

Листовка

ЗА IN VITRO ДИАГНОСТИЧНА УПОТРЕБА.

Предназначение

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

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

Обобщение и обяснение на анализа

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

Феталната анеуплоидия по отношение на хромозоми 21, 18, 13, X и Y може да бъде открита с висока степен на точност чрез неинвазивно пренатално тестване (NIPT, noninvasive prenatal testing), като се използва секвениране на целия геном на безклетъчна ДНК (cfDNA, cell-free DNA), получена от майчина плазма в 10-а гестационна седмица или по-късно. В скорошен метаанализ на множество клинични проучвания се съобщават следните претеглени пулирани проценти на откриваемост и специфичност за тризомия 21 и тризомия 18 при едноплодна бременност: тризомия 21 99,7% и 99,96% и тризомия 18

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

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

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

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

Принципи на процедурата

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

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

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

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

**ВНИМАНИЕ**

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

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

**ВНИМАНИЕ**

Бъдете изключително внимателни, за да избегнете кръстосано замърсяване на индексите, което може да доведе до неверни резултати.

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

- Оценка на феталната фракция на библиотеката чрез комбиниране на информация от разпределението както на дължините, така и на геномните координати на библиотечните фрагменти.
- След отчитане на известни отклонения статистическият модел открива региони на генома, които са под или са свръхпредставени в библиотеката по начин, съответстващ на аномалия при очакваното ниво на фетална фракция.
- Докладът за NIPT предоставя обобщени резултати за избраното тестово меню, където се отчита ANOMALY DETECTED (ОТКРИТА АНОМАЛИЯ) или NO ANOMALY DETECTED (НЕ Е ОТКРИТА АНОМАЛИЯ), заедно с оценка на феталната фракция за проби, преминаващи качествен контрол.
- Допълнителният доклад предоставя количествени показатели, които характеризират всяка открита аномалия.

Ограничения на процедурата

Ограничения на анализа

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

- Въз основа на литературните данни резултатите от скрининг на безклетъчна ДНК могат да бъдат объркани от определени фактори, свързани с майката и плода. Някои от тях са изброени по-долу, но не се ограничават до следното:
 - Скорошно преливане на кръв на майката
 - Предшестваща трансплантация на орган/трансплантация на стволови клетки на майката
 - Автоимунно заболяване на майката
 - Неоплазми при майката (доброкачествени и злокачествени)
 - Мозаицизъм при майката
 - Вариации в броя на копията при майката
 - Фетоплацентарен мозаицизъм/ограничен плацентарен мозаицизъм
 - Загиване на плода/изчезващ близък

Доклади на VeriSeq NIPT Solution v2

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

Компоненти на продукта

VeriSeq NIPT Solution v2 се състои от следните комплекти за подготовка на проби:

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

VeriSeq NIPT Solution v2 се състои от следните софтуерни компоненти:

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

- VeriSeq Onsite Server v2 (част № 20028403, 20047000, 20101927) или наличен VeriSeq Onsite Server (част № 15076164 или № 20016240), надграден до v2.
- VeriSeq NIPT Workflow Manager v2, (част № 20044988), предварително инсталиран на VeriSeq NIPT Microlab STAR.
 - VeriSeq NIPT Microlab STAR (част № Hamilton Company Reno: 95475-01 (115 V) и 95475-02 (230 V), Hamilton Company Bonaduz: 806288).
- Модул Local Run Manager VeriSeq NIPT (част № 20044989)

Реагенти

Предоставени реагенти

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

VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, Extraction Box (кутия за извличане)

Таблица 1 VeriSeq NIPT Extraction Box (24) и (48), част № 20025869 и 15066803

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

Таблица 2 VeriSeq NIPT Extraction Box (96), част № 15066807

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

VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, Library Prep Box (кутия за подготовка на библиотеки)

Таблица 3 VeriSeq NIPT Library Prep Box (24) и (48), част № 20026030 и 15066809

Име на реагента върху етикета	Брой контейнери в комплекта	Активни съставки	Съхранение
End Repair Mix (Смес за възстановяване на края)	1	ДНК полимераза и dNTPs в буфериран воден разтвор	-25°C до -15°C
A-Tailing Mix (A-Tailing смес)	1	ДНК полимераза и dATP в буфериран воден разтвор	-25°C до -15°C
Ligation Mix (Лигираща смес)	1	ДНК лигаза в буфериран воден разтвор	-25°C до -15°C
Hybridization Buffer (Буфер за хибридизация)	1	Буфериран воден разтвор	-25°C до -15°C
NIPT DNA Adapter Plate (ДНК адаптерна плака за NIPT)	1	Олигонуклеотиди в буфериран воден разтвор	-25°C до -15°C

Таблица 4 VeriSeq NIPT Library Prep Box (96), част № 15066810

Име на реагента върху етикета	Брой контейнери в комплекта	Активни съставки	Съхранение
End Repair Mix (Смес за възстановяване на края)	1	ДНК полимераза и dNTPs в буфериран воден разтвор	-25°C до -15°C
A-Tailing Mix (A-Tailing смес)	2	ДНК полимераза и dATP в буфериран воден разтвор	-25°C до -15°C
Ligation Mix (Лигираща смес)	2	ДНК лигаза в буфериран воден разтвор	-25°C до -15°C
Hybridization Buffer (Буфер за хибридизация)	1	Буфериран воден разтвор	-25°C до -15°C
NIPT DNA Adapter Plate (ДНК адаптерна плака за NIPT)	1	Олигонуклеотиди в буфериран воден разтвор	-25°C до -15°C

VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, Accessory Box (кутия с принадлежности)

Таблица 5 VeriSeq NIPT Accessory Box, част № 15066811

Име на реагента върху етикета	Брой контейнери в комплекта	Активни съставки	Съхранение
DNA Binding Plate (Плака за свързване на ДНК)	1	Пропиленова микроплака с модифицирана силиконова мембрана	2°C до 8°C
Resuspension Buffer (Буфер за ресуспендиране)	1	Буфериран воден разтвор	2°C до 8°C
Sample Purification Beads (Топчета за пречистване на проби)	1	Твърдофазни парамагнитни топчета в буфериран воден разтвор	2°C до 8°C
DNA Quantification Reagent (Реагент за количествено определяне на ДНК)	1	ДНК интеркалиращо багрило в DMSO (диметилсулфоксид)	2°C до 8°C
DNA Quantification Standard (Стандарт за количествено определяне на ДНК)	1	dsDNA стандарт, неспецифична ДНК и натриев азид в буферен воден разтвор	2°C до 8°C

VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, работни епруветки и етикети

Таблица 6 Работни епруветки и етикети, част № 15071543

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

Реагенти, които не са предоставени

Необходими реагенти, не са предоставени

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

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

Реагенти по избор, не са предоставени

- Фосфатно-буфериран солен разтвор на Дюлбеко (DPBS) за контрола без шаблон (NTC)

Съхранение и обработка

1. Стайната температура се определя като температура между 15°C и 30°C.
2. Всички реагенти са само за еднократна употреба. След като реагентите са подготвени за употреба, те трябва да се използват незабавно.
3. Ако някоя от опаковките или съдържанието на компонентите на разтвора VeriSeq NIPT Solution са повредени или компрометирани, се свържете с отдела за обслужване на клиенти на Illumina.
4. Реагентите са стабилни, когато се съхраняват, както е посочено, до посочения срок на годност върху етикетите на комплектите. За условията на съхранение вижте колоната „Съхранение“ в таблиците в раздел „Реагенти“. Не използвайте реагенти с изтекъл срок.
5. Промените във физическия вид на предоставените реагенти могат да показват влошаване на качеството на материалите. Ако настъпят промени във физическия вид (напр. очевидни промени в цвета на реагента или помътняване, което е очевидно при микробно замърсяване), не използвайте реагентите.

6. Спазвайте следните най-добри практики при работа с топчета за пречистване на проби:
 - Никога не замразявайте топчетата.
 - Преди употреба оставете топчетата да достигнат стайна температура.
 - Непосредствено преди употреба разбъркайте топчетата, докато се суспендират добре и цветът стане хомогенен.
7. Буферът за лизис, промивният буфер I, промивният буфер II, буферът за елуиране и протеиназният буфер могат да образуват видими утайки или кристали. Преди употреба разбъркайте с енергично завихряне и след това проверете визуално дали няма утайки.
8. Никога не замразявайте цяла кръв след вземането ѝ.
9. Секвенирайте библиотеките възможно най-скоро след пулиране. Пулираните библиотеки са стабилни до седем дни при -25°C до -15°C. Не е необходима допълнителна денатурация, ако се съхранява за този период от време при тези условия.

Оборудване и материали

Необходимо оборудване и материали, не са предоставени

Необходимо оборудване, което не е предоставено

Оборудване	Доставчик
Система за секвениране от следващо поколение (NGS) със следните възможности: <ul style="list-style-type: none"> • 2 x 36 bp секвениране на сдвоени краища • Съвместим с двойноиндексните адаптери на VeriSeq NIPT Sample Prep Kit • Автоматично създаване на BCL файлове • Двуканална химия • 400 млн. разчитания на сдвоени краища на серия; • Съвместимо с VeriSeq NIPT Assay Software v2 или NextSeq 550Dx Sequencing System. 	Доставчик на инструменти или Illumina, част № 20005715
Фризер, от -25°C до -15°C	Общ лабораторен доставчик
Микроцентрифуга	Общ лабораторен доставчик
Помощни пипети	Общ лабораторен доставчик
Хладилник, от 2°C до 8°C	Общ лабораторен доставчик
20 µl едноканални пипети	Общ лабораторен доставчик

Оборудване	Доставчик
200 µl едноканални пипети	Общ лабораторен доставчик
1000 µl едноканални пипети	Общ лабораторен доставчик
Завихрящ миксер	Общ лабораторен доставчик
Центрофуга и ротор за епруветки за вземане на кръв	
<p>Еквивалентно:</p> <ul style="list-style-type: none"> Хладилна центрофуга с капацитет 1600 x g с опция за работа без спирачки Ротор с люлеещи се кофички Вложки за кофички с минимална дълбочина 76 mm Адаптерни вложки за поставяне на 16 mm x 100 mm епруветки за вземане на кръв 	Общ лабораторен доставчик
<p>Препоръчано:</p> <ul style="list-style-type: none"> Центрофуга Allegra X12R Series, 1600 g Центрофуга Allegra GN-3.8 ротор с кофички Капази за кофички на центрофуга Allegra, комплект за две Адаптер за центрофуга Allegra, 16 mm, комплект от четири 	<p>Beckman Coulter, артикул № 392304 (120 V или 230 V)</p> <p>Beckman Coulter, артикул № 369704</p> <p>Beckman Coulter, артикул № 392805</p> <p>Beckman Coulter, артикул № 359150</p>
Центрофуга и ротор за микроплаки	
<p>Еквивалентно:</p> <ul style="list-style-type: none"> Центрофуга с капацитет 5600 x g Ротор с въртящи се плочи с носачи за 96-ямкови плаки, 76,5 mm минимална дълбочина. Multifuge X4 Pro-MD 120 V TX-1000BT Центрофуга Sorvall Legend XTR 	<p>Общ лабораторен доставчик</p> <p>Thermo Fisher Scientific № 75016034 Thermo Fisher Scientific, каталожен № 75004521 (120 V) или каталожен № 75004520 (230 V)</p>

Оборудване	Доставчик
<ul style="list-style-type: none"> Ротор за микроплаки HIGHPlate 6000 Ротор High Plate 6000 Опорна основа за микроплаки <ul style="list-style-type: none"> Препоръчано: <ul style="list-style-type: none"> Опорна основа за MicroAmp 96-ямкова Носач за 96-ямкови PCR плаки 	Thermo Fisher Scientific, каталожен № 75003606 Thermo Scientific VWR каталожен № 97040-244 Thermo Fisher Scientific, каталожен № 4379590 Thermo Fisher Scientific, каталожен № AB-0563/1000
Един от следните четци за микроплаки или еквивалент, (флуорометър) със SoftMax Pro v6.2.2 – 7.1.2: <ul style="list-style-type: none"> Gemini XPS SpectraMax M2, M3, M4 и M5. <ul style="list-style-type: none"> Лилавата вложка е задължителна с четеца за микроплаки за употреба в работния процес. 	Molecular Devices, част № XPS Molecular Devices, част № M2, M3, M4 и M5
SpectraMax високоскоростно USB, сериен адаптер	Molecular Devices, част № 9000-0938
Термоциклер със следните спецификации: <ul style="list-style-type: none"> Затоплящ се капак Температурен диапазон от 4°C до 98°C ±2°C температурна точност 2°C в секунда минимална скорост на нарастване съвместим с 96-ямкова PCR плака Twin.tec, с цял борд 	Общ лабораторен доставчик
VeriSeq NIPT Microlab STAR	Hamilton, част № 95475-01 (115 V), част № 95475-02 (230 V) или част № 806288 (за Hamilton Company Bonaduz)
VeriSeq Onsite Server v2 или надстроен VeriSeq Onsite Server	Illumina, част № 20028403 или 20047000 (v2) или 20101927 или №15076164 или № 20016240 (надстроена)
Ако използвате NextSeq 550Dx Sequencing System: <ul style="list-style-type: none"> NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5, 75 цикъла 	Illumina, част № 20028870

Незадължително оборудване, не е предоставено

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

Необходими материали, не се предоставят

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

Консуматив	Доставчик
<p>Ваничка за реагенти със следните спецификации:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ваничка, която се поставя стабилно, но без натиск, в носача на VeriSeq NIPT Microlab STAR с конусовидно дъно и минимален капацитет 20 ml. • Полипропилен, който не съдържа RNase/DNase. • Вътрешните размери на резервоара (ниво на течността) генерират нива на течността, използвайки обеми на реагента за анализ, които са съвместими с автоматизираните стъпки за аспириране и дозиране на VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Размерите на височината са съвместими с автоматичните движения на VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	<p>Съвместими ванички:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Illumina Reagent Tub, част № 20095418
<p>Плаки с дълбоки ямки със следните спецификации:</p> <ul style="list-style-type: none"> • SLAS 1–2004, 3–2004 и 4–2004 микроплаки с 96 ямки с конично или пирамидално дъно и минимална вместимост на ямката 2 ml. • Прозрачен полипропилен с предпочитание за материал с ниско свързване с ДНК за всички контактни повърхности на пробата. • Размерите на ямките генерират ниво на течности, съвместимо с автоматизираните стъпки на аспириране и дозиране на VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Борд на плаката, който позволява поставянето на баркодовете на плаките в необходимата позиция със сигурно залепване върху равна повърхност. • Устойчива на въртящ момент рамка, която може да издържи минимум 5600 × g. • Височината на плаките е съвместима с автоматичните движения на VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	<p>Общ лабораторен доставчик</p> <p>Съвместими плаки:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, част № 0030505301 • Eppendorf, част № 30502302 • USA Scientific, част № 1896-2000

Консуматив	Доставчик
<p>384-ямкова плака със следните спецификации:</p> <ul style="list-style-type: none">• 384-ямкова микроплака, оптимизирана за ниски обеми, с минимална вместимост на ямката 50 µl.• Черен непрозрачен полистирен с блокиране на светлината и ниско ниво на свързване на ДНК за всички контактни повърхности на пробата.• Размерите на ямките генерират нива на течност, съвместими с автоматизираните стъпки на аспириране и дозиране на VeriSeq NIPT Microlab STAR.• Височината на плаките е съвместима с автоматичните движения на VeriSeq NIPT Microlab STAR.• Борд на плаката, който позволява поставянето на барковете на плаките в необходимата позиция със сигурно залепване върху равна повърхност.	<p>Общ лабораторен доставчик</p> <p>Съвместими плаки:</p> <ul style="list-style-type: none">• Corning, продукт № 3820

Консуматив	Доставчик
<p>96-ямкова плака със следните спецификации:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Микроплака с устойчива на въртящ момент рамка, издържаща на минимум 5600 x g, и 96 полупрозрачни ямки с конусовидно дъно, повдигнати ръбове и минимална вместимост на ямката от 150 µl. • Полипропилен, който не съдържа RNase/DNase и има ниско ниво на свързване на ДНК за всички контактни повърхности на пробата. • Размерите на ямките генерират нива на течност, съвместими с автоматизираните стъпки на аспириране и дозиране на VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Височината на плаките е съвместима с автоматичните движения на VeriSeq NIPT Microlab STAR. <p>ЗАБЕЛЕЖКА: Съвместими пластмасови изделия с различни номера на части, например съвместими 96-ямкови плаки от различни производители, може да не са директно взаимозаменяеми без специфично за частта калибриране на системата VeriSeq NIPT Microlab STAR от сервизния персонал и персонала по поддръжката на Illumina. За смяна на пластмасовите изделия се консултирайте с екипа по поддръжката на Illumina.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Борд на плаката, който позволява поставянето на барковете на плаките в необходимата позиция със сигурно залепване върху равна повърхност. • Съвместимост с термоциклери за денатуриране. 	<p>Общ лабораторен доставчик</p> <p>Съвместими плаки:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, част № 0030129512 • Eppendorf, част № 30129580 • Eppendorf, част № 30129598 • Eppendorf, част № 30129660 • Eppendorf, част № 30129679 • Bio-Rad, част № HSP9601
<p>Една от следните пломби:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Фолио Microseal 'F' • Пломби от фолио 	<p>Bio-Rad, каталожен номер MSF1001 Beckman Coulter, позиция № 538619</p>
cfDNA BCT CE	Streck, каталожен номер 218997
Капачки с притискане	Sarstedt, заявка № 65.802
Епруветки от 2 ml с капачки на винт	Общ лабораторен доставчик
Филтърни крайници от 20 µl за пипетор от 20 µl	Общ лабораторен доставчик
Филтърни крайници от 200 µl за пипетор от 200 µl	Общ лабораторен доставчик

Консуматив	Доставчик
Филтърни накрайници от 1000 µl за пипетор от 1000 µl	Общ лабораторен доставчик
Еквивалентно: <ul style="list-style-type: none"> • Спрей за бърза дезинфекция на алкохолна основа • Разтвор на дезинфекциращ препарат Препоръчано: <ul style="list-style-type: none"> • Дейонизирана вода и 70% етанол 	Общ лабораторен доставчик

Незадължителни материали, не са предоставени

Консуматив	Доставчик
Фосфатно-буфериран солен разтвор на Дюлбеко (DPBS) за контрола без шаблон (NTC)	Общ лабораторен доставчик
Епруветка, винтова капачка, 10 ml (само за контролни проби)	Sarstedt, поръчка № 60.551
Епруветка, винтова капачка, 50 ml	Общ лабораторен доставчик
25 ml серологични пипети	Общ лабораторен доставчик
10 ml серологични пипети	Общ лабораторен доставчик

Събиране, транспортиране и съхранение на спесимени

ВНИМАНИЕ

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

- Спесимени на цяла кръв от 7 – 10 ml трябва да се събират в ВСТ с безклетъчна ДНК на Streck. Да не се замразява.
- Транспортирането на цяла кръв трябва да отговаря на всички приложими разпоредби за транспортиране на етиологични агенти. Препоръчват се методи за ускорена доставка/транспорт.
- По време на транспортиране съхранявайте при температура между 4°C и 30°C. След получаване на пробите съхранявайте при температура от 2°C до 8°C до готовност за работа. Времето между вземането на кръв и първоначалното изолиране на плазмата не трябва да надвишава 5 дни.
- В случай че е необходимо повторно тестване, пробите след обработката могат да бъдат повторно затворени и съхранявани при 4°C за още 5 дни (общо до 10 дни след вземането на кръвта).

**ВНИМАНИЕ**

Излагането на повишени температури над гореспоменатите диапазони може да окаже отрицателно въздействие върху процента неуспеваемост на отделните проби и/или върху характеристиките на пробите.

Предупреждения и предпазни мерки

- Този анализ съдържа протеиназа К. Телесни наранявания могат да настъпят при вдишване, поглъщане, контакт с кожата и очите. Използвайте на добре проветриво място, носете защитно облекло, избягвайте вдишването на прах и изхвърляйте всички контейнери и неизползваното съдържание в съответствие с приложимите държавни стандарти за безопасност.
- Този анализ съдържа гуанидинов хлорид. Може да възникнат наранявания в резултат на вдишване, поглъщане, контакт с кожата и контакт с очите. Използвайте на добре проветриво място, носете защитно облекло и изхвърляйте всички контейнери и неизползваното съдържание в съответствие с приложимите местни държавни стандарти за безопасност.
- Този анализ съдържа 2-пропанол – запалим химикал. Да се пази от топлина и открит огън. Може да възникнат наранявания в резултат на вдишване, поглъщане, контакт с кожата и контакт с очите. Използвайте на добре проветриво място, носете защитно облекло и изхвърляйте всички контейнери и неизползваното съдържание в съответствие с приложимите местни държавни стандарти за безопасност.
- Този анализ съдържа диметилсулфоксид – корозивна и запалима течност. Може да възникнат наранявания в резултат на вдишване, поглъщане, контакт с кожата и контакт с очите. Използвайте на добре проветриво място, носете защитно облекло и изхвърляйте всички контейнери и неизползваното съдържание в съответствие с приложимите местни държавни стандарти за безопасност.
- За да се предотврати образуването на вредни газове, не изхвърляйте отпадъците от екстракцията на cfDNA (съдържат гуанидинов хидрохлорид) с отпадъци, съдържащи белина (натриев хипохлорит).
- Работете с всички проби така, сякаш съдържат потенциално инфекциозни агенти.
- Използвайте обичайните лабораторни предпазни мерки. Не пипетирайте с уста. Не яжте, не пийте и не пушете в определените работни зони. Носете ръкавици за еднократна употреба и лабораторни престилки при работа с проби и реагенти за анализ. Измийте внимателно ръцете си след работа с проби и реагенти за анализ.
- Не използвайте никакви компоненти за анализ след изтичане на срока им на годност, посочен на етикета на кутията за анализ. Не разменяйте компоненти на анализи от различни партии на анализи. Партидите на анализа са посочени върху етикета на кутията на анализа. Съхранявайте компонентите на анализа при определената температура.
- За да се предотврати разграждането на пробата или реагента, се уверете, че всички изпарения от почистването с натриев хипохлорит са се разсеяли напълно, преди да започнете протокола.

- Неспазването на описаните процедури може да доведе до грешни резултати или до значително влошаване на качеството на пробата.
- Незабавно докладвайте за всички сериозни инциденти, свързани с този продукт, на Illumina и на компетентните органи на държавите членки, в които са се установили потребителят и пациентът.
- За информация относно околната среда, здравето и безопасността вижте информационните листове за безопасност (ИЛБ) на адрес support.illumina.com/sds.html.

Процедурни бележки

Избягване на замърсяване

- Използвайте нови крайници и нови лабораторни консумативи.
- Използвайте устойчиви на аерозоли крайници за намаляване риска от пренасяне и кръстосано замърсяване между пробите.
- Поради възможността за замърсяване вземете специални мерки, за да гарантирате, че съдържанието на ямките остава изцяло в ямките. Не разплисквайте съдържанието. Центрофугирайте след всеки етап на завихряне.
- Спазвайте приложимите регламенти за правилна лабораторна практика и хигиена при работа с кръв и кръвни производни.
- Не използвайте аерозолни спрейове за избелване при подготовка на библиотеката. Следи от замърсяване с белина могат да доведат до неуспешен анализ.
- Когато разпечатвате плаки, внимателно поставете плаката върху твърда, равна повърхност, като я държите здраво. Бавно отстранете уплътнението, като внимавате то да не влезе в контакт с откритите ямки. Внимавайте да не докосвате откритите ямки и да не нарушавате съдържанието. Кръстосаното замърсяване от ямка в ямка може да доведе до неверни резултати.

Почистване на плочата на VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Проверете чистотата на плочата преди употреба. Поне веднъж седмично извършвайте ежеседмична поддръжка и следвайте следните инструкции за почистване.
- Извадете всички незареждащи се носители и ги почистете със спрей за бърза дезинфекция на алкохолна основа, дейонизирана вода и 70% етанол и ги оставете да изсъхнат. Ако са силно замърсени, след това ги накиснете в разтвор на дезинфекциращ препарат, изплакнете с дезинфектант на алкохолна основа и ги оставете да изсъхнат.
- Отворете предния капак и избършете плочата с кърпа, напоена с дейонизирана вода и 70% етанол. По-специално трябва да проверите чистотата на плъзгащите се блокове.

- Свалете колектора на вградената вакуумна система (BVS, Basic Vacuum System) и почистете колектора, уплътнението и вътрешните отделения на BVS с кърпа. Избягвайте да почиствате уплътнението с етанол, тъй като това може да доведе до крехкост на материала.
- Почистете отпадъците от крайници за главата CORE 96 и независимия канал.
- Свалете плочата за изхвърляне на крайници с независим канал на станцията за отпадъци и я почистете: пръснете дейонизирана вода и 70% алкохол директно върху повърхността и избършете. Издърпайте нова найлонова торбичка върху рамката и я закрепете отново. Поставете плочата за изваждане на чисти крайници обратно на мястото ѝ.
- Пръснете дейонизирана вода и 70% алкохол директно върху повърхността на кутията за отпадъци и улея за глави CORE 96 и избършете.
 - Ако е трудно да се отстранят натрупванията от отпадъците на крайниците, избършете с кърпа, намокрена с вода без DNase/RNase, докато се отстранят натрупванията. Изхвърлете кърпата по подходящ начин. Продължете да стерилизирате с дезинфектант на алкохолна основа.
- Намокрете кърпа без власинки или памучен тампон със 70% етанол. Почистете прозорчето на лазерния скенер на баркод четеца. Със същата кърпа или тампон почистете всяка ямка на адаптера за плаки CPAC. Ако използвате кърпа, натиснете кърпата във всяка ямка на адаптера с обратната страна на химикалката, за да се уверите, че вътрешността на ямката е добре почистена.
- Почистете независимите канали:
 - При независимите канали почистете ръкава за изхвърляне на крайници (външната част на каналите за пипетиране) с кърпа без власинки, напоена с дейонизирана вода и 70% етанол. (Вижте *Справочно ръководство за Hamilton Microlab STAR.*)
 - Почистете спирателния диск и О-пръстените на главата за пипетиране (външната част на каналите за пипетиране) с кърпа без власинки, напоена с дейонизирана вода и 70% етанол.
- Почистете главата на CORE 96:
 - С помощта на същата кърпа без власинки, напоена с дейонизирана вода и 70% етанол, почистете корпуса на главата 96 и долната част на спирателните дискове.
 - Като използвате същата кърпа или откъсната от нея лента, напоена с дейонизирана вода и 70% етанол, прокарайте кърпата по страните на пипетните канали на главата 96, за да почистите О-пръстените. Повторете тази процедура за всеки пипетирания канал на главата 96.
- Напръскайте предния и страничния капак с дейонизирана вода и 70% етанол и избършете до сухо.
- Почистете с кърпа защитната лента за автоматично зареждане, напоена с дейонизирана вода и 70% етанол, и избършете, без да упражнявате натиск.
- Когато плочата и компонентите са напълно сухи, поставете носачите на мястото им.

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

Качествен контрол

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

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

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

Инструкции за употреба

Съвети и техники

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

Плаки за поставяне на баркод

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

Запечатване и разпечатване на плаката

- Бъдете изключително внимателни, за да избегнете кръстосано замърсяване – не трябва да има видима течност от долната страна на уплътнението.
 - Уверете се, че откритата долна страна на уплътнението не влиза в контакт с откритите ямки.
 - Внимавайте да не докосвате откритите ямки.
- Винаги запечатвайте 96-ямковата плака преди следващите стъпки в протокола:
 - Стъпки на центрофугата
 - Стъпки на термоциклера
- За да запечатате плаката, поставете запечатващото фолио върху плаката и след това запечатайте. Уверете се, че върху цялата плака се прилага натиск и че уплътнението е прилепнало плътно върху всяка отделна ямка.
- Преди да разпечатате плаката, изпълнете следното:
 - Центрофугирайте за кратко 96-ямковата плака при 1000 × g за 20 секунди.

- Поставете плаката върху равна повърхност и след това бавно отстранете уплътнението.

VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Преди употреба извършете и документируйте необходимата поддръжка в съответствие с инструкциите на производителя.
- Наблюдавайте ML STAR по време на автоматизираните стъпки. Наблюдавайте интерфейса на софтуера VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 за подкани и инструкции за оператора.
- По време на работа дръжте предния капак на мястото му.
- По време на работа поддържайте плочата свободна от всички предмети.
- Ако по време на събитие за обработка на грешки ви бъде представен бутон **Exclude** (Изключване), при никакви обстоятелства не избирайте тази опция. Ако методът не може да продължи след събитието за обработка на грешки и имате ограничени възможности за обработка на грешки, прекъснете изпълнението.
- По време на етапите на вакуумиране на плаката, ако това се изисква от VeriSeq NIPT Workflow Manager v2, ръчно помогнете за формиране на уплътнението между плаката и вакуумния колектор.
- Позволете на системата автоматично да изхвърля крайниците от адаптера. Не премахвайте ръчно крайниците, освен ако софтуерът не ви подкани да сторите това.
- Отстранете изразходваните реагенти и използваните консумативи, както е указано от Workflow Manager (Мениджър на работния поток).
- Ежедневно изпразвайте вакуумните бутилки за отпадъци. Първата бутилка не трябва да се пълни повече от 1/2. Преливането на вакуумни отпадъци може да повреди вакуумната помпа и да намали прилагания вакуум в системата.
- За партии от 24, 48 и 96 проби заредете пълна стойка с индивидуално преброени 8-канални крайници, преди да започнете метода.

Обработка на проби

Процедура

1. Изпълнете следните стъпки за всяка аликвотна част:
 - a. Центрофугирайте обозначените с баркод проби при 1600 × g за 10 минути при 4°C с изключена спиралка.
 - b. Извадете епруветките с пробите, когато центрофугата спре напълно. Започнете изолирането на плазмата в рамките на 15 минути след центрофугиране. Ако изминат повече от 15 минути, центрофугирайте отново.
2. Проверете всяка епруветка за пригодност на пробата, като потвърдите следното:
 - Обемът на пробата е според очакванията.
 - След центрофугиране се вижда ясно разделение между еритроцитния и плазмения слой на пробите.

- Нивото на плазмата е поне 1,5 ml над буфеираната обвивка.
- Пробата не е силно хемолизирана (т. е. плазмата не е тъмночервена на вид).
- Пробата не е липемична (т.е. плазмата не е мътнобяла или млечнонепрозрачна на вид).
- Пробата не се съсирва.



ВНИМАНИЕ

Пробите, които са били неправилно съхранявани или обработвани, могат да станат негодни. Ако в работния поток се обработват неподходящи проби, те могат да запушат плаката за свързване по време на екстракцията и да причинят преливане на пробата в съседните ямки.

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



ВНИМАНИЕ

Ако по време на събитие за обработка на грешки се появи опцията Exclude (Изключване), не я избирайте. Ако методът не може да продължи след събитието за обработка на грешки и имате ограничени възможности за обработка на грешки, прекъснете изпълнението.

Изолиране на плазма

Подготовка

1. Етикетирайте 1 нова плака с дълбоки ямки за междинна плазма и нанесете баркода.
2. Етикетирайте 1 нова плака с дълбоки ямки за крайна плазма и нанесете баркода.
3. За партиди от 24, 48 и 96 проби заредете пълна стойка с индивидуално преброени 8-канални крайници, преди да започнете метода.



ВНИМАНИЕ

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

Процедура

1. Отворете AppLauncher и след това изберете **VeriSeq NIPT Method**.
2. Въведете идентификатора на партидата и потребителското име, след което изберете **OK**
Идентификаторът на партидата може да съдържа ≤ 26 символа. Използвайте само цифри, букви, долни черти () или тирета (-). Например: 2025-10-16_Batch3.
Идентификаторът на партидата не е чувствителен към малки и големи букви. Идентификатори на партиди, които са чувствителни към главни и малки букви, не се считат за уникални.

Имената на партидите трябва да са уникални и да не се различават само по главните букви. Така например имената на партиди Batch01 и batch01 не са уникални. Същото правило важи и за именуването на идентификатори на проби.

3. Изберете **New Batch** (Нова партида).
4. След стартирането изберете **OK**, за да започнете изолиране на плазмата.
5. Изберете размера на партидата, след което изберете **OK**.
6. Изберете броя на контролите без шаблон (NTC, no template controls), след което изберете **OK**. NTC слотовете винаги се избират последни. Например, с два NTC в серия с 24 проби, позиции 23 и 24 са NTC.
7. Изпълнете една от следните стъпки:
 - За да заредите съществуваща бланка с проби, изберете бланката с проба, свързана с партидата, и след това изберете **OK**.
 - За да продължите без да избирате съществуваща бланка с проба, изберете **No Sample Sheet** (Няма бланка с проба).

За информация относно създаването на бланка с проба вижте *Ръководство за софтуера на VeriSeq NIPT Solution v2 (документ № 1000000067940)*.

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

8. Потвърдете, че всички баркодове са поставени, след което заредете пробите, крайниците и плаките в носача (баркодът да сочи надясно).
9. Изберете **OK** след всяко подканяне за зареждане.

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

10. Уверете се, че носачите, лабораторните съдове и реагентите са заредени правилно.
11. На екрана за проверка Pre-Spin Deck Verification (Проверка на плочата преди завъртане), изберете **OK**.
12. Наблюдавайте как ML STAR изпълнява автоматизираните стъпки.
13. Когато бъдете подканени от Workflow Manager (Мениджър на работния поток), се уверете, че зареждащата плоча на ML STAR няма никакви препятствия, за да позволи на ML STAR да разтовари носачите.
14. Изберете **Unload** (Разтоварване) за разтоварване на плочата.
15. Отстранете плаката с дълбоки ямки за междинна плазма както следва.

- a. Проверете плаката за постоянни обеми във всяка ямка (без грешки с пипета). Очакваният обем е 1000 µl.
 - b. Запишете всички несъответствия, когато процедурата за изолиране на плазмата приключи.
 - c. Запечатайте плаката, поставете баланс и центрофугирайте при 5600 × g за 10 минути с изключена спирачка или поставена на най-ниска степен.
16. Изберете **Yes** (Да), за да продължите към финалния етап на приготвяне на плазмата.
17. Отстранете уплътнението на плаката и поставете отново плаката върху носача.

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

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

БЕЗОПАСНА ТОЧКА ЗА СПИРАНЕ

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

Екстракция на cfDNA**Подготовка**

1. Прегледайте визуално кутиите за екстракция и аксесоари, за да потвърдите, че срокът на годност на комплекта не е изтекъл.
2. Подгответе посочените по-долу реагенти. Етикетирайте ваничките и резервоарите с дълбоки ямки с името на реагентите.

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

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

**ВНИМАНИЕ**

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

5. Пулирайте приготвената протеиназа К от всички флакони във ваничка за реагенти и я етикетирайте като протеиназа К.
6. Добавете по 100 ml 100% EtOH към всяка бутилка с реактив за промивен буфер II.
 - Подгответе 1 бутилка за 24 и 48 проби.
 - Подгответе 2 флакона за 96 проби.
7. Обърнете бутилките с промивен буфер II, за да се смесят.
8. Маркирайте квадратчетата за отметка в бутилките с промивен буфер II.
9. Етикетирайте 1 нова междинна плака с цял борд и нанесете баркода на плаката.
10. Етикетирайте 1 нова плака с цял борд за елуиране на cfDNA и нанесете баркода на плаката.
11. Етикетирайте 1 нова плака с дълбоки ямки за междинна екстракция и нанесете баркода на плаката с дълбоки ямки.

12. Нанесете баркода на плаката за свързване на ДНК.
13. Запечатайте с фолио неизползваните ямки за партидите с 24 и 48 проби.
14. Пригответе почистващ разтвор на 70% EtOH (70% EtOH, 30% вода без DNase/RNase) за почистване на вакуумната система.
15. Подгответе вакуумната система както следва.
 - a. Свалете вакуумния колектор и го почистете със 70% EtOH.
Избягвайте да почиствате уплътнението с EtOH, тъй като това може да доведе до крехкост на материала.
 - b. Изхвърлете вакуумния отпадък.
 - c. Уверете се, че вакуумната система ML STAR е включена.

Процедура

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



ВНИМАНИЕ

Преди да стартирате метода за партиди от 24, 48 и 96 проби, добавете пълна стойка с 8-канални накрайници.

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

4. Заредете преброените накрайници в носачите, както следва.

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

- Въведете местоположението на първия и последния накрайник за всяка стойка за накрайници и след това изберете **OK**.
- Сканирайте баркодовете на кутиите за извличане.
- Въведете потребителското име или инициалите на лицето, приготвило реагента, след което изберете **OK**.
- Сканирайте баркодовете на кутиите за принадлежности.
- Въведете потребителското име или инициалите на лицето, приготвило реагента, след което изберете **OK**.
- Потвърдете, че баркодовете са поставени.
- Разпечатайте плака за крайна плазма с дълбоки ямки, ако е необходимо.
- Заредете плаките (с баркод, обърнат надясно) върху носача на плаката, както следва, и след това изберете **OK**.

Размер на партидата на пробата	Тип носач	Проследяване	Артикул	Позиция на мястото
24, 48, 96	Multiflex	19 – 24	Нова плака с цял борд, междинна, с баркод	1
			Нова плака с цял борд, елуиране на cfDNA, с баркод	2
			Нова плака с дълбоки ямки, междинно извличане, с баркод	4
			Дълбокоямкова плака за крайна плазма, с баркод	5

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

16. Преди да поставите плаката за свързване върху колектора на BVS, визуално огледайте ямките за евентуални препятствия.
Това може да попречи на потока на реагентите, докато са под вакуум.
17. Ако използвате партиди от 24 или 48 проби, покрийте неизползваните ямки и ги запечатайте с фолио. Изберете полето за отметка **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (Запечатани ли са колоните на плаката за свързване на ДНК?) и след това изберете **ОК**.
18. Заредете ваничките с реагенти върху носача за реагенти, както следва, и след това изберете **ОК**.

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

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

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

21. Изчакайте автоматизираната проверка на обема на реагента да завърши.
22. Уверете се, че вакуумните отпадъци са празни (препоръчително е наполовина пълно) и след това изберете **ОК**.

23. Потвърдете разположението на всички носачи, лабораторни съдове и реагенти и след това изберете **OK** на екрана за проверка на екстракционната плоча.
24. Наблюдавайте ML STAR по време на автоматизираните стъпки.

**ВНИМАНИЕ**

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

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

40. Изберете **Unload** (Разтоварване) за разтоварване на плочата.
41. Разтоварете всички носачи и почистете плочата ML STAR, след което изберете **OK**.
42. Въведете коментари за засегнатите ямки и след това изберете **OK**.
43. Изпълнете една от следните стъпки:
 - За да продължите да подготвяте библиотеки, изберете **Yes** (Да).
 - За да спрете, изберете **Exit** (Изход).

БЕЗОПАСНА ТОЧКА ЗА СПИРАНЕ

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

Приготвяне на библиотеки

Подготовка

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

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

**ВНИМАНИЕ**

При разпечатване на ДНК адаптерната плака за NIPT, бъдете изключително внимателни, за да избегнете кръстосано замърсяване с аерозол между ямките, което може да доведе до неверни резултати.

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

Разреждане на ензими

1. Комбинирайте A-Tailing смес и буфер за ресуспендиране в епруетка с винтова капачка. Разбъркайте чрез завихряне, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко.

Размер на партидата на пробата	A-Tailing смес (µl)	Буфер за ресуспендиране (µl)
24, 48	900	1200
96	1800	2400

2. Комбинирайте лигираща смес и буфер за ресуспендиране в епруетка с винтова капачка. Разбъркайте чрез завихряне, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко.

Размер на партидата на пробата	Лигираща смес (µl)	Буфер за ресуспендиране (µl)
24, 48	230	1713
96	440	3278

Процедура

1. Изберете **OK**, за да започнете подготовка на библиотека. Ако **VeriSeq NIPT Method** вече не е в отворено състояние:
 - a. Отворете AppLauncher и изберете **VeriSeq NIPT Method**.
 - b. Въведете идентификатора на партидата и потребителското име, след което изберете **OK**.
2. Уверете се, че следните консумативи са подготвени, както е посочено на екрана Reagent Preparation (Подготовка на реагенти):
 - A-Tailing Mix (A-Tailing смес), Ligation Mix (Лигираща смес) и 80% EtOH.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

14. Запазете останалата част от 12 ml буфер за хибридизация (HT1) в контейнера за пулиране.
15. Уверете се, че носачите, лабораторният инвентар и реагентите са заредени правилно, и след това изберете **OK** на екрана Library Deck Verification (Проверка на плочата за библиотеки).
16. Изчакайте автоматизираната проверка на обема на реагента да завърши.
17. Наблюдавайте ML STAR по време на автоматизираните стъпки.
18. Когато бъдете подканени от мениджъра на работния процес (Workflow Manager), се уверете, че зареждащата плоча на ML STAR няма никакви препятствия, за да позволи на ML STAR да разтовари носачите.
19. Изберете **Unload** (Разтоварване) за разтоварване на плочата.
20. Инспектирайте плаката за библиотеки за консистентност на обемите във всяка ямка.



ВНИМАНИЕ

Ако обемите в ямките са несъответстващи, пробите може да не преминат автоматичен контрол на качеството.

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

БЕЗОПАСНА ТОЧКА ЗА СПИРАНЕ

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

Количествено определяне на библиотеки**Подготовка**

1. Подгответе следните реагенти:

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

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

Процедура

1. Изберете **OK**, за да стартирате количественото определяне.
2. Ако VeriSeq NIPT Method още не е отворен:
 - a. Отворете AppLauncher и изберете **VeriSeq NIPT Method**.
 - b. Въведете идентификатора на партидата и потребителското име, след което изберете **OK**.
3. Сканирайте баркодовете на кутиите за принадлежности.
4. Въведете потребителското име или инициалите на лицето, приготвило реагента, след което изберете **OK**.

5. Заредете накрайниците в носача за накрайници, както следва, и след това изберете **ОК**.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

24. Разтоварете всички носачи.
25. Почистете плочата ML STAR, след което изберете **OK**.



ВНИМАНИЕ

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

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

Анализ

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

7. Оценете резултатите и продължете по описания по-долу начин.
 - Ако резултатите отговарят на спецификацията, преминете към [Библиотеки с пулове на стр. 42](#). За спецификациите вижте таблицата с количествени метрики за качествен контрол и граници в *Ръководство за софтуера на VeriSeq NIPT Solution v2 (документ № 1000000067940)*.
 - Ако резултатите не отговарят на спецификацията, системата прекъсва метода. Повторете процедурите за количествено определяне, като започнете от [Подготовка на стр. 38](#).
8. Изпълнете една от следните стъпки:
 - За да продължите към [Библиотеки с пулове на стр. 42](#), изберете **Yes** (Да).
 - За да спрете, изберете **Exit** (Изход).

БЕЗОПАСНА ТОЧКА ЗА СПИРАНЕ

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

Библиотеки с пулове

Подготовка

1. Подгответе следните реагенти:

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

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

Процедура

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

ЗАБЕЛЕЖКА За партии от 24 проби може да се наложи да се увеличат концентрациите на пулиране и/или обемите на пулиране, за да се поддържат сходни плътности на клъстерите, получени при партии от 48/96 проби.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

15. На екрана Pooling Deck Verification (Проверка на плочата за пулиране) изберете **ОК**.

16. Наблюдавайте ML STAR по време на автоматизираните стъпки.

17. Въведете коментари за засегнатите ямки и след това изберете **OK**.
18. Когато бъдете подканени от Workflow Manager (Мениджър на работния поток), се уверете, че върху зареждащата плоча на ML STAR няма никакви препятствия, за да позволи на ML STAR да разтовари носачите.
19. Изберете **Unload** (Разтоварване) за разтоварване на плочата.
20. Разтоварете носача на епруветки.
21. Затворете всяка епруветка за пулиране, разбъркайте и след това центрофугируйте за кратко.
22. Изберете **OK**.
23. Секвенирайте библиотеките възможно най-скоро след пулиране. Запечатайте плаката за библиотеки и я съхранявайте при температура от -25°C до -15 °C в продължение на до 7 дни, за да се даде възможност за повторно пулиране.

БЕЗОПАСНА ТОЧКА ЗА СПИРАНЕ

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

Приготвяне на пулирани библиотеки за секвениране

Подготовка

1. Подгответе следните реагенти:

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

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



ВНИМАНИЕ

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

За повече информация относно използването на Local Run Manager VeriSeq NIPT Module вижте *Ръководство за софтуера на VeriSeq NIPT Solution v2 (документ №1000000067940)*.

Процедура

1. Комбинирайте следните обеми към касетата с реагент и след това разбъркайте с пипета.
 - Буфер за хибридизация (900 µl)
 - 450 µl пул А (450 µl)
2. Продължете със секвенирането, като използвате справочното ръководство за вашия инструмент за секвениране от следващо поколение. За NextSeq 550Dx вижте *Справочно ръководство за инструмента NextSeq 550Dx (документ № 1000000009513)* (или вижте приложимата листовка, както е посочено на страницата за поддръжка на Illumina www.support.illumina.com).
3. Потвърдете правилната конфигурация за серията, когато бъдете подканени.
4. Ако е необходимо, повторете тази процедура за пул В.
 - За да се постигне целевият диапазон на плътност на клъстерите, плаката за библиотека може да се пулира повторно, като се използва различна концентрация за пулиране на Hamilton. Повторното пулиране отменя първоначалния пул.
 - Алтернативно, съотношението на пула към HT1 (450 µl + 900 µl) може да се промени, за да се постигне целевият диапазон на плътност на клъстерите.

Секвениране от следващо поколение

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

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

NextSeq 550Dx е съвместим с VeriSeq NIPT Solution v2.

Анализ на данните за секвениране

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

Тълкуване на резултатите

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

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

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

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

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

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

ЗАБЕЛЕЖКА Когато всички проби в дадена партида имат един и същ докладван пол, потребителят ще бъде предупреден за смесване/замърсяване на пробата чрез известие за грешка по имейл/в уеб-базирания интерфейс. Партидата ще бъде анулирана и няма да бъде изготвен доклад. (Приложимо за сървърен софтуер VeriSeq NIPT Solution v2, версия 2.2 и по-нова.)

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

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

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

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

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



ВНИМАНИЕ

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

Функционални характеристики

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

	NextSeq 500/550	NextSeq 550Dx
Софтуер за инструменти	NextSeq Control Software 4.0	NextSeq Operating Software 1.3
Версия на комплекта с реагенти	NextSeq 500/550 High Output v2.5 (75 cycle) Reagent Kit	NextSeq 550Dx High Output v2.5 (75 cycle) Reagent Kit
Метод на секвениране	Изпълняване на секвениране на 2x36 сдвоени краища в режим на висока производителност	Изпълняване на секвениране на 2x36 сдвоени краища в режим на висока производителност

Клинично проучване

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

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

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

Демографски данни и характеристики на бременността

Възрастта на майката, гестационната възраст и тримесечието на [Таблица 7](#) за пробите в пълногеномния скрининг, включително известните проби с мозаицизъм. По-голямата част (98%) от пробите за изследване са от първия триместър на бременността.

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

Таблица 7 Демографски данни и характеристики на бременността

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

* Представените окончателни проби съдържат 7 близнаци.

Клинична ефективност

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

секвениране от следващо поколение (NGS). Обучен персонал на проучването извърши класификация на данните от клиничния референтен стандарт в съответствие с документа за медицинско кодиране на спонсора.

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

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

Изпълнение на основен скрининг

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

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

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

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

Ефективност на пълногеномния скрининг

При пълногеномния скрининг всяка аномалия включва тризомии, монозомии и частични делеции или дупликации с размер 7 Mb или повече. Пробите за пълногеномния скрининг съдържат 36 проби с известен мозаицизъм. Изследвани са общо 2307 едноплодни и двуплодни проби. Всичките седем двуплодни бременности са правилно определени като притежаващи аномалията на хромозома 21 и не са отчетени в следващите таблици.

Ефективност на пълногеномния скрининг за всяка аномалия

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

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

Ефективност на пълногеномния скрининг за редки автозомни анеуплоидии

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

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

Ефективност на пълногеномния скрининг за частични делеции и дупликации

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

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

Разлики в ефективността на основния и пълногеномния скрининг

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

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

Включване на мозайки в пълногеномния скрининг

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

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

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

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

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

При всички проби резултатът LLR за класификацията на цялата хромозома е наличен в допълнителния доклад. Резултатът за LLR трябва да бъде прегледан по отношение на посочената граница на [Фигура 2](#), преди да се тълкува резултатът. Например резултат от CNV, при който резултатите за LLR на ниво хромозома, надвишаващи граничната стойност, осигуряват допълнителна подкрепа за тълкуване, съответстващо на анеуплодия на цялата хромозома, вижте [Таблица 12](#) като пример.

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

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

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

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

Полови хромозоми

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

Таблица 13 Процентно съвпадение за класификация на пола на плода*

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

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

** Други цитогенетични резултати са XXXXX и XXY.

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

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

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

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

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

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

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

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

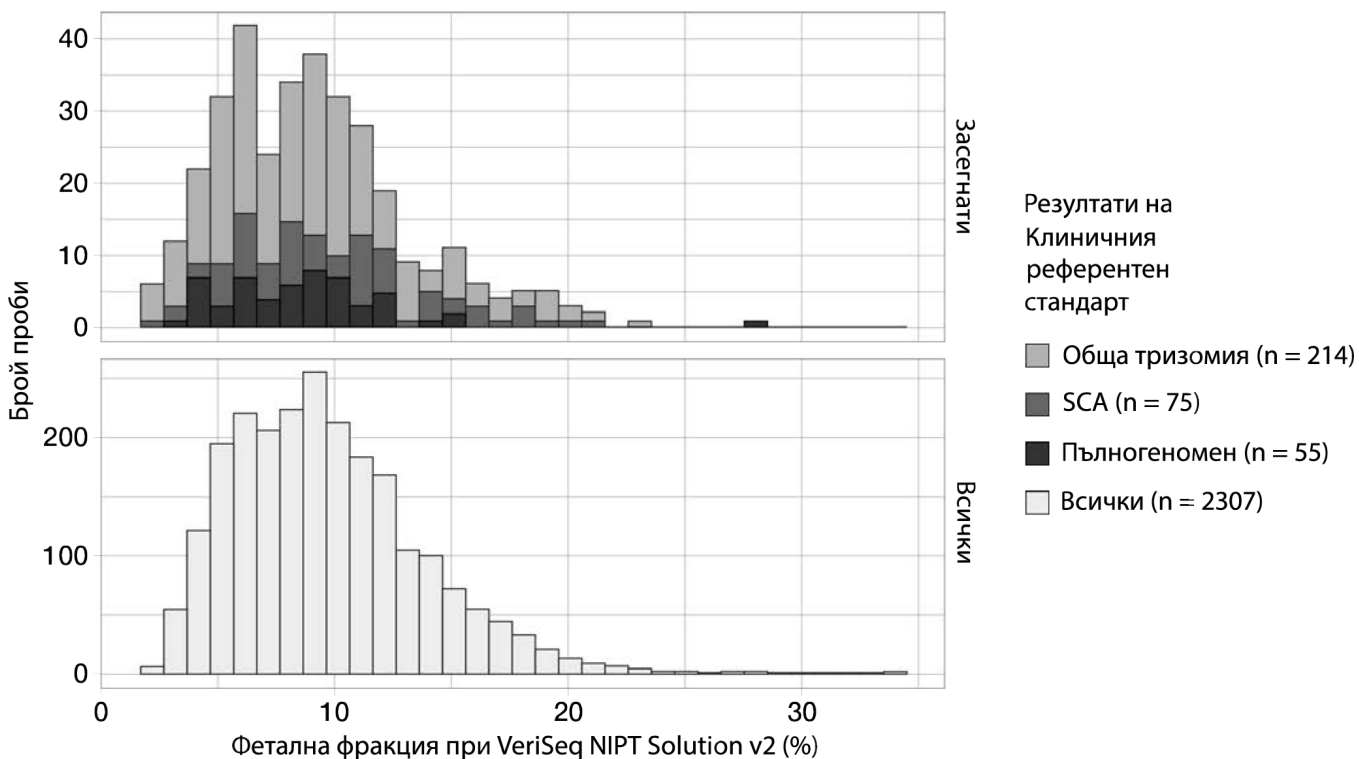
Таблица 17 Разпространение на всички аномалии, PPV и NPV при пълногеномния скрининг (включително известните мозайки)

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

Разпределение на феталната фракция

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

Фигура 1 Разпределение на феталната фракция



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

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

Характеристики при двуплодна бременност

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

Поради ниската честота на тризомия 21, 18 и 13 при двуплодна бременност за клиничното проучване бяха налични само малък брой засегнати проби от близнаци. За да се оцени ефективността на VeriSeq NIPT Solution v2 при двуплодни бременности, бяха използвани *in silico* модели, основани на наблюденията от клинични проби, за да се симулират популации от двуплодни бременности. Тази симулация съответства на популацията за определената употреба. Разпределението на феталната фракция е определено от около 4500 проби от близнаци и е сравнено с разпределението от около 120 000 проби от едноплодни бременности. Разпределението на феталната фракция в зависимост от състоянието на анеуплоидията е определено от предполагаеми едноплодни отговори (1044 тризомии 21, 307 тризомии

18 и 192 тризомии 13). Комбинирането на двете разпределения позволи да се направят изводи за откриване на анеуплоидии при близнаци. Симулирани са набори от двуйайчни и еднотайчни близнаци, а за оценка на чувствителността е взета среднопретеглена стойност, която отразява преобладаващото им разпространение в популацията, за която е предназначена употребата (2 двуйайчни: 1 еднотайчен). За да се постигне специфичност, са симулирани набори от незасегнати близнаци.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Аналитична ефективност

Прецизност

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

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

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

Възпроизводимостта за условия, които не са описани по-горе, не е оценена като част от проучванията.

Пулът от 5% фетална фракция T21 е създаден чрез комбиниране на cfDNA, извлечена от майчина плазма от бременни жени (със засегнат от T21 плод), и cfDNA, извлечена от плазма от небременни жени.

Създаден е също и пул от 10% майчина-мъжка cfDNA фетална фракция (XY фетус). Панелът от проби за всяко проучване за всеки цикъл включва 4 повторения от пула от проби от 5% фетална фракция със засягане от T21 и 20 повторения от пула от 10% фетална фракция от майчина и мъжка cfDNA. Тестовите са проведени в продължение на 10 дни, като общо за двете проучвания са направени 21 тестувания.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Кръстосано замърсяване

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

Потенциално интерфериращи вещества

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

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

Таблица 22 Потенциално интерфериращи вещества (ендогенни)

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

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

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

Таблица 23 Потенциално интерфериращи вещества (екзогенни)

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

Граница на откриване (LOD, Limit of Detection)

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

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

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

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

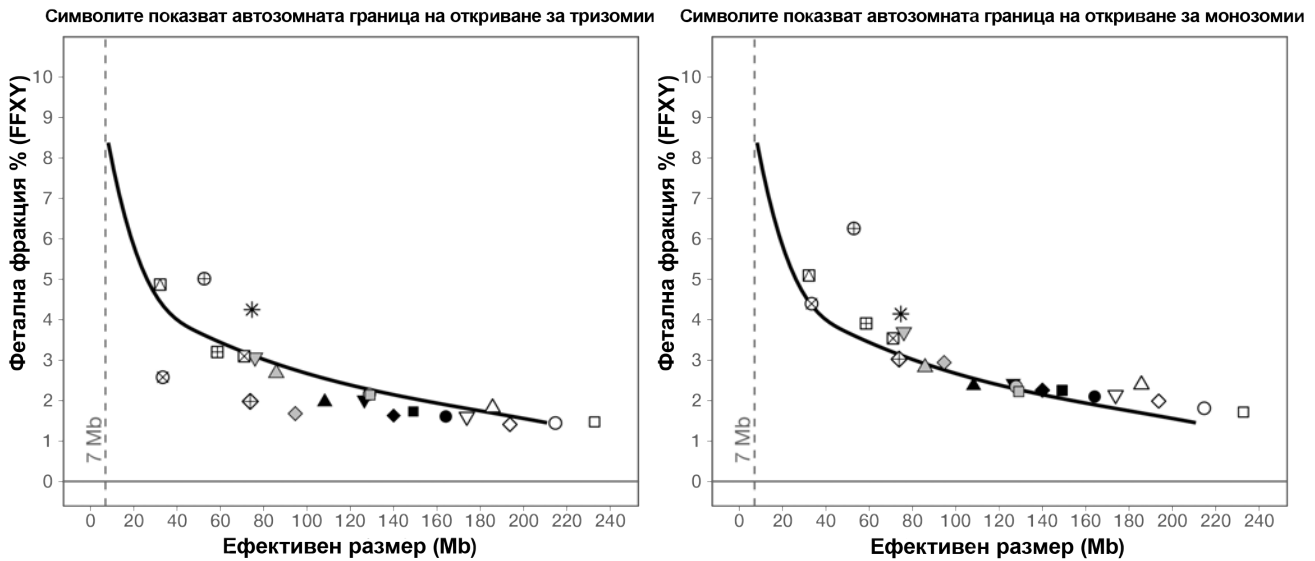
За да се определи LOD за откриване на T21, са анализирани проби, включващи смеси от пулирани проби с T21 и пулирани незасегнати проби. Двата вида анализ се смесват в серия от титрувания, за да се създаде набор от седем нива на фетална фракция (0, 2, 3, 4, 5, 6 и 10%). Всяко ниво е представено от общо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

За да се повиши допълнително разделителната способност на решетката на феталната фракция на LOD-анализа, данните от това проучване са допълнени с данни, получени от разреждане *in silico*. Резултатите от експерименталното разреждане и титруване са симулирани чрез контролирано смесване на данните от секвенирането. Данните от това *in silico* титруване обхващат набор от 14 нива на фетална фракция (1,25, 1,50, 1,75, 2,00, 2,25, 2,50, 2,75, 3,00, 3,25, 3,50, 3,75, 4,00, 4,25 и 4,50%) с 32 повторения за всяко ниво. Към получените данни е приложен пробит анализ, за да се определи границата на откриване (LOD) за T21.

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

Фигура 2 показва 95% вероятност за откриване за средни региони по размер и автозомните граници на откриване за всички тризомии и всички монозомии. Гранична стойност за CNV LLR от 15,1.

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



Chr	Символ	Тризомия		Монозомия	
		Отсечка за LLR	LoD (%)	Отсечка за LLR	LoD (%)
1	○	7	1,44	13,2	1,80
2	□	9	1,47	13,6	1,71
3	◇	5	1,41	13,8	1,99
4	△	7	1,82	15,2	2,39
5	▽	7,6	1,60	17	2,14
6	●	7,3	1,60	15,4	2,09
7	■	6,6	1,73	14	2,25
8	◆	5,8	1,63	14,8	2,25
9	▲	8	1,97	13,6	2,37
10	▼	8,8	2,01	14,7	2,42
11	○	12,2	2,14	15,7	2,35

Chr	Символ	Тризомия		Монозомия	
		Отсечка за LLR	LoD (%)	Отсечка за LLR	LoD (%)
12	■	11,6	2,14	12,8	2,22
13	◇	3	1,68	16,5	2,94
14	△	12,7	2,68	14,7	2,82
15	▽	9,8	3,07	16,4	3,69
16	⊠	10,7	3,10	15,3	3,54
17	*	16,8	4,25	15,7	4,14
18	⊕	3	1,98	11,3	3,02
19	⊕	15,5	5,01	27,5	6,26
20	⊠	10,6	3,20	18,2	3,91
21	⊗	2,5	2,58	13,2	4,40
22	⊠	13,5	4,87	15,3	5,09

Отстраняване на неизправности

Отстраняване на неизправности на VeriSeq NIPT Solution v2

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

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

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

Режим на неизправност	Възможен резултат	Тълкуване	Препоръчително действие	Забележки
Неуспешно количествено определяне на качествения контрол	Неуспешно количествено определяне. Медиана на партидата под минимума	Недостатъчна производителност на процеса.	Повторете количествения анализ. Ако повторението е неуспешно, свържете се с техническата поддръжка на Illumina.	Неуспешното преминаване на метриките на кривата на стандартите показва проблем с подготовката на библиотеката (т.е. използване на етанол от небиологичен клас) или проблеми с процеса на количествено определяне.
	Неуспешно количествено определяне	Неуспех при стандартната крива.	Повторете количествения анализ. Ако повторението е неуспешно, свържете се с техническата поддръжка на Illumina.	
Неуспешно пулиране	Неуспешно завършване на пулирането на пробите	Анализът на пулирането не може да изчисли правилните обеми на пула.	Направете преоценка на целевата концентрация на пула. Повторете анализа на пулирането.	

Отстраняване на неизправности във VeriSeq NIPT Microlab STAR

Стъпка от процеса	Код за грешка	Диалогов прозорец за грешки	Описание	Резолюция на потребителя
Създаване на партиди	EM0044	The Batch ID entered contains forbidden characters. (Въведеният идентификатор на партидата съдържа забранени символи.)	VeriSeq NIPT Solution v2 приема само цифри, букви, долни тирета и тирета за всички полета с данни.	Преименувайте партидата, като използвате име, което не съдържа специални символи.
Създаване на партиди	EM0051	The Batch ID is greater than 36 characters in length. (Дължината на идентификатора на партидата надвишава 36 знака.)	VeriSeq NIPT Solution v2 ограничава дължината на имената на партидите до 36 знака или по-малко.	Преименувайте партидата, като използвате наименование, съдържащо по-малко от 36 знака.
Създаване на партиди	EM0076	Unable to connect to VeriSeq Onsite Server v2 (Невъзможност за свързване с VeriSeq Onsite Server v2)	VeriSeq Onsite Server v2 не отговаря на заявките за данни от Workflow Manager (Мениджър на работния поток).	<ol style="list-style-type: none"> 1. Уверете се, че ML STAR е свързан към мрежата. 2. Уверете се, че VeriSeq Onsite Server v2 е включен. 3. Проверете дали ML STAR може да се свърже с VeriSeq Onsite Server v2 (чрез заявка за ping). 4. Ако предходните стъпки не решат проблема, свържете се с отдела за техническа поддръжка на Illumina.

Стъпка от процеса	Код за грешка	Диалогов прозорец за грешки	Описание	Резолюция на потребителя
Създаване на партиди	EM0118	This batch has been failed and cannot be further processed. (Тази партида е неуспешна и не може да бъде обработвана по-нататък.)	Посочената партида вече е била неуспешна и не може да бъде обработвана по-нататък.	Записът на партидата във VeriSeq Onsite Server v2 показва, че избраната партида е неуспешна. Не се разрешава допълнителна обработка. Създайте друга партида с необходимите проби.
Създаване на партиди	Not applicable (Не е приложимо)	This batch has already completed processing. Would you like to repool? (Обработката на тази партида вече е приключила. Искате ли да извършите повторно пулиране?)	Посочената партида е обработена чрез пулиране. Единствената допустима обработка е повторно пулиране.	Пулирайте повторно по следния начин. <ul style="list-style-type: none"> Изберете Re-Pool (Повторно пулиране). Прекратете метода и се уверете, че името на партидата е правилно, преди да извършите повторно пулиране.
Изолиране на плазма	WP0087	Duplicate sample barcodes loaded. (Заредени са дублиращи се баркодове на проби.)	В системата са заредени проби с идентични баркодове.	<ol style="list-style-type: none"> Следвайте указанията на Workflow Manager (Мениджър на работния поток), за да определите кои проби са дублирани. Извадете тези дублирани проби и ги преетикетирайте или заменете. Презаредете пробите.

Стъпка от процеса	Код за грешка	Диалогов прозорец за грешки	Описание	Резолюция на потребителя
Изолиране на плазма	EP0102	Samples specified in the Sample Sheet were not loaded. (Пробите, посочени в бланката с проби, не са били заредени.)	Пробите, включени в бланката с проби, не са включени в заредените баркодове.	<ol style="list-style-type: none"> Следвайте указанията на Workflow Manager (Мениджър на работния поток), за да идентифицирате липсващите проби. Изберете една от следните опции: <ul style="list-style-type: none"> Добавете липсващите проби към партидата и заредете повторно пробите. Прекъснете метода, променете бланката с проби, както е необходимо. Рестартирайте метода.
Зареждане на плаки	Not applicable (Не е приложимо)	Venus Barcode Mask Error (Грешка в маската на баркода на Venus)	Workflow Manager (Мениджърът на работния поток) налага правилно свързване на плаката с партидата, като използва маски за баркод на Venus.	<ol style="list-style-type: none"> Проверете разположението на плаките, за да потвърдите, че подредбата на плаките е правилна. Уверете се, че заредената плака е правилната плака за посочената партида.

Стъпка от процеса	Код за грешка	Диалогов прозорец за грешки	Описание	Резолюция на потребителя
Екстракция на cfDNA	WE0150	Pressure in the vacuum chamber is too low. (Налягането във вакуумната камера е твърде ниско.)	Workflow Manager (Мениджър на работния поток) не продължава работа, ако налягането на вакуумната линия в покой е < 400 Torr.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Проверете за прегъвания или други препятствия във вакуумната линия. 2. Отворете скобите за освобождаване на линията за отпадъци, изчакайте да се освободи налягането и след това затворете напълно скобите за освобождаване на линията. 3. Уверете се, че вакуумният контролер и помпата са включени. 4. Проверете вакуумната бутилка за отпадъци. Ако бутилката за отпадъци е пълна на повече от половината, изпразнете бутилката за отпадъци. 5. Ако проблемът продължава, се свържете с техническата поддръжка на Illumina.
Екстракция на cfDNA	WE0153	Pressure in the vacuum chamber is too high. (Налягането във вакуумната камера е твърде високо.)	Ако измереното вакуумно налягане е твърде високо преди стартиране на контрола на налягането, системата може да е неизправна.	Уверете се, че всички вакуумни връзки и линии от задната страна на контролера са добре фиксирани.

Стъпка от процеса	Код за грешка	Диалогов прозорец за грешки	Описание	Резолюция на потребителя
Екстракция на cfDNA	WE0996	Vacuum failed to seal. (Вакуумът не успява да се запечата.)	Повредата на уплътнението трябва да бъде отстранена, преди да продължите.	<p>Уверете се, че повредата на уплътнението е отстранена, преди да изберете ОК.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Уверете се, че свързващата плака е на едно ниво с вакуумния колектор. С облечена в ръкавица ръка натиснете със сила свързващата плака. 2. Заслушайте се за бръмченето на вакуума и наблюдавайте преминаването на водата през свързващата плака. 3. Отворете изгледа за проследяване в Workflow Manager (Мениджъра на работния поток). След като действителното показание на налягането достигне поне 50 единици налягане по-малко от показанието на околната среда, изберете ОК, за да продължите с екстракцията на cfDNA. 4. Ако необходимото налягане не бъде достигнато за определеното време, изберете ОК, за да продължите с първото зареждане на лизат. 5. Прекъснете метода, след като лизатът е разпределен върху свързващата плака. Поставете отново и натиснете надолу със сила свързващата плака. 6. Ако лизатът не потече през плаката, свържете се с техническата поддръжка на Illumina.

Стъпка от процеса	Код за грешка	Диалогов прозорец за грешки	Описание	Резолюция на потребителя
Екстракция на cfDNA	WM0219	If Vacuum is on, manually rest the pump. (Ако вакуумът е включен, отпушете помпата ръчно.)	Вакуумът може да остане включен след прекъсване на метода по време на екстракция.	<ol style="list-style-type: none"> 1. За да изключите вакуума, натиснете бутона Power (Захранване) на вакуумния контролер. 2. Изчакайте 10 секунди и след това натиснете отново бутона Power (Захранване), за да включите вакуума.
Екстракция на cfDNA	EE0477	An error has occurred while moving a plate. (iSWAP error) (Възникна грешка при преместването на плака. (Грешка iSWAP))	Ако се появи грешка iSWAP (изпускане на плака, неуспешно вдигане и т. н.), системата ще ви подкани да завършите ръчно преместването на плаката.	<p>Уверете се, че плаката може да бъде възстановена (няма разлят материал).</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ако плаката не може да бъде възстановена, прекъснете изпълнението. • Ако плаката може да бъде възстановена, следвайте показаните инструкции, за да извършите ръчно прехвърляне на плаката.
Екстракция на cfDNA	EE0519	Scanned barcode does not match Binding Plate barcode on record. (Сканираният баркод не съвпада с баркода на свързващата плака в записа.)	Заредената свързваща плака не съвпада с баркода на извадената плака.	Уверете се, че заредената плака съответства на записания баркод (вижте дневника за проследяване за очаквания баркод).

Стъпка от процеса	Код за грешка	Диалогов прозорец за грешки	Описание	Резолюция на потребителя
API	EA0372	Unable to connect to the data server. (Невъзможност за свързване със сървъра за данни.)	VeriSeq Onsite Server v2 не отговаря на заявките за данни от Workflow Manager (Мениджър на работния поток).	<ol style="list-style-type: none"> 1. Уверете се, че ML STAR е свързан към мрежата. 2. Уверете се, че VeriSeq Onsite Server v2 е включен. 3. Проверете дали ML STAR може да се свърже с VeriSeq Onsite Server v2 (чрез заявка за ping).
	EA0774	Connection Error. The API server connection failed to validate. (Грешка при свързване. Връзката със сървъра на API не успя да се потвърди.)	VeriSeq Onsite Server v2 е спрял да отговаря на заявките за данни от Workflow Manager (Мениджър на работния поток).	<p>Уверете се, че:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Уверете се, че ML STAR е свързан към мрежата. 2. Проверете дали ML STAR може да се свърже с VeriSeq Onsite Server v2 (чрез заявка за ping). 3. Уверете се, че VeriSeq Onsite Server v2 е включен.
	EA0780	403: Invalid Request The current transaction is not valid. (403: Невалидна заявка. Текущата транзакция не е валидна.)	Изпратените данни нарушават логиката на работния процес на системата.	За повече информация вижте подробностите за грешката. Често срещаните причини са твърде дълги входящи данни или такива, които нарушават списъка с допустими знаци.

Литература

1. Nagaoka S, Hassold T, Hunt P. Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nat Rev Genet.* 2012;13(7):493-504. doi:10.1038/nrg3245.
2. Garnder RJ, Sutherland GR, Schaffer LG. *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling.* 4th edition. New York (NY): Oxford University Press; 2012.
3. Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, Ogilvie C, D'Antonio F. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015 Jan;45(1):16-26. doi: 10.1002/uog.14636.
4. American College of Obstetricians and Gynecologists. Screening for fetal aneuploidy. Practice Bulletin No. 163. *Obstet Gynecol.* 2016; 127(5):e123-137.
5. Gil MM, Accurti V, Santacruz B, Plana MN, Nicolaides KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2017 Apr 11. doi: 10.1002/uog.17484.
6. Bianchi D, Parker R, Wentworth J et al. DNA Sequencing versus Standard Prenatal Aneuploidy Screening. *N Engl J Med.* 2014;370(9):799-808. doi:10.1056/nejmoa1311037.
7. Benn P, Borrell A, Chiu RW, et al. "Position statement from the Chromosome Abnormality Screening Committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis." *Prenat Diagn* 35 (2015): 725-34.
8. Gregg AR, Skotko BG, Benkendorf JL, et al. Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med.* 2016; doi:10.1038/gim.2016.97.
9. Dondorp W, de Wert G, Bombard Y, et al. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy and beyond: challenges of responsible innovation in prenatal screening. *Eur J Hum Genet.* 2015 Nov;23(11):1438-50.
10. Grati, et al. "Fetoplacental mosaicism: potential implications for false-positive and false-negative noninvasive prenatal screening results." *Genetics in Medicine* 16 (2014): 620-624.
11. Wellesley, et al. "Rare chromosome abnormalities, prevalence and prenatal diagnosis rates from population-based congenital anomaly registers in Europe." *European Journal of Human Genetics* 20 (2012): 521-526.
12. Norton S, Lechner J, Williams T, Fernando M et al. A Stabilizing Reagent Prevents Cell-free DNA Contamination by Cellular DNA in Plasma During Blood Sample Storage and Shipping as Determined by Digital PCR. *Clin. Biochem.* 2013;46: 1561-1565. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2013.06.002.
13. Bianchi D W, et al. "Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing." *Obstet Gynecol* 119 (2012): 890-901.
14. Ehrich M, et al. "Genome-wide cfDNA screening: clinical laboratory experience with the first 10,000 cases." *Genet Med* 19 (2017): 1332-1337.
15. Fiorentino F, et al. "The clinical utility of genome-wide cfDNA screening." *Prenat Diagn* 37 (2017): 593-601.

16. Pertile, MD, et al. "Rare autosomal trisomies, revealed by maternal plasma DNA sequencing, suggest increased risk of feto-placental disease." Sci Transl Med 9 (2017): eaan1240.

Хронология на редакциите

Документ	Дата	Описание на промяната
Документ № 1000000078751 v09	Април 2024	<p>Премахнато</p> <ul style="list-style-type: none"> • Неактуална част № 20030577. • Изискване за максимален капацитет на епруветките за центрофуга за епруветки за вземане на кръв. <p>Добавено</p> <ul style="list-style-type: none"> • Нова част № 20101927 към VeriSeq Onsite Server v2. • Единица за размери за епруветките за вземане на кръв от 10 ml. • Пояснение относно съвместимите версии на SoftMax Pro. • Пояснителна бележка, в която се посочва, че трябва да се използват само съвместими пластмасови изделия, за да се осигури взаимозаменяемост с VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Забележка относно предупреждението за замърсяване на пробата с примеси към раздела „Тълкуване на резултатите“. • Предупредително изречение да не се замразяват проби от цяла кръв, събрани в епруветка за събиране на ДНК на Streck (BCT). • Предупредително изречение да се избягва излагането на пробата на повишени температури. • Пояснение относно ограниченията на анализа и условията за възпроизводимост. • Пояснение за гранична стойност за CNV LLR към Фигура 2 в раздела „Граница на откриване“. <p>Актуализирано</p> <ul style="list-style-type: none"> • Препратка към съвместима ваничка за реагенти от Roche Reagent Tub към Illumina Reagent Tub и добавен нов номер на частта. • Thermo Fisher Multifuge X4 Pro-MD каталожен номер на част на № 75016034. • Предупредително изречение, че несъответстващите обеми на ямките може да не позволят на пробите да преминат автоматичен контрол на качеството. • Препратка към листовките на инструментите.

Документ	Дата	Описание на промяната
Документ # 1000000078751 v08	Август 2022	Актуализиран номер на работна част Премахнато указание да се използва пипета за смесване, ако плаката за библиотеки е била замразена.
Документ # 1000000078751 v07	Май 2022	Разделяне на „Ограничения на процедурата“ на VeriSeq NIPT Solution v2 Reporting и включване на първите две точки. Останалият текст в ново заглавие „Ограничения на анализа“. Премахнато <ul style="list-style-type: none"> • VeriSeq от всички етикети на реагенти. • Приложете баркод на плака към VeriSeq NIPT Adapter Plate в „Подготовка на библиотеки“. Добавено <ul style="list-style-type: none"> • Думата „сертифицирана“ към вода без DNase/RNase. • Един от следните четци за микроплаки или еквиваленти и SpectraMax M2, M3, M4, M5 и забележка. • Към раздел „VeriSeq NIPT Microlab STAR“, за да обясни какво да се прави по време на събитие за обработка на грешка. • Забележка за визуална проверка на ямките. • Инструкции за партии от 24 и 48 проби във всички раздели на протокола. • Стъпки за това кога да се използва лилавата адаптерна плака или еквивалент. • Формулировка към раздела „Демографски данни и характеристики на бременността“, за да се включат резултатите от първия триместър на бременността. • Точка в спецификациите на плаките с дълбоки ямки, за да се включи устойчивост на въртящ момент. Актуализирано

Документ	Дата	Описание на промяната
		<ul style="list-style-type: none">• Формулировка за уникални имена на партиди за по-голяма яснота и включване на пример.• Символи и форматиране на „Забележки, сигнали за внимание и предупреждения“.• Резултати към подточките за тест.• Гуанидинов тиоцианат в гуанидинов хидрохлорид.• CVS в BVS (вградена вакуумна система)• Формулировка за използване на пълногеномния скрининг и резултат за LLR.• Спецификации: Спецификации на ванички за реагенти, плаки с дълбоки ямки, плаки с 384 ямки, плаки с 96 ямки
Документ # 1000000078751 v06	Август 2021	Актуализиран адрес на упълномощен представител на ЕС.

Документ	Дата	Описание на промяната
Документ # 1000000078751 v05	декември 2020	<p>Актуализирани са разделите "Принципи на процедурата", "Предупреждения и предпазни мерки" и "Етикетиране на продукта" с допълнителни разяснения в изпълнение на изискванията на регулаторните органи.</p> <p>Незначителни актуализации на съдържанието на протокола, за да съответства на актуалния стил и организация на Illumina.</p> <p>Коригирано е описанието на хромозома 21 като "втората най-малка човешка автозома" на "най-малката човешка автозома" в раздела за прецизност на аналитичните резултати.</p> <p>Добавени са предупредителни изречения за неправилно използване на резервоари и рискове от сливане на проби в разделите "Подготовка на изолирана плазма" и "Тълкуване на резултатите".</p> <p>Добавени са нови номера на сървъри и софтуерни части за пускането на нови модели сървъри и актуализации на номера на софтуерни части.</p> <p>Добавени са предупреждения към протокола и информация за отстраняване на неизправности за справяне и предотвратяване на препълване на пробата.</p> <p>Актуализирани активни съставки в стандарта на реагента за количествено определяне на ДНК в кутията за принадлежности, за да се приведе в съответствие с Информационния лист за безопасност.</p> <p>Актуализирани конвенции за именуване на модула Local Run Manager VeriSeq NIPT за съгласуваност с другата документация.</p> <p>Добавена хронология на редакциите.</p>
Документ № 1000000035963 v04	Октомври 2020	Незначителни корекции.
Документ # 1000000078751 v03	Септември 2020	Актуализиран е списъкът с материали, за да се представят спецификациите на лабораторното оборудване заедно с известните съвместими опции

Документ	Дата	Описание на промяната
Документ # 1000000078751 v02	Февруари 2020	<p>Актуализирано представяне на информацията за клиничните резултати, за да се представят по-добре разликите между основните и пълногеномните видове скрининги.</p> <p>Добавени са нови разлики в раздела за ефективността на основния и пълногеномния скрининг.</p> <p>Премахната е противоречивата информация за незадължителността на допълнителния доклад от раздела "Принципи на процедурата".</p> <p>Актуализирана е конвенция за именуване на софтуера VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 в целия документ за стилистична последователност.</p> <p>Актуализирано е етикетирането на адресите на Австралия и Illumina Нидерландия, за да се отразят последните промени.</p>
Документ # 1000000078751 v01	Август 2019	Премахната е дублираща се стъпка в "Екстракция на cfDNA", причинена от софтуерна грешка при публикуване.
Документ # 1000000078751 v00	Май 2019	Първоначално издание.

Патенти и търговски марки

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

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

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

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

© 2023 Illumina, Inc. Всички права запазени.

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

Информация за контакт



Illumina, Inc.

5200 Illumina Way

San Diego, California 92122, САЩ

+1.800.809.ILMN (4566)

+1.858.202.4566 (извън Северна Америка)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com



Illumina Netherlands B. V.
Steenoven 19
5626 DK Eindhoven
Нидерландия

Спонсор в Австралия

Illumina Australia Pty Ltd

Nursing Association Building

Level 3, 535 Elizabeth Street

Melbourne, VIC 3000

Австралия

Етикетиране на продукта

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

Резюме относно безопасността и действието (SSP, Summary of Safety and Performance) се намира на адрес <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> след стартиране на Европейската база данни за медицински изделия (Eudamed). Свързано е с базовия UDI-DI (0081627002NIPTRP).