleen.	Pakastetut näytteet eivät erkaannu. Virheelliset kuljetus- tai säilytysolosuhteet saattavat johtaa näytteiden hemolyysiin.

Vikatila	Mahdollinen tulos	Tulkinta	Suosittelut toimenpiteet	Huomautuksia
Näytetukos tai hidas virtaus	Plasmakontaminaatio	Yksittäiset näytteet voivat tukkia sidontalevyn, jos plasmanäytteessä on merkittävästi kontaminaatiota.	Tarkista näyte. Jos putkeen jäänyt plasma on punaista tai maitomaista, peruuta näyte ja pyydä uusi näyte. Jos näyte vaikuttaa normaalilta, testaa se uudelleen.	

Vikatila	Mahdollinen tulos	Tulkinta	Suosittelut toimenpiteet	Huomautuksia
	Näytteen ylivuoto	Riittämätön kunkin putken näytteen sopivuuden visuaalinen tarkastus.	Hylkää kaikki ylivuodon vaikutuksen alaiset näytteet läheisistä kuopista.	Saattaa merkitä, että näytteet kuljetettiin tai varastoitettiin virheellisesti ennen prosessointia. Älä sisällytä sopimattomia näytteitä käsittelyyn.
	Laitteiston toimintahäiriö	Riittämätön materiaalin käyttö uuton aikana.	Testaa näyte uudelleen. Jos ongelma ei häviä muiden näytteiden kuoppasijainnin osalta, ota yhteyttä Illuminan tekniseen tukeen.	

Vikatila	Mahdollinen tulos	Tulkinta	Suosittelut toimenpiteet	Huomautuksia
Yksittäisen näytteen analyysin laadunvalvontavika	Sekvensoinnin laadunvalvontavika	Mahdollisia syitä ovat seuraavat: <ul style="list-style-type: none"> • Riittämätön geneettinen lähdemateriaali • Siirtovirhe näytteen käsittelyssä • Sekvensointireagenssin vika 	Tarkista näytemerkintä. Tarkista, oliko aiempien näytteiden suorituskyky samanlaista suhteellisessa levysijainnissa. Testaa näyte uudelleen.	Osoittaa joko riittämätöntä näytteen syöttöä tai siirtovirhettä ML STAR -laitteessa. Riittämätön geneettinen materiaali voi olla peräisin riittämättömästä soluttomasta DNA:sta plasmassa tai solupohjaisesta DNA:sta, mikä aiheuttaa sekvensoitavan näytteen ylilaimennuksen.
	Matala sikiöfraktio tai ei-poissuljetut paikat (NES) -määrä	Tietoja generoitu riittämättömästi tarkkaa raportointia varten.	Testaa plasmasta uudelleen.	

Vikatila	Mahdollinen tulos	Tulkinta	Suosittelut toimenpiteet	Huomautuksia
Kvantifioinnin laadunvalvontavika	Kvantifiointiajo epäonnistui. Erän mediaani minimin alapuolella	Riittämätön prosessin tuotto.	Toista kvantifiointi. Jos toisto epäonnistuu, ota yhteyttä Illuminan tekniseen tukeen.	Jos vakiokäyremetriikkaa ei ohiteta, se on joko merkki kirjaston valmistelun ongelmasta (ts. muun kuin biologialuokan etanolin käytöstä) tai kvantifiointiprosessin ongelmista.
	Kvantifiointiajo epäonnistui	Vakiokäyrän vika.	Toista kvantifiointi. Jos toisto epäonnistuu, ota yhteyttä Illuminan tekniseen tukeen.	
Poolausvika	Näytteen poolauksen epäonnistuminen	Poolausanalyysi ei pysty laskemaan oikeita poolausmääriä.	Arvioi kohdepoolin pitoisuus uudelleen. Aja poolausanalyysi uudelleen.	

VeriSeq NIPT Microlab STAR -tuotteen vianmääritys

Prosessin vaihe	Virhekoodi	Virheikkuna	Kuvaus	Käyttäjän toimet
Erän luonti	EM0044	The Batch ID entered contains forbidden characters. (Annettu erätunniste sisältää kiellettyjä merkkejä.)	VeriSeq NIPT Solution v2 hyväksyy kaikkiin tietokenttiin vain numeroita, kirjaimia, alaviivoja ja väliviivoja.	Nimeä erä uudelleen käyttämällä nimeä, jossa ei ole erikoismerkkejä.
Erän luonti	EM0051	The Batch ID is greater than 36 characters in length. (Erätunniste on yli 36 merkkiä pitkä.)	VeriSeq NIPT Solution v2 rajoittaa erän nimien pituudeksi korkeintaan 36 merkkiä.	Nimeä erä uudelleen käyttämällä nimeä, jossa on korkeintaan 36 merkkiä.
Erän luonti	EM0076	Unable to connect to VeriSeq Onsite Server v2. (Ei voi muodostaa yhteyttä VeriSeq Onsite -palvelimeen).	VeriSeq Onsite Server v2 ei vastaa työnkulun hallinnan tietopyyntöihin.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Varmista, että ML STAR on yhdistetty verkkoon. 2. Varmista, että VeriSeq Onsite Server v2 -palvelimeen on kytketty virta. 3. Varmista, että ML STAR voi yhdistää VeriSeq Onsite Server v2 -palvelimeen (pingaamalla). 4. Tarkista imujätepullo. Jos jätepullo on yli puoliksi täynnä, tyhjennä se. 5. Jos edellä olevat toimet eivät ratkaise ongelmaa, ota yhteyttä Illuminan tekniseen tukeen.

Prosessin vaihe	Virhekoodi	Virheikkuna	Kuvaus	Käyttäjän toimet
Erän luonti	EM0118	This batch has been failed and cannot be further processed. (Tämä erä on epäonnistunut, eikä sitä voi käsitellä enempää.)	Määritetty erä on jo epäonnistunut, eikä sitä voi käsitellä enempää.	VeriSeq Onsite Server v2 -palvelimessa oleva erätietue osoittaa, että valittu erä on epäonnistunut. Lisäkäsittely ei ole sallittu. Luo toinen erä vaadituilla näytteillä.
Erän luonti	Ei sovelleta	Tämän erän käsittely on jo päättynyt. Haluaisitko poolata uudelleen?	Ilmoitettu erä on käsitelty poolaamalla. Ainoa sallittu käsittely on uudelleenpoolaus.	Uudelleenpoolaa seuraavalla tavalla. <ul style="list-style-type: none"> Valitse Re-Pool (Uusi poolaus). Keskeytä menetelmä ja varmista ennen uudelleenpoolausta, että erän nimi on oikea.
Plasman eristäminen	WP0087	Duplicate sample barcodes loaded. (Näytteillä sama viivakoodi.)	Järjestelmään on lisätty näytteitä, joilla on identtiset viivakoodit.	<ol style="list-style-type: none"> Noudata työnkulun hallinnan ohjeita, jotta tunnistat, millä näytteillä on sama viivakoodi. Poista duplikaatit ja merkitse ne uudelleen tai vaihda ne. Lisää näytteet uudelleen.
Plasman eristäminen	EP0102	Samples specified in the Sample Sheet were not loaded. (Näytearkissa määritettyjä näytteitä ei lisätty.)	Näytearkkiin sisällytettyjä näytteitä ei sisällytetty lisätyihin viivakoodeihin.	<ol style="list-style-type: none"> Noudata työnkulun hallinnan ohjeita, jotta tunnistat puuttuvat näytteet. Tee toinen seuraavista: <ul style="list-style-type: none"> Lisää puuttuvat näytteet erään ja lisää näytteet uudelleen. Keskeytä menetelmä, muokkaa näytearkkia tarpeen mukaan. Käynnistä menetelmä uudelleen.

Prosessin vaihe	Virhekoodi	Virheikkuna	Kuvaus	Käyttäjän toimet
Levyn lisäys	Ei sovelleta	Venus Barcode Mask Error. (Venus-viivakoodin peitevirhe).	Työnkulun hallinta valvoo oikeaa levyn ja erän yhteyttä käyttämällä Venus-viivakoodipeitteitä.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tarkista levyn sijoituksesta, että levyn asettelu on oikein. 2. Tarkista, että lisätty levy on kyseiselle erälle oikea levy.
cfDNA:n eristäminen	WE0150	Pressure in the vacuum chamber is too low. (Paine imukammiossa on liian pieni.)	Työnkulun hallinta ei etene, jos imuletkun tunnistama lepopaine on < 400 Torr.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tarkista, onko imuletkussa mutkia tai muita tukoksia. 2. Avaa jäteletkun vapautuskiinnikkeet, anna paineen vapautua ja tämän jälkeen sulje kiinnikkeet ja avaa ne uudelleen. 3. Tarkista, että imun ohjaimeen ja pumppuun on kytketty virta. 4. Jos ongelma jatkuu, ota yhteyttä Illuminan tekniseen tukeen.
cfDNA:n eristäminen	WE0153	Pressure in the vacuum chamber is too high. (Paine imukammiossa on liian suuri.)	Jos mitattu imupaine on liian suuri ennen paineenohjauksen käynnistämistä, järjestelmässä voi olla toimintahäiriö.	Tarkista ohjaimen takaa, että kaikki imuliitännät ja -letkut ovat tiukasti kiinni.

Prosessin vaihe	Virhekoodi	Virheikkuna	Kuvaus	Käyttäjän toimet
cfDNA:n eristäminen	WE0996	Vacuum failed to seal. (Imu ei sulkeutunut.)	Tiivistysvika pitää ratkaista ennen jatkamista.	<p>Varmista, että tiivistysvika on ratkaistu, ennen kuin valitset OK .</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Tarkista, että sidontalevy on tasaisesti imuputkistoa vasten. Paina sidontalevyä alaspäin voimakkaasti käsine kädessä. 2. Kuuntele imun huminaa ja huomioi veden virtaus sidontalevyn kautta. 3. Avaa Workflow Managerin jäljitysnäkymä. Kun todellisen paineen lukema saavuttaa vähintään 50 paineyksikköä vähemmän kuin ympäristön lukema, valitse OK jatkaaksesi cfDNA:n eristämistä. 4. Jos vaadittua painelukemaa ei saavuteta määritetyn ajan kuluessa, valitse OK jatkaaksesi ensimmäisen lyaatin lataamista. 5. Keskeytä menetelmä, kun lyaatti on annosteltu sidontalevylle. Asenna sidontalevy paikalleen ja paina alaspäin voimakkaasti. 6. Jos lyaatti ei virtaa levyn kautta, ota yhteyttä Illuminan tekniseen tukeen.

Prosessin vaihe	Virhekoodi	Virheikkuna	Kuvaus	Käyttäjän toimet
cfDNA:n eristäminen	WM0219	If Vacuum is on, manually rest the pump. (Jos imu on käytössä, aseta pumppu lepoon manuaalisesti.)	Imu voi pysyä käynnissä, kun menetelmä on keskeytetty eristämisen aikana.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sammuta imu painamalla imuohjaimesta virtapainiketta. 2. Odota 10 sekuntia ja kytke imu uudelleen käyntiin painamalla virtapainiketta uudelleen.
cfDNA:n eristäminen	EE0477	An error has occurred while moving a plate. (Levyn siirtämisen aikana on ilmennyt virhe.) (iSWAP-virhe)	Jos esiintyy iSWAP-virhe (levyn putoaminen, poimimisen epäonnistuminen jne.), järjestelmä kehottaa sinua siirtämään levyä manuaalisesti.	<p>Tarkista, että levyä voidaan käyttää (materiaalia ei ole läikkynyt).</p> <ul style="list-style-type: none"> • Jos levyä ei voi palauttaa, keskeytä ajo. • Jos levyn voi palauttaa, siirrä levy manuaalisesti näkyviin tulevien ohjeiden mukaan.
cfDNA:n eristäminen	EE0519	Scanned barcode does not match Binding Plate barcode on record. (Skannattu viivakoodi ei vastaa tiedoissa olevaa sidontalevyn viivakoodia.)	Lisätty sidontalevy ei vastaa poistetun levyn viivakoodia.	Varmista, että lisättävä levy vastaa kirjattua viivakoodia (katso odotettu viivakoodi jäljityslokista).

Prosessin vaihe	Virhekoodi	Virheikkuna	Kuvaus	Käyttäjän toimet
API	EA0372	Unable to connect to the data server. (Ei voi muodostaa yhteyttä datapalvelimeen.)	VeriSeq Onsite Server v2 ei vastaa työnkulun hallinnan tietopyyntöihin.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Varmista, että ML STAR on yhdistetty verkkoon. 2. Varmista, että VeriSeq Onsite Server v2 -palvelimeen on kytketty virta. 3. Varmista, että ML STAR voi yhdistää VeriSeq Onsite Server v2 -palvelimeen (pingaamalla).
	EA0774	Connection Error. (Yhteysvirhe) API-palvelimen yhteyttä ei voitu todentaa.	VeriSeq Onsite Server v2 ei vastaa työnkulun hallinnan tietopyyntöihin.	<p>Varmista seuraavat seikat:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Varmista, että ML STAR on yhdistetty verkkoon. 2. Varmista, että ML STAR voi yhdistää VeriSeq Onsite Server v2 -palvelimeen (pingaamalla). 3. Varmista, että VeriSeq Onsite Server v2 -palvelimeen on kytketty virta.
	EA0780	403: Invalid Request The current transaction is not valid. (403: Epäkelpoinen pyyntö. Nykyinen toimenpide ei kelpaa.)	Lähetetyt tiedot ovat järjestelmän työnkulun logiikan vastaisia.	<p>Katso lisätietoja virheen tiedoista. Yleisiä syitä ovat liian pitkät syötetyt tiedot tai sellaiset, joissa on käytetty ei-hyväksytyjä merkkejä.</p>

Lähdeviitteet

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

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

Versiohistoria

Asiakirja	Päivämäärä	Muutoksen kuvaus
Asiakirjanro 1000000078751 v08	Elokuu 2022	Päivitetty työnkulun osanumero Poistettu ohje sekoittaa pipetoimalla, jos kirjastolevy pakastettiin.
Asiakirjanro 1000000078751 v07	Toukokuu 2022	Jaettu menetelmän rajoitukset VeriSeq NIPT Solution v2 -raportointiin ja sisältämään kaksi ensimmäistä luettelomerkkiä. Jäljellä oleva teksti uudessa otsikossa Määrityksen rajoitukset. Poistettu <ul style="list-style-type: none">• VeriSeq kaikista reagenssin merkinnöistä.• Lisää levyn viivakoodi VeriSeq NIPT -sovitinlevyyn Kirjastojen valmistelussa. Lisätty <ul style="list-style-type: none">• Sana sertifioitu DNAasiton/RNAasiton -veteen.• Yksi seuraavista mikrolevylukijoista tai vastaava, ja SpectraMax M2, M3, M4, M5 sekä huomautus.• VeriSeq NIPT Microlab STAR -osaan selittämään, mitä pitää tehdä virheenkäsittelytapahtuman aikana.• Huomautus tarkistaa kuopat visuaalisesti.• Ohjeet 24 ja 48 näytteen erille protokollaosioiden kautta.• Ohjeet, milloin violettia sovitinlevyä tai vastaavaa pitää käyttää.• Tietoja Väestötiedot ja raskauden ominaisuudet -osioon sisältämään ensimmäisen raskauskolmanneksen tulokset.• Luettelomerkki syväkuoppalevyn teknisiin tietoihin sisältämään väännönkestävyyden. Päivitetty

Asiakirja	Päivämäärä	Muutoksen kuvaus
		<ul style="list-style-type: none"> • Yksilöllisiä erän nimiä koskevat tiedot selkeyden vuoksi ja sisältämään esimerkin. • Huomautuksien, huomioiden ja varoitusten symbolit ja muotoilu. • Testin aliluettelomerkkien tulokset. • Guanidiinitiosyanaatti guanidiinihydrokloridiksi. • CVS muotoon BVS (Basic Vacuum System, tyhjiöjärjestelmä) • Tietoja Genomewide (koko genomi) -näytön ja LLR-pisteiden käytöstä. • Tekniset tiedot: reagenssiputken tekniset tiedot, syväkuoppalevyt, 384-kuoppalevyt, 96-kuoppalevyt
Asiakirjanro 1000000078751 v06	Elokuu 2021	Päivitetty valtuutetun EU-edustajan osoite.
Asiakirjanro 1000000078751 v05	Joulukuu 2020	<p>Päivitetty toimenpiteen periaatteet, varoitukset ja varotoimet sekä tuotemerkinnät lisäselvennyksillä viranomaispyyntöjen täyttämiseksi.</p> <p>Pieniä sisältöpäivityksiä vastaamaan nykyistä Illuminan tyyliä ja organisaatiota.</p> <p>Korjattu kromosomin 21 kuvaus toiseksi pienimmästä ihmisen autosomista pienimmäksi ihmisen autosomiksi analyttisen suorituskyvyn Tarkkuus-osiossa.</p> <p>Lisätty varoituksia vääränlaisesta säiliöiden käytöstä ja näytteen yhdistymisestä Plasman eristämisen valmisteleminen- ja Tulosten tulkinta -osioihin.</p> <p>Lisätty uuden palvelimen ja ohjelmiston osanumerot uuden palvelinmallin ja ohjelmiston julkaisua varten.</p> <p>Lisätty varoituksia protokolla- ja vianmäärittäytietoihin näytteiden ylivuodon hoitamisesta ja estämisestä.</p> <p>Päivitetty lisävarustelaatikon sisältämän reagenssin vaikuttavat aineet DNA:n kvantifiointistandardiin käyttöturvallisuustiedotteen mukaisesti.</p> <p>Päivitetty Local Run Manager VeriSeq NIPT -moduulin nimeämiskäytänteet yhdenmukaisiksi muun dokumentaation kanssa.</p> <p>Lisätty versiohistoria.</p>
Asiakirjanro 1000000078751 v04	Lokakuu 2020	Pieniä korjauksia.

Asiakirja	Päivämäärä	Muutoksen kuvaus
Asiakirjanro 1000000078751 v03	Syyskuu 2020	Päivitetty materiaaliluetteloon laboratoriotarvikkeiden tekniset tiedot ja tunnetut yhteensopivat vaihtoehdot.
Asiakirjanro 1000000078751 v02	Helmikuu 2020	Päivitetty kliinisten suorituskykytietojen esitys, jotta perus- ja genominlaajuisen seulonnan väliset erot tulevat paremmin selville. Lisätty uusia eroja perus- ja genominlaajuisen seulonnan suorituskykytietoihin. Poistettu ristiriitaisia tietoja lisäraportin valinnaisuudesta Toimenpiteen periaatteet -osiosta. Päivitetty VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 -ohjelmiston nimeämiskäytänteet eri puolilla asiakirjaa tyylin yhdenmukaistamiseksi. Päivitetty Australian ja Illuminan Alankomaiden osoitteisiin viimeaikaiset muutokset.
Asiakirjanro 1000000078751 v01	Elokuu 2019	Poistettu tuplavaihe cfDNA:n eristämisestä, minkä aiheutti julkaisuohjelmiston virhe.
Asiakirjanro 1000000078751 v00	Toukokuu 2019	Ensimmäinen versio.

Patentit ja tavaramerkit

Tämä asiakirja ja sen sisältö ovat Illumina, Inc:n ja sen tytäryhtiöiden ("Illumina") omaisuutta, ja ne on tarkoitettu ainoastaan Illuminan asiakkaiden sopimuskäyttöön tässä kuvattujen tuotteiden käyttöön liittyen eikä mihinkään muuhun tarkoitukseen. Tätä asiakirjaa ja sen sisältöä ei saa käyttää tai jakaa missään muussa tarkoituksessa ja/tai välittää, paljastaa tai jäljentää millään muulla tavoin ilman Illuminalta ennakkoon saatua kirjallista lupaa. Illumina ei tällä asiakirjalla luovuta mitään käyttöoikeuksia sen patentti-, tavaramerki-, tekijänoikeus- tai tapaoikeuksien nojalla eikä vastaavien kolmansien osapuolten oikeuksien nojalla.

Tässä kuvattuja tuotteita saa käyttää vain pätevä ja asianmukaisesti koulutettu henkilökunta noudattamalla täsmällisesti tässä asiakirjassa annettuja ohjeita, jotta tuotteiden asianmukainen ja turvallinen käyttö voidaan taata. Asiakirjan sisältö on luettava ja ymmärrettävä kokonaisuudessaan ennen näiden tuotteiden käyttöä.

MIKÄLI TÄSSÄ ANNETTUJA OHJEITA EI LUETA JA TÄSMÄLLISESTI NOUDATETA, SEURAUKSENA VOI OLLA TUOTTEIDEN VAURIOITUMINEN, HENKILÖVAHINKOJA JOKO KÄYTTÄJILLE TAI MUILLE JA MUITA OMAISUUSVAHINKOJA, MINKÄ LISÄKSI TUOTTEITA MAHDOLLISESTI KOSKEVAT TAKUUT MITÄTÖITYVÄT.

ILLUMINA EI OLE VASTUUSSA TÄSSÄ KUVATTUJEN TUOTTEIDEN VÄÄRINKÄYTÖSTÄ (MUKAAN LUKIEN TUOTTEEN OSAT JA OHJELMISTO).

© 2022 Illumina, Inc. Kaikki oikeudet pidätetään.

Kaikki tavaramerkit ovat Illumina, Inc:n tai niiden vastaavien omistajien omaisuutta. Tarkemmat tavaramerkkitiedot annetaan osoitteessa www.illumina.com/company/legal.html.

Yhteystiedot



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, California 92122 U.S.A.

+1 800 809.ILMN (4566)

+1 858 202 4566 (Pohjois-Amerikan ulkopuolella)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com

CE
2797



Illumina Netherlands B. V.

Steenoven 19

5626 DK Eindhoven

Alankomaat

Rahoittaja Australiassa

Illumina Australia Pty Ltd

Nursing Association Building

Level 3, 535 Elizabeth Street

Melbourne, VIC 3000

Australia

Tuotteiden merkinnät

Katso tuotteen pakkauksessa ja merkinnöissä käytettyjen symbolien selitykset osoitteesta support.illumina.com käyttämäsi sarjan välilehdeltä *Documentation* (Dokumentaatio).

Tiivistelmä turvallisuudesta ja suorituskyvystä (SSP, Summary of Safety and Performance) on eurooppalaisen lääkinnällisten laitteiden tietokannan (Eudamed) käyttöönoton jälkeen osoitteessa

<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>. Se on yhdistetty yksilölliseen laitemallin tunnisteeseen (Basic UDI-DI, Basic Unique Device Identifier - Device Identifier) (0081627002NIPTRP).