

## Ένθετο συσκευασίας

ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ IN VITRO.

## Προβλεπόμενη χρήση

Το VeriSeq™ NIPT Solution v2 είναι μια διαγνωστική εξέταση *in vitro* για χρήση ως εξέταση ανίχνευσης για την ανίχνευση εμβρυϊκών γενετικών ανωμαλιών στο πλήρες γονιδίωμα από δείγματα μητρικού περιφερικού ολικού αίματος σε εγκύους γυναίκες οι οποίες βρίσκονται τουλάχιστον στη 10η εβδομάδα της κύησης. Το σύστημα VeriSeq NIPT Solution v2 χρησιμοποιεί αλληλούχιση του πλήρους γονιδιώματος για την ανίχνευση μερικών διπλασιασμών και διαγραφών για όλα τα αυτοσωμικά χρωμοσώματα και ανευπλοειδίες για όλα τα χρωμοσώματα. Η εξέταση προσφέρει την επιλογή αναφοράς της ανευπλοειδίας φυλετικών χρωμοσωμάτων (sex chromosome aneuploidy – SCA). Αυτό το προϊόν δεν πρέπει να χρησιμοποιείται ως αποκλειστική βάση για τη διάγνωση ή τη λήψη άλλων αποφάσεων διαχείρισης της εγκυμοσύνης.

Το λογισμικό VeriSeq NIPT Solution v2 περιλαμβάνει τα εξής: το πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασιών VeriSeq NIPT v2 για το VeriSeq NIPT Microlab STAR, το VeriSeq NIPT Sample Prep Kit και τον επιτόπιο διακομιστή VeriSeq v2 με το λογισμικό VeriSeq NIPT Assay Software v2. Το σύστημα VeriSeq NIPT Solution v2 προορίζεται για χρήση με συσκευή αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS).

## Συνοπτική επεξήγηση και παρουσίαση του προσδιορισμού

Οι εμβρυϊκές χρωμοσωμικές ανωμαλίες, και ιδίως η ανευπλοειδία, η οποία είναι ο μη φυσιολογικός αριθμός χρωμοσωμάτων, είναι συνήθως αιτία αναπαραγωγικής αποτυχίας, συγγενών ανωμαλιών, αναπτυξιακής καθυστέρησης και νοητικών αναπηριών. Η ανευπλοειδία επηρεάζει περίπου 1 στις 300 γεννήσεις ζώντων νεογνών, με πολύ υψηλότερα ποσοστά να σχετίζονται με αποβολή και θνησιγένεια.<sup>1,2</sup> Μέχρι πρόσφατα, υπήρχαν δύο τύποι προγεννητικών εξετάσεων για αυτές τις διαταραχές: η διαγνωστική εξέταση ή η εξέταση ανίχνευσης. Η διαγνωστική εξέταση περιλαμβάνει διαδικασίες όπως η αμνιοπαρακέντηση ή η δειγματοληψία χοριακών λαχνών. Αυτές οι μέθοδοι ελέγχου θεωρούνται ο χρυσός κανόνας για την ανίχνευση εμβρυϊκής ανευπλοειδίας. Ωστόσο, συσχετίζονται με κίνδυνο αποβολής από 0,11% έως 0,22%.<sup>3</sup> Οι συμβατικές εξετάσεις ανίχνευσης με πολλαπλούς δείκτες δεν ενέχουν κίνδυνο αποβολής διότι είναι μη επεμβατικές, ωστόσο είναι λιγότερο ακριβείς από τις διαγνωστικές εξετάσεις. Τα ποσοστά ανίχνευσης για την τρισωμία 21 ποικίλλουν από 69–96% ανάλογα με την εκάστοτε εξέταση ανίχνευσης, την ηλικία της μητέρας και την ηλικία κύησης κατά τη διενέργεια της εξέτασης.<sup>4</sup> Είναι σημαντικό το γεγονός ότι έχουν ψευδώς θετικά ποσοστά περίπου 5%, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε επεμβατικό διαγνωστικό έλεγχο για επιβεβαίωση και, κατά συνέπεια, σε κίνδυνο αποβολής που σχετίζεται με τη διαδικασία.<sup>4</sup> Οι εξετάσεις ανίχνευσης υπερήχων μπορούν επίσης να ανιχνεύσουν χρωμοσωμικές ανωμαλίες, ωστόσο ο βαθμός βεβαιότητας είναι ακόμη πιο χαμηλός απ' ό,τι στις άλλες μεθόδους που αναφέρονται παραπάνω.

Η εμβρυϊκή ανευπλοειδία για τα χρωμοσώματα 21, 18, 13, X και Y μπορεί να ανιχνευτεί με υψηλό βαθμό ακρίβειας με μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο (noninvasive prenatal testing – NIPT) που χρησιμοποιεί αλληλούχιση του πλήρους γονιδιώματος από cell-free DNA (cfDNA) που λαμβάνεται από μητρικό πλάσμα στις 10 εβδομάδες κύησης ή αργότερα. Σε πρόσφατη μετα-ανάλυση πολλαπλών κλινικών μελετών αναφέρθηκε ότι τα σταθμισμένα ομαδοποιημένα ποσοστά ανίχνευσης και οι ειδικότητες για την τρισωμία 21 και την τρισωμία 18 σε μονήρεις κυήσεις έχουν ως εξής: τρισωμία 21 99,7% και 99,96% και τρισωμία 18 97,9% και 99,96%, αντίστοιχα.<sup>5</sup> Μία μελέτη υποδεικνύει ότι η χρήση του NIPT ως πρωτεύουσας εξέτασης ανίχνευσης σε όλες τις κυήσεις θα μπορούσε να οδηγήσει σε μείωση κατά 89% του αριθμού επιβεβαιωτικών επεμβατικών διαδικασιών.<sup>6</sup>

Δεδομένης της σημαντικής μείωσης των ψευδώς θετικών ποσοστών με NIPT σε σύγκριση με τις συμβατικές εξετάσεις ανίχνευσης με πολλαπλούς δείκτες, πολλοί επαγγελματικοί ιατρικοί οργανισμοί έχουν εκδώσει γνωμοδοτήσεις υπέρ διαφόρων ενδείξεων χρήσης του NIPT.

Πιο συγκεκριμένα, η Διεθνής Εταιρεία για την Προγεννητική Διάγνωση, το Αμερικανικό Κολέγιο Μαιευτήρων και Γυναικολόγων (American College of Obstetricians and Gynecologists – ACOG) / η Εταιρεία Εμβρυομητρικής Ιατρικής (Society for Maternal Fetal Medicine – SMFM), το Αμερικανικό Κολέγιο Ιατρικής Γενετικής και Γενωμικής (American College of Medical Genetics and Genomics – ACMG) και η Ευρωπαϊκή Εταιρεία Γενετικής Ανθρώπου / Αμερικανική Εταιρεία Γενετικής Ανθρώπου συνιστούν τη διενέργεια NIPT σε όλες τις εγκύους.<sup>7,8,9</sup> Συνιστώνται η παροχή συμβουλών πριν από τη διενέργεια της εξέτασης, η παροχή συναίνεσης κατόπιν ενημέρωσης και η διενέργεια διαγνωστικού ελέγχου για την επιβεβαίωση θετικού αποτελέσματος εξέτασης ανίχνευσης cfDNA.<sup>4</sup>

Το VeriSeq NIPT Solution v2 είναι μια μη επεμβατική διαγνωστική (IVD) εξέταση in vitro που χρησιμοποιεί αλληλούχιση του πλήρους γονιδιώματος τμημάτων cfDNA από δείγματα μητρικού περιφερικού ολικού αίματος από εγκύους γυναίκες που έχουν συμπληρώσει τουλάχιστον 10 εβδομάδες κύησης. Η εξέταση προσφέρει δύο επιλογές για τους τύπους ελέγχου: τη βασική εξέταση ανίχνευσης και την εξέταση ανίχνευσης στο πλήρες γονιδίωμα. Η βασική εξέταση ανίχνευσης παρέχει πληροφορίες σχετικά με την κατάσταση ανευπλοειδίας μόνο των χρωμοσωμάτων 21, 18, 13, X και Y. Η εξέταση ανίχνευσης στο πλήρες γονιδίωμα παρέχει πληροφορίες σχετικά με διπλασιασμούς και διαγραφές για όλα τα αυτοσωμικά χρωμοσώματα και την κατάσταση ανευπλοειδίας για όλα τα χρωμοσώματα. Και οι δύο τύποι εξέτασης ανίχνευσης παρέχουν την επιλογή για αναφορά ανευπλοειδίας των φυλετικών χρωμοσωμάτων (SCA) με ή χωρίς αναφορά του φύλου του εμβρύου. Η επιλογή αναφοράς για SCA μπορεί να απενεργοποιηθεί. Εάν η επιλογή αναφοράς για SCA είναι ανενεργή, το φύλο του εμβρύου δεν αναφέρεται. Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τις επιλογές αναφοράς φύλου, ανατρέξτε στον *Οδηγό λογισμικού VeriSeq NIPT Solution v2 (αρ. εγγράφου 1000000067940)*.

## Αρχές της διαδικασίας

Το VeriSeq NIPT Solution v2 είναι μια αυτοματοποιημένη λύση για εργαστηριακό έλεγχο NIPT, η οποία αποτελείται από αυτοματοποιημένη παρασκευή δειγμάτων και ανάλυση δεδομένων αλληλούχισης. Το VeriSeq NIPT Sample Prep Kit είναι εξειδικευμένα αντιδραστήρια μίας χρήσης που χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με το VeriSeq NIPT Microlab STAR για την προετοιμασία παρτίδων 24, 48 ή 96 δειγμάτων για

αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS). Τα δεδομένα αλληλούχισης συζευγμένων άκρων στο πλήρες γονιδίωμα αναλύονται από το εξειδικευμένο λογισμικό VeriSeq NIPT Assay Software v2 και δημιουργείται μια αναφορά η οποία παρέχει ποιοτικά αποτελέσματα.

Η ροή εργασιών αποτελείται από τις ακόλουθες διαδικασίες: συλλογή δειγματος, απομόνωση πλάσματος, εκχύλιση cfDNA, προετοιμασία βιβλιοθηκών, ποσοτικός προσδιορισμός βιβλιοθηκών, ομαδοποίηση βιβλιοθηκών, αλληλούχιση και ανάλυση, οι οποίες περιγράφονται πιο λεπτομερώς:

- **Συλλογή δειγματος** — 7–10 ml μητρικού περιφερικού ολικού αίματος συλλέγονται σε σωλήνα συλλογής αίματος cell-free DNA (BCT) της Streck, με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η κυτταρική λύση και η γενωμική επιμόλυνση και να σταθεροποιείται το ολικό αίμα.
- **Απομόνωση πλάσματος** — Εντός 5 ημερών από τη συλλογή, το πλάσμα απομονώνεται από το μητρικό περιφερικό ολικό αίμα με τη χρήση τυπικών τεχνικών φυγοκέντρησης. Το VeriSeq NIPT Microlab STAR αναρροφά και διανέμει το πλάσμα σε μια πλάκα βοθρίων μεγάλου βάθους με 96 βοθρία για επακόλουθη επεξεργασία. Σε περίπτωση που απαιτείται επανέλεγχος, τα δείγματα μετά την επεξεργασία μπορούν να επαναπαρωματιστούν και να αποθηκευτούν στους 4 °C για 5 επιπλέον ημέρες (συνολικά έως και 10 ημέρες μετά τη συλλογή αίματος).



#### ΠΡΟΣΟΧΗ

Η υπέρβαση των προαναφερθέντων χρόνων αποθήκευσης μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τα ποσοστά αποτυχίας μεμονωμένων δειγμάτων.

- **Εκχύλιση cfDNA** — Ο καθαρισμός του cfDNA από το πλάσμα επιτυγχάνεται με προσρόφηση πάνω μια πλάκα δέσμευσης, έκπλυση της πλάκας δέσμευσης για την αφαίρεση των ρύπων και έκλουση.
- **Προετοιμασία βιβλιοθήκης** — Τα καθαρισμένα τμήματα cfDNA υποβάλλονται σε διαδικασία επιδιόρθωσης για τη μετατροπή των προεξοχών 5' και 3' σε αμβλέα άκρα. Στη συνέχεια, ένα νουκλεοτίδιο δεοξυαδενοσίνης προστίθεται στα άκρα 3' για να δημιουργηθεί μια προεξοχή ενιαίας βάσης. Προσαρμογείς ευρετηρίου που περιέχουν μια προεξοχή δεοξυθυμιδίνης 3' ενιαίας βάσης λιγοποιούνται στα επεξεργασμένα τμήματα cfDNA. Το λιγοποιημένο DNA καθαρίζεται με τη χρήση σφαιριδίων αντίστροφης ακινητοποίησης στερεάς φάσης. Κάθε δείγμα σε ένα σύνολο 24, 48 ή 96 λαμβάνει έναν μοναδικό προσαρμογέα ευρετηρίου. Οι προσαρμογείς εξυπηρετούν 2 σκοπούς:



#### ΠΡΟΣΟΧΗ

Απαιτείται εξαιρετικά μεγάλη προσοχή για την αποφυγή της επιμόλυνσης των δεικτών, η οποία θα μπορούσε να οδηγήσει σε εσφαλμένα αποτελέσματα.

- Τα ευρετήρια επιτρέπουν την ταυτοποίηση των δειγμάτων στην επακόλουθη αλληλούχιση.
- Οι προσαρμογείς ευρετηρίου περιέχουν αλληλουχίες που επιτρέπουν τη σύλληψη της βιβλιοθήκης στη στερεά επιφάνεια μιας κυψελίδας ροής αλληλούχισης για δημιουργία συστάδων και επακόλουθη αλληλούχιση.
- **Ποσοτικός προσδιορισμός** — Το προϊόν βιβλιοθήκης προσδιορίζεται ποσοτικά με τη χρήση φθορίζουσας χρωστικής με συγκέντρωση που καθορίζεται βάσει σύγκρισης με μια πρότυπη καμπύλη DNA.

- **Ομαδοποίηση και αλληλούχιση βιβλιοθηκών** — Οι βιβλιοθήκες του δείγματος ομαδοποιούνται σε ομάδες 24 ή 48 δειγμάτων σε προσαρμοσμένες ποσότητες για την ελαχιστοποίηση της απόκλισης στην κάλυψη. Στη συνέχεια, κάθε ομάδα υποβάλλεται σε αλληλούχιση με τη χρήση συστήματος αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS).
- Το VeriSeq NIPT Solution v2 δεν περιλαμβάνει εξοπλισμό αλληλούχισης και αναλώσιμα.
- **Ανάλυση** — Για κάθε δείγμα, η ανάλυση περιλαμβάνει τα εξής:
  - Προσδιορισμό των τμημάτων βιβλιοθήκης ανά αλληλουχία ευρετηρίου και ευθυγράμμιση των αναγνώσεων συζευγμένων άκρων σε ένα ανθρώπινο γονιδίωμα αναφοράς.
  - Εκτίμηση του εμβρυϊκού κλάσματος της βιβλιοθήκης μέσω συνδυασμού πληροφοριών από την κατανομή τόσο των μηκών και όσο και των γενωμικών συντεταγμένων των τμημάτων βιβλιοθήκης.
  - Αφού ληφθούν υπόψη οι γνωστές μεροληψίες, ένα στατιστικό μοντέλο ανιχνεύει περιοχές του γονιδιώματος οι οποίες υποεκπροσωπούνται ή υπερεκπροσωπούνται στη βιβλιοθήκη κατά τρόπο που συνάδει με ανωμαλία στο εκτιμώμενο επίπεδο εμβρυϊκού κλάσματος.
  - Η αναφορά NIPT παρέχει συνοπτικά αποτελέσματα για το επιλεγμένο μενού της εξέτασης όπου το αποτέλεσμα ANOMALY DETECTED (Ανιχνεύτηκε ανωμαλία) ή NO ANOMALY DETECTED (Δεν ανιχνεύτηκε ανωμαλία) παρατίθεται μαζί με την εκτίμηση εμβρυϊκού κλάσματος για τα δείγματα που ολοκλήρωσαν επιτυχώς τον έλεγχο ποιότητας.
  - Η συμπληρωματική αναφορά παρέχει ποσοτικές μετρήσεις οι οποίες χαρακτηρίζουν κάθε ανιχνευθείσα ανωμαλία.

## Περιορισμοί της διαδικασίας

### Περιορισμοί της μεθόδου προσδιορισμού

- Τα στοιχεία που υποστηρίζουν την ευαισθησία και την ειδικότητα για την εξέταση καλύπτουν τις μονήρεις και τις δίδυμες κήσεις. Οι παρούσες οδηγίες χρήσης δεν παρέχουν δεδομένα ευαισθησίας ή ειδικότητας για τρίδυμες κήσεις ή κήσεις περισσότερων εμβρύων.
- Το σύστημα VeriSeq NIPT Solution v2 δεν προορίζεται για την ανίχνευση πολυπλοειδίας, όπως τριπλοειδία.
- Το σύστημα VeriSeq NIPT Solution v2 δεν προορίζεται για την ανίχνευση ισορροπημένων χρωμοσωμικών μετατοπίσεων.
- Ο προσδιορισμός απαιτεί δείγματα μητρικού περιφερικού ολικού αίματος από έγκυο γυναίκα που έχει συμπληρώσει τουλάχιστον 10 εβδομάδες κύησης.
- Για τις βασικές εξετάσεις ανίχνευσης, η εξέταση με το σύστημα VeriSeq NIPT Solution v2 ελέγχει ειδικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Τα αποτελέσματα που αναφέρονται ως «NO ANOMALY DETECTED» (Δεν ανιχνεύτηκε ανωμαλία) δεν εξαλείφουν την πιθανότητα χρωμοσωμικών ανωμαλιών στα χρωμοσώματα που ελέγχθηκαν. Ένα αρνητικό αποτέλεσμα δεν εξαλείφει την πιθανότητα η κύηση να παρουσιάζει άλλες χρωμοσωμικές ανωμαλίες, γενετικές παθήσεις ή συγγενείς διαμαρτίες (π.χ. ανοικτή βλάβη του νευρικού σωλήνα).

- Για τις εξετάσεις ανίχνευσης στο πλήρες γονιδίωμα, οι μεγάλες διαγραφές και διπλασιασμοί με μέγεθος μικρότερο του 75% του μεγέθους του χρωμοσώματος μπορεί να είναι ενδεικτικές ολικής χρωμοσωμικής ανευπλοειδίας.
- Για τις εξετάσεις ανίχνευσης στο πλήρες γονιδίωμα, ορισμένες περιοχές αποκλείονται από την ανάλυση. Κατάλογος αυτών των αποκλειόμενων περιοχών είναι διαθέσιμος στον ιστότοπο υποστήριξης της Illumina. Η ανίχνευση γενωμικών ανωμαλιών εκτελείται μόνο σε μη αποκλειόμενες περιοχές.
- Η αναφορά του φύλου του εμβρύου δεν είναι διαθέσιμη σε όλες τις περιοχές λόγω τοπικών κανονισμών που διέπουν την αναφορά του φύλου.
- Βάσει των στοιχείων στη βιβλιογραφία, τα αποτελέσματα ελέγχων που βασίζονται σε DNA ελεύθερο κυττάρων μπορεί να δεχθούν συγχυτική επίδραση από κάποιους παράγοντες που σχετίζονται με τη μητέρα και το έμβρυο. Ορισμένοι από αυτούς αναφέρονται, ενδεικτικά και όχι περιοριστικά, παρακάτω:
  - Πρόσφατη μετάγγιση μητρικού αίματος
  - Μητέρα που έχει υποβληθεί σε προηγούμενη μεταμόσχευση οργάνου / αιμοποιητικών κυττάρων
  - Μητέρα με αυτοάνοσο νόσημα
  - Μητέρα με νεοπλασίες (καλοήθειες και κακοήθειες)
  - Μωσαϊκισμός μητέρας
  - Μητέρα με παραλλαγές αριθμού αντιγράφων
  - Εμβryo-πλακουντιακός μωσαϊκισμός / Μωσαϊκισμός περιορισμένος στον πλακούντα
  - Εμβρυϊκός θάνατος / Εξαφάνιση διδύμου

## Αναφορές του VeriSeq NIPT Solution v2

- Το σύστημα VeriSeq NIPT Solution v2 είναι μια εξέταση ανίχνευσης και δεν θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη χωριστά από άλλα κλινικά ευρήματα και αποτελέσματα εξετάσεων. Τα συμπεράσματα σχετικά με την κατάσταση του εμβρύου και οι αποφάσεις για τη διαχείριση της κύησης δεν θα πρέπει να βασίζονται μόνο στα αποτελέσματα της εξέτασης ανίχνευσης NIPT.<sup>7</sup>
- Το σύστημα VeriSeq NIPT Solution v2 παρέχει πληροφορίες σχετικά με τα εξής:
  - Η βασική εξέταση ανίχνευσης εξετάζει την υπερεκπροσώπηση των χρωμοσωμάτων 13, 18 και 21.
  - Η εξέταση ανίχνευσης στο πλήρες γονιδίωμα εξετάζει την υποεκπροσώπηση και την υπερεκπροσώπηση όλων των αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων, συμπεριλαμβανομένων των μερικών διαγραφών και διπλασιασμών μήκους τουλάχιστον 7 Mb.
  - Σε μονήρεις κυήσεις όπου έχει επιλεγεί «Ναι» ή «SCA» ως επιλογή αναφοράς φύλου, τις εξής ανωμαλίες φυλετικών χρωμοσωμάτων: XO, XXX, XXY και XYY.
  - Σε μονήρεις κυήσεις όπου έχει επιλεγεί «Ναι» ως επιλογή αναφοράς φύλου, αναφέρεται το φύλο του εμβρύου.
  - Παρουσία χρωμοσώματος Y σε δίδυμες κυήσεις.

## Περιεχόμενα προϊόντος

Το VeriSeq NIPT Solution v2 περιλαμβάνει τα παρακάτω κιτ προετοιμασίας δείγματος:

- VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (24 δείγματα) (εξάρτημα αρ. 20025895)
- VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (48 δείγματα) (εξάρτημα αρ. 15066801)
- VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (96 δείγματα) (εξάρτημα αρ. 15066802)

Το VeriSeq NIPT Solution v2 αποτελείται από τα παρακάτω στοιχεία λογισμικού:

- Λογισμικό VeriSeq NIPT Assay Software v2 (εξάρτημα αρ. 20047024), προεγκατεστημένο στον επιτόπιο διακομιστή VeriSeq v2
  - Επιτόπιος διακομιστής VeriSeq Onsite Server v2 (εξάρτημα αρ. 20028403, 20047000, 20101927) ή προηγούμενος επιτόπιος διακομιστής VeriSeq (εξάρτημα αρ. 15076164 ή 20016240) αναβαθμισμένος στην έκδοση 2.
- Πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασιών VeriSeq NIPT v2 (εξάρτημα αρ. 20044988), προεγκατεστημένο στο VeriSeq NIPT Microlab STAR.
  - VeriSeq NIPT Microlab STAR [εξάρτημα αρ. Hamilton Company Reno: 95475-01 (115 V) και 95475-02 (230 V), Hamilton Company Bonaduz: 806288].
- Module του Local Run Manager VeriSeq NIPT (εξάρτημα αρ. 20044989)

## Αντιδραστήρια

### Παρεχόμενα αντιδραστήρια

Η Illumina παρέχει τα παρακάτω αντιδραστήρια: VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (24 δείγματα) (εξάρτημα αρ. 20025895), VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (48 δείγματα) (εξάρτημα αρ. 15066801) και VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (96 δείγματα) (εξάρτημα αρ. 15066802). Τα αντιδραστήρια VeriSeq NIPT Sample Prep Kit είναι ειδικά διαμορφωμένα για χρήση με το VeriSeq NIPT Microlab STAR (ML STAR) (εξάρτημα αρ. 95475-01, 95475-02 ή 806288), το οποίο παρέχεται από την Hamilton Company.

## VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, κιβώτιο εκχύλισης

Πίνακας 1 Κιβώτιο εκχύλισης VeriSeq NIPT (24) και (48), εξάρτημα αρ. 20025869 και 15066803

Όνομα αντιδραστηρίου στην ετικέτα	Αριθμός περιεκτών στο κιτ	Δραστικά συστατικά	Αποθήκευση
Lysis Buffer	1	Υδροχλωρική γουανιδίνη σε ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα	15 °C έως 30 °C
Wash Buffer I	1	Υδροχλωρική γουανιδίνη και 2-προπανόλη σε ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα	15 °C έως 30 °C
Wash Buffer II	1	Ρυθμιστικό υδατικό διάλυμα που περιέχει άλατα	15 °C έως 30 °C
Elution Buffer	1	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα	15 °C έως 30 °C
Proteinase Buffer	1	Γλυκερόλη σε ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα	15 °C έως 30 °C
Proteinase K	3	Λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνωση K	15 °C έως 30 °C

Πίνακας 2 Κιβώτιο εκχύλισης VeriSeq NIPT (96), εξάρτημα αρ. 15066807

Όνομα αντιδραστηρίου στην ετικέτα	Αριθμός περιεκτών στο κιτ	Δραστικά συστατικά	Αποθήκευση
Lysis Buffer	1	Υδροχλωρική γουανιδίνη σε ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα	15 °C έως 30 °C
Wash Buffer I	1	Υδροχλωρική γουανιδίνη και 2-προπανόλη σε ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα	15 °C έως 30 °C
Wash Buffer II	2	Ρυθμιστικό υδατικό διάλυμα που περιέχει άλατα	15 °C έως 30 °C
Elution Buffer	1	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα	15 °C έως 30 °C
Proteinase Buffer	1	Γλυκερόλη σε ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα	15 °C έως 30 °C
Proteinase K	4	Λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνωση K	15 °C έως 30 °C

**VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, κιβώτιο προετοιμασίας βιβλιοθηκών**

Πίνακας 3 Κιβώτιο προετοιμασίας βιβλιοθηκών VeriSeq NIPT (24) και (48), εξάρτημα αρ. 20026030 και 15066809

Όνομα αντιδραστηρίου στην ετικέτα	Αριθμός περιεκτών στο κιτ	Δραστικά συστατικά	Αποθήκευση
End Repair Mix	1	Πολυμεράση DNA και dNTP σε ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα	-25 °C έως -15 °C
A-Tailing Mix	1	Πολυμεράση DNA και dATP σε ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα	-25 °C έως -15 °C
Ligation Mix	1	Λιγάση DNA σε ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα	-25 °C έως -15 °C
Hybridization Buffer	1	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα	-25 °C έως -15 °C
NIPT DNA Adapter Plate	1	Ολιγονουκλεοτίδια σε ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα	-25 °C έως -15 °C

Πίνακας 4 Κιβώτιο προετοιμασίας βιβλιοθηκών VeriSeq NIPT (96), εξάρτημα αρ. 15066810

Όνομα αντιδραστηρίου στην ετικέτα	Αριθμός περιεκτών στο κιτ	Δραστικά συστατικά	Αποθήκευση
End Repair Mix	1	Πολυμεράση DNA και dNTP σε ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα	-25 °C έως -15 °C
A-Tailing Mix	2	Πολυμεράση DNA και dATP σε ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα	-25 °C έως -15 °C
Ligation Mix	2	Λιγάση DNA σε ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα	-25 °C έως -15 °C
Hybridization Buffer	1	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα	-25 °C έως -15 °C
NIPT DNA Adapter Plate	1	Ολιγονουκλεοτίδια σε ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα	-25 °C έως -15 °C



## VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, κιβώτιο παρελκομένων

Πίνακας 5 Κιβώτιο παρελκομένων VeriSeq NIPT, εξάρτημα αρ. 15066811

Όνομα αντιδραστηρίου στην ετικέτα	Αριθμός περιεκτών στο κιτ	Δραστικά συστατικά	Αποθήκευση
DNA Binding Plate	1	Μικροπλάκα προπυλενίου με τροποποιημένη μεμβράνη σιλικόνης	2 °C έως 8 °C
Resuspension Buffer	1	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα	2 °C έως 8 °C
Sample Purification Beads	1	Παραμαγνητικά σφαιρίδια στερεάς φάσης σε ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα	2 °C έως 8 °C
DNA Quantification Reagent	1	Χρωστική που παρεμβάλλεται στο DNA σε DMSO	2 °C έως 8 °C
DNA Quantification Standard	1	Πρότυπο dsDNA, μη ειδικό DNA και αζίδιο του νατρίου σε ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα	2 °C έως 8 °C

## VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, σωλήνες ροής εργασιών και ετικέτες

Πίνακας 6 Σωλήνες ροής εργασιών και ετικέτες, εξάρτημα αρ. 15071543

Όνομα στοιχείου στην ετικέτα	Αριθμός στο κιτ	Αποθήκευση
Ετικέτα (LBL) – Γραμμωτός κώδικας πλάκας (Plate Barcode)	9	15 °C έως 30 °C
Ετικέτα (LBL) – Γραμμωτός κώδικας πλάκας βοθρίων μεγάλου βάθους (Deep-well Plate Barcode)	12	15 °C έως 30 °C
Σωλήνας (TB) – Κενός σωλήνας ομαδοποίησης (Empty Pooling Tube)	5	15 °C έως 30 °C

## Αντιδραστήρια που δεν παρέχονται

### Απαιτούμενα αντιδραστήρια, δεν παρέχονται

- Αντιδραστήρια και αναλώσιμα αλληλούχισης που απαιτούνται για το σύστημα αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS)
- Πιστοποιημένο νερό ελεύθερο DNase/RNase – βαθμού μοριακής βιολογίας
- Αιθανόλη, 100% (200 proof) – βαθμού μοριακής βιολογίας

**ΣΗΜΕΙΩΣΗ** Η αιθανόλη που δεν είναι βαθμού μοριακής βιολογίας ενδέχεται να επηρεάσει αρνητικά την απόδοση του προσδιορισμού.

## Προαιρετικά αντιδραστήρια, δεν παρέχονται

- Ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα Dulbecco (DPBS) για αρνητικό μάρτυρα ελέγχου (no template control – NTC)

## Αποθήκευση και χειρισμός

1. Η θερμοκρασία δωματίου ορίζεται ως 15 °C έως 30 °C.
2. Όλα τα αντιδραστήρια προορίζονται για μία μόνο χρήση. Τα αντιδραστήρια θα πρέπει να χρησιμοποιούνται αμέσως μετά την προετοιμασία τους για χρήση.
3. Εάν οποιαδήποτε συσκευασία ή περιεχόμενα των στοιχείων του VeriSeq NIPT Solution έχει υποστεί ζημιά ή φθορά, επικοινωνήστε με το τμήμα εξυπηρέτησης πελατών της Illumina.
4. Τα αντιδραστήρια είναι σταθερά όταν αποθηκεύονται όπως υποδεικνύεται μέχρι την καθορισμένη ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στις ετικέτες των κιτ. Για τις συνθήκες αποθήκευσης, ανατρέξτε στη στήλη Αποθήκευση στους πίνακες της ενότητας [Αντιδραστήρια](#). Μην χρησιμοποιείτε ληγμένα αντιδραστήρια.
5. Οι αλλαγές στη φυσική εμφάνιση των αντιδραστηρίων που παρέχονται μπορεί να υποδεικνύουν υποβάθμιση των υλικών. Εάν προκύψουν αλλαγές στη φυσική εμφάνιση (π.χ. εμφανείς αλλαγές στο χρώμα των αντιδραστηρίων ή εμφανής θολεροτότητα με μικροβιακή επιμόλυνση), μην χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια.
6. Ακολουθείτε τις παρακάτω βέλτιστες πρακτικές κατά τον χειρισμό Sample Purification Beads:
  - Μην καταψύχετε ποτέ τα σφαιρίδια.
  - Αφήνετε τα σφαιρίδια να έλθουν σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση.
  - Αμέσως πριν από τη χρήση, περιδινήστε τα σφαιρίδια μέχρι να εναιωρηθούν καλά και το χρώμα να γίνει ομοιογενές.
7. Το Lysis Buffer, το Wash Buffer I, το Wash Buffer II, το Elution Buffer και το Proteinase Buffer μπορεί να σχηματίσουν ορατά ζητήματα ή κρυστάλλους. Πριν από τη χρήση, περιδινήστε δυνατά και, στη συνέχεια, επιθεωρήστε οπτικά για να βεβαιωθείτε ότι δεν υπάρχουν ιζήματα.
8. Μην καταψύχετε ποτέ το ολικό αίμα μετά τη συλλογή.
9. Αλληλουχίστε τις βιβλιοθήκες το συντομότερο δυνατόν μετά την ομαδοποίηση. Οι ομαδοποιημένες βιβλιοθήκες διατηρούν τη σταθερότητά τους μέχρι και για επτά ημέρες σε θερμοκρασία -25 °C έως -15 °C. Δεν απαιτείται περαιτέρω αποδιάταξη, όταν αποθηκεύονται υπό αυτές τις συνθήκες και για αυτό το χρονικό διάστημα.

## Εξοπλισμός και υλικά

### Εξοπλισμός και υλικά που απαιτούνται, δεν παρέχονται

#### Απαιτούμενος εξοπλισμός, δεν παρέχεται

Εξοπλισμός	Προμηθευτής
<p>Σύστημα αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS) με τις παρακάτω δυνατότητες:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Αλληλούχιση συζευγμένων άκρων 2 x 36 bp</li> <li>Συμβατό με προσαρμογείς διπλού ευρετηρίου VeriSeq NIPT Sample Prep Kit</li> <li>Αυτόματη παραγωγή αρχείων BCL</li> <li>Χημική ανάλυση δύο καναλιών</li> <li>400 εκατομμύρια αναγνώσεις αλληλούχισης συζευγμένων άκρων ανά εκτέλεση</li> <li>Συμβατό με το λογισμικό VeriSeq NIPT Assay Software v2 ή ένα σύστημα αλληλούχισης NextSeq 550Dx Sequencing System.</li> </ul>	Προμηθευτής οργάνου ή Illumina, εξάρτημα αρ. 20005715
Καταψύκτης, -25 °C έως -15 °C	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Μικροφυγόκεντρος	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Βοήθημα πιπέτας	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Ψυγείο, 2 °C έως 8 °C	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Πιπέτες μονού καναλιού των 20 μl	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Πιπέτες μονού καναλιού των 200 μl	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Πιπέτες μονού καναλιού των 1.000 μl	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Αναδευτήρας	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Συγκρότημα φυγοκέντρου και στροφείου (rotor) για σωλήνες συλλογής αίματος	
<p>Ισοδύναμο:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Ψυχόμενη φυγόκεντρος με δυνατότητα ταχύτητας 1.600 x g με επιλογή χωρίς φρένο</li> <li>Περιστρεφόμενο στροφείο (rotor) δοχείου με δοχεία</li> <li>Ένθετα δοχείου με ελάχιστο βάθος 76 mm</li> <li>Προσαρμογείς ενθέτων για υποστήριξη σωλήνων συλλογής αίματος 16 mm x 100 mm</li> </ul>	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου

Εξοπλισμός	Προμηθευτής
<p>Συνιστώμενο:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Φυγόκεντρος σειράς Allegra X12R, 1.600 g</li> <li>• Στροφέιο (rotor) GH-3.8 φυγοκέντρου Allegra με δοχεία</li> <li>• Καλύμματα δοχείων φυγοκέντρου Allegra, σετ των δύο</li> <li>• Συγκρότημα προσαρμογέα φυγοκέντρου Allegra, 16 mm, σετ των τεσσάρων</li> </ul>	<p>Beckman Coulter, αρ. στοιχείου 392304 (120 V ή 230 V)</p> <p>Beckman Coulter, αριθ. στοιχείου 369704</p> <p>Beckman Coulter, αριθ. στοιχείου 392805</p> <p>Beckman Coulter, αριθ. στοιχείου 359150</p>
<b>Συγκρότημα φυγοκέντρου και στροφείου για μικροπλάκες</b>	
<p>Ισοδύναμο:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Φυγόκεντρος με δυνατότητα ταχύτητας 5.600 × g</li> <li>• Περιστρεφόμενο στροφέιο (rotor) πλακών με φορείς πλακών 96 βοθρίων, ελάχιστο βάθος 76,5 mm.</li> <li>• Multifuge X4 Pro-MD 120 V TX-1000BT</li> <li>• Φυγόκεντρος Sorvall Legend XTR</li> </ul>	<p>Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου</p> <p>Thermo Fisher Scientific αρ. 75016034</p> <p>Thermo Fisher Scientific, αρ. καταλόγου 75004521 (120 V) ή αρ. καταλόγου 75004520 (230 V)</p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Στροφέιο (rotor) μικροπλακών HIGHPlate 6000</li> <li>• Στροφέιο (rotor) high plate 6000</li> </ul> <p>Βάση στήριξης για μικροπλάκες</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Συνιστώμενο: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Βάση στήριξης 96 βοθρίων MicroAmp</li> <li>• Φορέας πλακών PCR 96 βοθρίων</li> </ul> </li> </ul>	<p>Thermo Fisher Scientific, αρ. καταλόγου 75003606</p> <p>Thermo Scientific VWR αρ. καταλόγου 97040-244</p> <p>Thermo Fisher Scientific, αρ. καταλόγου 4379590</p> <p>Thermo Fisher Scientific, αρ. καταλόγου AB-0563/1000</p>
<p>Ένα από τα παρακάτω συστήματα ανάγνωσης μικροπλακών, ή ισοδύναμο, (φθορισμόμετρο) με SoftMax Pro έκδ. 6.2.2–7.1.2:</p>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gemini XPS</li> <li>• SpectraMax M2, M3, M4 και M5. <ul style="list-style-type: none"> <li>• Απαιτείται μοβ ένθετο στη συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών για χρήση στη ροή εργασιών.</li> </ul> </li> </ul>	<p>Μοριακές συσκευές, εξάρτημα αρ. XPS</p> <p>Μοριακές συσκευές, εξάρτημα αρ. M2, M3, M4 και M5</p>
<p>USB υψηλής ταχύτητας SpectraMax, σειριακός προσαρμογέας</p>	<p>Μοριακές συσκευές, εξάρτημα αρ. 9000-0938</p>

Εξοπλισμός	Προμηθευτής
Θερμικός κυκλοποιητής με τις παρακάτω προδιαγραφές: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Θερμαινόμενο καπάκι</li> <li>• Εύρος θερμοκρασίας: 4 °C έως 98 °C</li> <li>• Ακρίβεια θερμοκρασίας: ±2 °C</li> <li>• Ελάχιστος ρυθμός μεταβολής θερμοκρασίας ανά δευτερόλεπτο: 2 °C</li> <li>• Συμβατός με πλάκα PCR Twin.tec 96 βοθρίων, τύπου full skirt</li> </ul>	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
VeriSeq NIPT Microlab STAR	Hamilton, εξάρτημα αρ. 95475-01 (115 V), εξάρτημα αρ. 95475-02 (230 V) ή εξάρτημα αρ. 806288 (για Hamilton Company Bonaduz)
Επιτόπιος διακομιστής VeriSeq v2 ή αναβαθμισμένος επιτόπιος διακομιστής VeriSeq	Illumina, εξάρτημα αρ. 20028403 ή 20047000 (v2) ή 20101927 ή 15076164 ή 20016240 (αναβαθμισμένος)
Εάν χρησιμοποιείτε σύστημα αλληλούχησης NextSeq 550Dx: <ul style="list-style-type: none"> <li>• NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5, 75 κύκλοι</li> </ul>	Illumina, εξάρτημα αρ. 20028870

### Προαιρετικός εξοπλισμός, δεν παρέχεται

Εξοπλισμός	Προμηθευτής
Σύστημα αφαίρεσης πωμάτων Pluggo	LGP Consulting, εξάρτημα αρ. 4600 4450
Πλάκα επικύρωσης φθορισμού SpectraMax SpectraTest FL1	Μοριακές συσκευές, εξάρτημα αρ. 0200-5060
Στροφέιο (rotor)/περιστρεφόμενος φορέας σωλήνων, σωλήνες 15 ml, 40 rpm, 100–240 V	Thermo Scientific, αρ. καταλόγου 88881001 (ΗΠΑ) ή αρ. καταλόγου 88881002 (ΕΕ)

### Απαιτούμενα υλικά, δεν παρέχονται

Αναλώσιμο	Προμηθευτής
Αγώγιμα, μη αποστειρωμένα ρύγχη με φίλτρο των 1.000 µl	Hamilton, εξάρτημα αρ. 235905
Αγώγιμα, μη αποστειρωμένα ρύγχη με φίλτρο των 300 µl	Hamilton, εξάρτημα αρ. 235903
Αγώγιμα, μη αποστειρωμένα ρύγχη με φίλτρο των 50 µl	Hamilton, εξάρτημα αρ. 235948

Αναλώσιμο	Προμηθευτής
<p>Δοχείο με βαθύ πυθμένα με τις ακόλουθες προδιαγραφές:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Μορφή μικροπλάκας SLAS 1–2004 με 96 βοθρία πυραμιδικού ή κωνικού πυθμένα και ελάχιστη χωρητικότητα 240 ml.</li> <li>• Πολυπροπυλένιο με προτίμηση για χαμηλή δέσμευση DNA για όλες τις επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με δείγματα.</li> <li>• Οι εσωτερικές διαστάσεις (στάθμη υγρού) είναι συμβατές με τα αυτοματοποιημένα βήματα αναρρόφησης και διανομής του VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Οι διαστάσεις ύψους είναι συμβατές με αυτοματοποιημένες κινήσεις του VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> </ul>	<p>Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου</p> <p>Συμβατές δεξαμενές:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Corning Axygen, αρ. προϊόντος RES-SW96-HP-SI</li> <li>• Agilent, αρ. προϊόντος 201246-100</li> </ul>
<p>Δοχείο αντιδραστηρίων με τις ακόλουθες προδιαγραφές:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Δοχείο που εφαρμόζει σταθερά, αλλά όχι βίαια, μέσα στον φορέα του VeriSeq NIPT Microlab STAR με κωνικό πυθμένα και ελάχιστη χωρητικότητα 20 ml.</li> <li>• Πολυπροπυλένιο ελεύθερο ριβονουκλεάσης (RNase) / δεοξυριβονουκλεάσης (DNase).</li> <li>• Οι εσωτερικές διαστάσεις της δεξαμενής (επίπεδο υγρού) δημιουργούν επίπεδα υγρού, χρησιμοποιώντας όγκους αντιδραστηρίων προσδιορισμού, που είναι συμβατά με τα αυτοματοποιημένα βήματα αναρρόφησης και διανομής του VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Οι διαστάσεις ύψους είναι συμβατές με αυτοματοποιημένες κινήσεις του VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> </ul>	<p>Συμβατά δοχεία:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Δοχείο αντιδραστηρίων Illumina, εξάρτημα αρ. 20095418</li> </ul>

Αναλώσιμο	Προμηθευτής
<p>Πλάκες με βοθρία μεγάλου βάθους με τις ακόλουθες προδιαγραφές:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Μορφή μικροπλάκας SLAS 1–2004, 3–2004, και 4–2004 με 96 βοθρία πυραμιδικού ή κωνικού πυθμένα και ελάχιστη χωρητικότητα βοθρίων 2 ml.</li> <li>• Ημιδιαφανές πολυπροπυλένιο, με προτίμηση για υλικό χαμηλής δέσμευσης DNA, για όλες τις επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με δείγματα.</li> <li>• Οι διαστάσεις των βοθρίων δημιουργούν μια στάθμη υγρού που είναι συμβατή με τα αυτοματοποιημένα βήματα αναρρόφησης και διανομής του VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Πλάκα με βάση πλαισίωσης (skirt) που επιτρέπει την τοποθέτηση γραμμωτών κωδικών στην πλάκα στην απαιτούμενη θέση με ασφαλή, επίπεδη πρόσφυση.</li> <li>• Σκελετός ανθεκτικός στη ροπή, ικανός να αντέξει τουλάχιστον 5.600 × g.</li> <li>• Οι διαστάσεις ύψους της πλάκας είναι συμβατές με τις αυτοματοποιημένες κινήσεις του VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> </ul>	<p>Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου</p> <p>Συμβατές πλάκες:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Eppendorf, εξάρτημα αρ. 0030505301</li> <li>• Eppendorf, εξάρτημα αρ. 30502302</li> <li>• USA Scientific, εξάρτημα αρ. 1896-2000</li> </ul>
<p>Πλάκα με 384 βοθρία με τις ακόλουθες προδιαγραφές:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Μικροπλάκα με 384 βοθρία, βελτιστοποιημένη για χαμηλούς όγκους, με ελάχιστη χωρητικότητα βοθρίων 50 μl.</li> <li>• Μαύρο αδιαφανές πολυστυρένιο με μπλοκάρισμα φωτός και χαμηλή δέσμευση DNA για όλες τις επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με δείγματα.</li> <li>• Οι διαστάσεις των βοθρίων δημιουργούν στάθμες υγρών που είναι συμβατές με τα αυτοματοποιημένα βήματα αναρρόφησης και διανομής του VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Οι διαστάσεις ύψους της πλάκας είναι συμβατές με αυτοματοποιημένες κινήσεις του VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Πλάκα με βάση πλαισίωσης (skirt) που επιτρέπει την τοποθέτηση γραμμωτών κωδικών στην πλάκα στην απαιτούμενη θέση με ασφαλή, επίπεδη πρόσφυση.</li> </ul>	<p>Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου</p> <p>Συμβατές πλάκες:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Corning, αρ. προϊόντος 3820</li> </ul>

Αναλώσιμο	Προμηθευτής
<p>Πλάκα με 96 βοθρία με τις ακόλουθες προδιαγραφές:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Μικροπλάκα με σκελετό ανθεκτικό στη ροπή που μπορεί να αντέξει τουλάχιστον 5.600 × g και 96 ημιδιαφανή βοθρία με κωνικούς πυθμένες, με ανυψωμένο χείλος, και ελάχιστη χωρητικότητα βοθρίων 150 μl.</li> <li>• Πολυπροπυλένιο που είναι ελεύθερο RNase/DNase με χαμηλή δέσμευση DNA για όλες τις επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με δείγματα.</li> <li>• Οι διαστάσεις των βοθρίων δημιουργούν στάθμες υγρών που είναι συμβατές με τα αυτοματοποιημένα βήματα αναρρόφησης και διανομής του VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Οι διαστάσεις ύψους της πλάκας είναι συμβατές με αυτοματοποιημένες κινήσεις του VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> </ul> <p><b>ΣΗΜΕΙΩΣΗ:</b> Συμβατά πλαστικά είδη με διαφορετικούς αριθμούς εξαρτήματος, π.χ. συμβατές πλάκες 96 βοθρίων άλλων κατασκευαστών, μπορεί να μην είναι απευθείας εναλλάξιμα χωρίς ειδική ρύθμιση παραμέτρων του συστήματος VeriSeq NIPT Microlab STAR για κάθε είδος από το προσωπικό σέρβις και υποστήριξης της Illumina. Για αλλαγή πλαστικών ειδών, συμβουλευτείτε την ομάδα υποστήριξης της Illumina.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Πλάκα με βάση πλαισίωσης (skirt) που επιτρέπει την τοποθέτηση γραμμωτών κωδικών στην πλάκα στην απαιτούμενη θέση με ασφαλή, επίπεδη πρόσφυση.</li> <li>• Συμβατή με θερμικούς κυκλοποιητές για αποδιάταξη.</li> </ul>	<p>Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου</p> <p>Συμβατές πλάκες:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Eppendorf, εξάρτημα αρ. 0030129512</li> <li>• Eppendorf, εξάρτημα αρ. 30129580</li> <li>• Eppendorf, εξάρτημα αρ. 30129598</li> <li>• Eppendorf, εξάρτημα αρ. 30129660</li> <li>• Eppendorf, εξάρτημα αρ. 30129679</li> <li>• Bio-Rad, εξάρτημα αρ. HSP9601</li> </ul>
<p>Μία από τις ακόλουθες σφραγίσεις:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Σφράγιση αλουμινίου Microseal 'F'</li> <li>• Σφραγίσεις αλουμινίου</li> </ul>	<p>Bio-Rad, αρ. καταλόγου MSF1001 Beckman Coulter, αρ. είδους 538619</p>
<p>Cell-Free DNA BCT CE</p>	<p>Streck, αρ. καταλόγου 218997</p>
<p>Πώματα ώθησης</p>	<p>Sarstedt, αρ. παραγγελίας 65.802</p>
<p>Σωληνάρια των 2 ml με βιδωτό πώμα</p>	<p>Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου</p>
<p>Ρύγχη με φίλτρο των 20 μl για πιπέτα των 20 μl</p>	<p>Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου</p>
<p>Ρύγχη με φίλτρο των 200 μl για πιπέτα των 200 μl</p>	<p>Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου</p>
<p>Ρύγχη με φίλτρο των 1.000 μl για πιπέτα των 1.000 μl</p>	<p>Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου</p>



Αναλώσιμο	Προμηθευτής
Ισοδύναμο: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Αλκοολούχο σπρέι ταχείας απολύμανσης</li> <li>• Διάλυμα απολυμαντικού απορρυπαντικού</li> </ul> Συνιστώμενο: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Απιονισμένο νερό και αιθανόλη 70%</li> </ul>	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου

## Προαιρετικά υλικά, δεν παρέχονται

Αναλώσιμο	Προμηθευτής
Ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα Dulbecco (DPBS) για αρνητικό μάρτυρα ελέγχου (no template control – NTC)	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Σωλήνας, βιδωτό πώμα, 10 ml (μόνο για δείγματα μάρτυρα)	Sarstedt, αρ. παραγγελίας 60.551
Σωλήνας, βιδωτό πώμα, 50 ml	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Ορολογικές πιπέτες των 25 ml	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Ορολογικές πιπέτες των 10 ml	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου

## Συλλογή, μεταφορά και αποθήκευση δειγμάτων



### ΠΡΟΣΟΧΗ

Χειρίζεστε όλα τα δείγματα ως δυνητικώς μολυσματικούς παράγοντες.

- Τα δείγματα ολικού αίματος 7–10 ml πρέπει να συλλέγονται σε Cell-Free DNA BCT της Streck. Μην καταψύχετε.
- Η μεταφορά των δειγμάτων ολικού αίματος πρέπει να γίνεται σύμφωνα με όλους τους εφαρμοστέους κανονισμούς για τη μεταφορά αιτιολογικών παραγόντων. Συνιστώνται οι τρόποι ταχείας αποστολής/μεταφοράς.
- Κατά τη μεταφορά, τα δείγματα πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασίες μεταξύ 4 °C και 30 °C. Μετά την παραλαβή των δειγμάτων, αποθηκεύστε τα στους 2 °C με 8 °C μέχρι να τα χρησιμοποιήσετε. Ο χρόνος μεταξύ της συλλογής αίματος και της αρχικής απομόνωσης πλάσματος δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τις 5 ημέρες.
- Σε περίπτωση που απαιτείται επανέλεγχος, τα δείγματα μετά την επεξεργασία μπορούν να επαναπαμιστούν και να αποθηκευτούν στους 4 °C για 5 επιπλέον ημέρες (συνολικά έως και 10 ημέρες μετά τη συλλογή αίματος).

**ΠΡΟΣΟΧΗ**

Η έκθεση σε αυξημένες θερμοκρασίες που υπερβαίνουν το προαναφερόμενο εύρος μπορεί να έχει αρνητική επίδραση στα ποσοστά επιτυχίας μεμονωμένων δειγμάτων ή/και στην απόδοση των δειγμάτων.

## Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

- Αυτός ο προσδιορισμός περιέχει πρωτεΐνωση Κ. Η εισπνοή, η κατάποση και η επαφή με το δέρμα ή τα μάτια μπορεί να προκαλέσουν τραυματισμό. Χρησιμοποιείτε σε καλά αεριζόμενο χώρο, φοράτε προστατευτικό ρουχισμό και απορρίπτετε τους περιέκτες και το αχρησιμοποίητο περιεχόμενο σύμφωνα με τα εφαρμοστέα κρατικά πρότυπα ασφάλειας.
- Αυτός ο προσδιορισμός περιέχει χλωριούχο γουανιδίνη. Η εισπνοή, η κατάποση και η επαφή με το δέρμα ή τα μάτια μπορεί να προκαλέσουν τραυματισμό. Χρησιμοποιείτε σε καλά αεριζόμενο χώρο, φοράτε προστατευτικό ρουχισμό και απορρίπτετε τους περιέκτες και το αχρησιμοποίητο περιεχόμενο σύμφωνα με τα εφαρμοστέα κρατικά τοπικά πρότυπα ασφάλειας.
- Αυτός ο προσδιορισμός περιέχει 2-προπανάλη, μια εύφλεκτη χημική ουσία. Κρατάτε τον μακριά από θερμότητα και γυμνή φλόγα. Η εισπνοή, η κατάποση και η επαφή με το δέρμα ή τα μάτια μπορεί να προκαλέσουν τραυματισμό. Χρησιμοποιείτε σε καλά αεριζόμενο χώρο, φοράτε προστατευτικό ρουχισμό και απορρίπτετε τους περιέκτες και το αχρησιμοποίητο περιεχόμενο σύμφωνα με τα εφαρμοστέα κρατικά τοπικά πρότυπα ασφάλειας.
- Αυτός ο προσδιορισμός περιέχει διμεθυλοσουλφοξείδιο, ένα διαβρωτικό και καύσιμο υγρό. Η εισπνοή, η κατάποση και η επαφή με το δέρμα ή τα μάτια μπορεί να προκαλέσουν τραυματισμό. Χρησιμοποιείτε σε καλά αεριζόμενο χώρο, φοράτε προστατευτικό ρουχισμό και απορρίπτετε τους περιέκτες και το αχρησιμοποίητο περιεχόμενο σύμφωνα με τα εφαρμοστέα κρατικά τοπικά πρότυπα ασφάλειας.
- Για την πρόληψη του σχηματισμού επιβλαβών αερίων, μην απορρίπτετε τα απόβλητα της εκχύλισης cfDNA (περιέχουν υδροχλωρική γουανιδίνη) μαζί με απόβλητα που περιέχουν χλωρίνη (υποχλωριώδες νάτριο).
- Χειρίζεστε όλα τα δείγματα σαν να περιέχουν δυνητικώς μολυσματικούς παράγοντες.
- Χρησιμοποιείτε συνήθεις εργαστηριακές προφυλάξεις. Μην χρησιμοποιείτε το στόμα σας για να αναρροφήσετε υγρά στην πιπέτα. Μην τρώτε, πίνετε ή καπνίζετε σε καθορισμένους χώρους εργασίας. Φοράτε γάντια μίας χρήσης και εργαστηριακή ρόμπα κατά τον χειρισμό δειγμάτων και αντιδραστηρίων προσδιορισμού. Πλένετε τα χέρια σας σχολαστικά μετά τον χειρισμό δειγμάτων και αντιδραστηρίων προσδιορισμού.
- Μην χρησιμοποιείτε τα εξαρτήματα του προσδιορισμού πέραν της ημερομηνίας λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα του κιβωτίου του προσδιορισμού. Μην εναλλάσσετε εξαρτήματα του προσδιορισμού από διαφορετικές παρτίδες προσδιορισμού. Οι παρτίδες προσδιορισμού προσδιορίζονται στην ετικέτα του κιβωτίου του προσδιορισμού. Αποθηκεύετε τα εξαρτήματα του προσδιορισμού στην καθορισμένη θερμοκρασία.

- Για την αποτροπή υποβάθμισης των δειγμάτων ή των αντιδραστηρίων, βεβαιωθείτε ότι όλοι οι ατμοί υδροξειδίου του νατρίου από τον καθαρισμό έχουν διαλυθεί πριν από την έναρξη του πρωτοκόλλου.
- Η μη τήρηση των διαδικασιών όπως περιγράφονται μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα αποτελέσματα ή σημαντική μείωση της ποιότητας των δειγμάτων.
- Αναφέρετε αμέσως τυχόν σοβαρά ατυχήματα που σχετίζονται με αυτό το προϊόν στην Illumina και στις αρμόδιες αρχές των κρατών μελών στα οποία είναι εγκατεστημένοι ο χρήστης και ο ασθενής.
- Για πληροφορίες σχετικά με το περιβάλλον, την υγεία και την ασφάλεια, ανατρέξτε στα φύλλα δεδομένων ασφαλείας (SDS), στη διεύθυνση [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).

## Σημειώσεις για τις διαδικασίες

### Αποτροπή επιμόλυνσης

- Χρησιμοποιείτε νέα ρύγχη και νέο αναλώσιμο εξοπλισμό εργαστηρίου.
- Χρησιμοποιείτε ανθεκτικά στο αερόλυμα ρύγχη για τη μείωση του κινδύνου μεταφοράς και επιμόλυνσης μεταξύ των δειγμάτων.
- Λόγω του ενδεχομένου επιμόλυνσης, απαιτείται πολύ μεγάλη προσοχή για να διασφαλιστεί η παραμονή όλου του περιεχομένου του βοθρίου εντός του βοθρίου. Μην προκαλείτε εκτίναξη του περιεχομένου. Εκτελείτε φυγοκέντρηση έπειτα από κάθε βήμα περιδίνησης.
- Ακολουθείτε τους ισχύοντες κανονισμούς που διέπουν την ορθή εργαστηριακή πρακτική και υγιεινή κατά τον χειρισμό αίματος και παραγώγων αίματος.
- Μην χρησιμοποιείτε σπρέι χλωρίνης με αερόλυμα κατά την εκτέλεση προετοιμασίας βιβλιοθηκών. Τα ίχνη επιμόλυνσης από χλωρίνη μπορεί να οδηγήσουν σε αποτυχία του προσδιορισμού.
- Όταν αφαιρείτε τη σφράγιση από οποιαδήποτε πλάκα, φροντίστε να τοποθετήσετε την πλάκα σε σταθερή και επίπεδη επιφάνεια, κρατώντας τη γερά. Αφαιρέστε αργά τη σφράγιση και διασφαλίστε ότι δεν έρχεται σε επαφή με τα ακάλυπτα βοθρία. Προσέξτε να μην αγγίξετε τα ακάλυπτα βοθρία και να μην αναταράξετε το περιεχόμενό τους. Η επιμόλυνση μεταξύ βοθρίων μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα αποτελέσματα.

### Καθαρισμός θαλάμου VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Πριν από τη χρήση, επιθεωρήστε τον θάλαμο για να δείτε εάν είναι καθαρός. Τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα, εκτελείτε την εβδομαδιαία συντήρηση και ακολουθείτε αυτές τις οδηγίες καθαρισμού.
- Αφαιρέστε όλους τους φορείς που δεν μπορούν να φέρουν φορτίο, καθαρίστε με αλκοολούχο σπρέι ταχείας απολύμανσης, απιονισμένο νερό και αιθανόλη 70% και αφήστε τους να στεγνώσουν. Εάν είναι πολύ βρόμικοι, εμβάψτε τους, στη συνέχεια, σε ένα διάλυμα απολυμαντικού απορρυπαντικού, εκπλύνετε με αλκοολούχο απολυμαντικό και αφήστε τους να στεγνώσουν.

- Ανοίξτε το πρόσθιο κάλυμμα και σκουπίστε τον θάλαμο με ένα πανί εμποτισμένο με απιονισμένο νερό και αιθανόλη 70%. Ιδίως τα μπλοκ ολίσθησης πρέπει να ελέγχονται για την καθαριότητα.
- Αφαιρέστε την πολλαπλή του βασικού συστήματος κενού (BVS, Basic Vacuum System) και καθαρίστε την πολλαπλή, το παρέμβυσμα και τα εσωτερικά διαμερίσματα του BVS με ένα πανί. Αποφύγετε να καθαρίσετε το παρέμβυσμα με αιθανόλη, καθώς μπορεί να διαβρώσει το υλικό.
- Αδειάστε τα απόβλητα ρύγχη για την κεφαλή CORE 96 και το ανεξάρτητο κανάλι.
- Αφαιρέστε την πλάκα εξώθησης ρύγχους του ανεξάρτητου καναλιού στον σταθμό αποβλήτων ρυγών και καθαρίστε την ψεκάζοντας απιονισμένο νερό και αιθανόλη 70% απευθείας πάνω στην επιφάνεια και σκουπίζοντας. Τραβήξτε μια νέα πλαστική σακούλα πάνω από τον σκελετό και επανατοποθετήστε την. Τοποθετήστε την καθαρή πλάκα εξώθησης ρύγχους ξανά στη θέση της.
- Ψεκάστε απιονισμένο νερό και αιθανόλη 70% απευθείας πάνω στην επιφάνεια του κουτιού αποβλήτων και του αγωγού της κεφαλής CORE 96 και σκουπίστε για να την καθαρίσετε.
  - Εάν είναι δύσκολο να αφαιρεθούν οι συσσωρευμένες ακαθαρσίες από τα ρύγχη, σκουπίστε με ένα πανί που έχετε υγράνει με νερό ελεύθερο DNase/RNase, μέχρι να αφαιρεθούν οι συσσωρευμένες ακαθαρσίες. Απορρίψτε το πανί καταλλήλως. Προχωρήστε στην αποστείρωση με το αλκοολούχο απολυμαντικό.
- Υγράνετε ένα πανί που δεν αφήνει χνούδι ή έναν βαμβακοφόρο στείλεό με αιθανόλη 70%. Καθαρίστε το παράθυρο του σαρωτή laser της συσκευής ανάγνωσης γραμμωτού κώδικα. Χρησιμοποιώντας το ίδιο πανί ή στείλεό, καθαρίστε κάθε βοθρίο του προσαρμογέα πλάκας CPAC. Εάν χρησιμοποιείτε πανί, πιέστε το πανί μέσα σε κάθε βοθρίο του προσαρμογέα χρησιμοποιώντας το πίσω μέρος ενός στυλό για να βεβαιωθείτε ότι το εσωτερικό του βοθρίου έχει καθαριστεί σωστά.
- Καθαρίστε τα ανεξάρτητα κανάλια:
  - Στα ανεξάρτητα κανάλια, καθαρίστε το περίβλημα εξώθησης ρύγχους (εξωτερικό τμήμα των καναλιών αναρρόφησης με πιπέτα) με ένα πανί που δεν αφήνει χνούδι εμποτισμένο με απιονισμένο νερό και αιθανόλη 70%. (Βλ. τον *Οδηγό αναφοράς Hamilton Microlab STAR αρ. 15070074.*)
  - Καθαρίστε τον δίσκο διακοπής και τους κυκλικούς δακτυλίους (εξωτερικό τμήμα των καναλιών αναρρόφησης με πιπέτα) με ένα πανί που δεν αφήνει χνούδι εμποτισμένο με απιονισμένο νερό και αιθανόλη 70%.
- Καθαρίστε την κεφαλή CORE 96:
  - Χρησιμοποιώντας το ίδιο πανί που δεν αφήνει χνούδι εμποτισμένο με απιονισμένο νερό και αιθανόλη 70%, καθαρίστε το περίβλημα της κεφαλής 96 και το κάτω μέρος των δίσκων διακοπής.
  - Χρησιμοποιώντας το ίδιο πανί ή μια σκισμένη λωρίδα πανιού που έχετε εμποτίσει με απιονισμένο νερό και αιθανόλη 70%, τρίψτε το πανί γύρω από τις πλευρές των καναλιών πιπέτας της κεφαλής 96 για να καθαρίσετε τους κυκλικούς δακτυλίους. Επαναλάβετε αυτήν τη διαδικασία για κάθε κανάλι πιπέτας στην κεφαλή 96.
- Ψεκάστε το πρόσθιο και το οπίσθιο κάλυμμα με απιονισμένο νερό και αιθανόλη 70% και σκουπίστε τα για να στεγνώσουν.

- Καθαρίστε την προστατευτική ταινία της μονάδας αυτόματης φόρτωσης με ένα πανί εμποτισμένο με απιονισμένο νερό και αιθανόλη 70% και σκουπίστε την χωρίς να ασκείτε πίεση.
- Όταν ο θάλαμος και τα εξαρτήματα στεγνώσουν εντελώς, επανατοποθετήστε τους φορείς.

**ΣΗΜΕΙΩΣΗ** Ο ακατάλληλος καθαρισμός και η λανθασμένη συντήρηση του ML STAR μπορεί να οδηγήσουν σε επιμόλυνση και ανεπαρκή απόδοση της μεθόδου προσδιορισμού.

## Έλεγχος ποιότητας

Ενδέχεται να αξιολογηθεί υλικό μάρτυρα με γνωστά χαρακτηριστικά απόδοσης ώστε να εντοπιστούν διαφορές στις διαδικασίες επεξεργασίας και στις τεχνικές διαδικασίες στο εργαστήριο.

Η εκτέλεση δείγματος μάρτυρα ή αρνητικού μάρτυρα ελέγχου μειώνει τον συνολικό αριθμό άγνωστων μητρικών δειγμάτων που μπορούν να υποβληθούν σε επεξεργασία με κάθε κιτ προετοιμασίας δειγμάτων.

Μην υπερβαίνετε τα δύο δείγματα NTC ανά παρτίδα 24 ή 48 δειγμάτων ή τα τέσσερα δείγματα NTC ανά παρτίδα 96 δειγμάτων.

## Οδηγίες χρήσης

### Συμβουλές και τεχνικές

Εάν δεν προσδιορίζεται σημείο ασφαλούς διακοπής στο πρωτόκολλο, προχωρήστε αμέσως στο επόμενο βήμα.

#### Επικόλληση γραμμωτών κωδίκων στις πλάκες

- Οι γραμμωτοί κωδικοί για τις πλάκες τύπου full skirt αρχίζουν με PL.
- Οι γραμμωτοί κωδικοί για τις πλάκες βοθρίων μεγάλου βάθους αρχίζουν με DW.
- Εφαρμόστε γραμμωτούς κώδικας σε πλάκες τύπου full skirt και πλάκες βοθρίων μεγάλου βάθους πλευρικά δίπλα στη στήλη 12.
- Φορτώστε τις πλάκες με τους γραμμωτούς κώδικες στραμμένους προς τα δεξιά για να είναι δυνατή η αυτοματοποιημένη σάρωση.

#### Σφράγιση και αφαίρεση σφράγισης της πλάκας

- Απαιτείται εξαιρετικά μεγάλη προσοχή για την αποφυγή της επιμόλυνσης – δεν πρέπει να υπάρχει καθόλου ορατό υγρό στην κάτω πλευρά της σφράγισης.
  - Βεβαιωθείτε ότι η ακάλυπτη κάτω πλευρά της σφράγισης δεν έρχεται σε επαφή με ακάλυπτα βοθρία.
  - Προσέξτε να μην αγγίξετε τα ακάλυπτα βοθρία.

- Σφραγίζετε πάντα την πλάκα 96 βοθρίων πριν εκτελέσετε τα παρακάτω βήματα στο πρωτόκολλο:
  - Βήματα φυγοκέντρησης
  - Βήματα θερμικής κυκλοποίησης
- Για να σφραγίσετε την πλάκα, εφαρμόστε το κάλυμμα αλουμινίου στην πλάκα και, στη συνέχεια, σφραγίστε. Βεβαιωθείτε ότι έχει εφαρμοστεί πίεση σε όλη την επιφάνεια της πλάκας και ότι κάθε μεμονωμένο βοθρίο έχει σφραγιστεί ερμητικά.
- Προτού αφαιρέσετε τη σφράγιση από την πλάκα, εκτελέστε τα παρακάτω βήματα:
  - Φυγοκεντρήστε σύντομα την πλάκα 96 βοθρίων σε ταχύτητα 1.000 × g για 20 δευτερόλεπτα.
  - Τοποθετήστε την πλάκα σε μια επίπεδη επιφάνεια και, στη συνέχεια, αφαιρέστε αργά τη σφράγιση.

### VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Πριν από τη χρήση, εκτελέστε και καταγράψτε την απαιτούμενη συντήρηση σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- Επιβλέπετε το ML STAR κατά τη διάρκεια των αυτοματοποιημένων βημάτων. Παρακολουθείτε τη διεπαφή του λογισμικού του προγράμματος διαχείρισης ροής εργασιών VeriSeq NIPT v2 για μηνύματα προτροπής και οδηγίες προς τον χειριστή.
- Διατηρείτε το πρόσθιο κάλυμμα στη θέση του κατά τη διάρκεια της λειτουργίας.
- Διατηρείτε τον θάλαμο μακριά από όλα τα στοιχεία κατά τη διάρκεια της λειτουργίας.
- Εάν εμφανιστεί το κουμπί επιλογής **Exclude** (Εξαιρέση) κατά τη διάρκεια χειρισμού ενός σφάλματος, μην το επιλέξετε σε καμία περίπτωση. Εάν η μέθοδος δεν μπορεί να συνεχιστεί μετά από ένα συμβάν χειρισμού σφάλματος ή εάν έχετε περιορισμένες επιλογές χειρισμού του σφάλματος, ματαιώστε την εκτέλεση.
- Κατά τη διάρκεια των σταδίων κενού της πλάκας, εάν σας ζητηθεί από το πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασιών VeriSeq NIPT v2, βοηθήστε χειροκίνητα για τη δημιουργία της σφράγισης μεταξύ της πλάκας και της πολλαπλής κενού.
- Αφήστε το σύστημα να αφαιρέσει τα ρύγχη από τον προσαρμογέα αυτόματα. Μην αφαιρείτε χειροκίνητα τα ρύγχη, εκτός εάν σας ζητηθεί από το λογισμικό.
- Αφαιρέστε τα αντιδραστήρια που καταναλώθηκαν και τα χρησιμοποιημένα αναλώσιμα όπως ζητείται από το πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασιών.
- Αδειάζετε τους περιέκτες αποβλήτων κενού καθημερινά. Ο πρώτος περιέκτης δεν θα πρέπει ποτέ να γεμίζει πάνω από το ήμισυ. Η υπερχείλιση της φιάλης αποβλήτων κενού μπορεί να προκαλέσει ζημιά στην αντλία κενού και να μειώσει το εφαρμοζόμενο κενό του συστήματος.
- Για παρτίδες 24, 48 και 96 δειγμάτων, φορτώστε ένα γεμάτο rack με ατομικά αριθμημένα ρύγχη 8 καναλιών, πριν από την έναρξη της μεθόδου.

# Επεξεργασία δειγμάτων

## Διαδικασία

1. Ολοκληρώστε τα παρακάτω βήματα για κάθε τμήμα:
  - a. Φυγοκεντρήστε τα δείγματα που φέρουν γραμμωτό κώδικα σε ταχύτητα  $1.600 \times g$  για 10 λεπτά στους  $4^\circ\text{C}$  με το φρένο απενεργοποιημένο.
  - b. Όταν η φυγόκεντρος σταματήσει πλήρως, αφαιρέστε τους σωλήνες δειγμάτων. Ξεκινήστε την απομόνωση του πλάσματος εντός 15 λεπτών μετά τη φυγοκέντρηση. Εάν περάσουν πάνω από 15 λεπτά, φυγοκεντρήστε ξανά.
2. Επιθεωρήστε την καταλληλότητα του δείγματος σε κάθε σωλήνα και επαληθεύστε ότι πληρούνται οι εξής απαιτήσεις:
  - Ο όγκος δείγματος είναι ο αναμενόμενος.
  - Υπάρχει σαφής και ορατός διαχωρισμός μεταξύ των στιβάδων ερυθρών αιμοσφαιρίων και πλάσματος στα δείγματα μετά τη φυγοκέντρηση.
  - Το επίπεδο του πλάσματος είναι τουλάχιστον 1,5 ml πάνω από τη λευκοκυτταρική στιβάδα (buffy coat).
  - Το δείγμα δεν έχει αιμολυθεί υπερβολικά (δηλ. το πλάσμα δεν είναι βαθύ κόκκινο στην όψη).
  - Το δείγμα δεν παρουσιάζει λιπαιμία (δηλ. το πλάσμα δεν έχει θολό λευκό χρώμα ή δεν είναι αδιαφανές με γαλακτώδες χρώμα).
  - Το δείγμα δεν παρουσιάζει πήγματα.



### ΠΡΟΣΟΧΗ

Τα δείγματα που υποβλήθηκαν σε ακατάλληλη αποθήκευση ή χειρισμό μπορεί να καταστούν ακατάλληλα. Εάν υποβληθούν σε επεξεργασία ακατάλληλα δείγματα μέσω της ροής εργασιών, μπορεί να προκαλέσουν απόφραξη της πλάκας δέσμευσης κατά τη διάρκεια της εκχύλισης, με αποτέλεσμα την υπερχειλίση δειγμάτων σε παρακείμενα βοθρία.

3. Αποπωματίστε τους σωλήνες και φορτώστε τους στους φορείς σωλήνων. Φορτώστε όλα τα δείγματα και τυχόν μάρτυρες πλάσματος για κάθε παρτίδα.



### ΠΡΟΣΟΧΗ

Εάν εμφανιστεί το κουμπί επιλογής Exclude (Εξαίρεση) κατά τη διάρκεια χειρισμού ενός σφάλματος, μην το επιλέξετε. Εάν η μέθοδος δεν μπορεί να συνεχιστεί μετά από ένα συμβάν χειρισμού σφάλματος και έχετε περιορισμένες επιλογές χειρισμού του σφάλματος, ματαιώστε την εκτέλεση.

# Απομόνωση πλάσματος

## Προετοιμασία

1. Επισημάνετε 1 πλάκα βοθρίων μεγάλου βάθους με την ένδειξη Intermediate Plasma (Ενδιάμεσο πλάσμα) και εφαρμόστε έναν γραμμωτό κώδικα.
2. Επισημάνετε 1 πλάκα βοθρίων μεγάλου βάθους με την ένδειξη Final Plasma (Τελικό πλάσμα) και εφαρμόστε έναν γραμμωτό κώδικα.
3. Για παρτίδες 24, 48 και 96 δειγμάτων, φορτώστε ένα γεμάτο rack με χωριστά αριθμημένα ρύγχη 8 καναλιών, πριν από την έναρξη της μεθόδου.



### ΠΡΟΣΟΧΗ

Βεβαιωθείτε ότι έχετε χρησιμοποιήσει τον σωστό τύπο πλάκας για τις πλάκες Intermediate Plasma (Ενδιάμεσο πλάσμα) και Final Plasma (Τελικό πλάσμα). Η χρήση δεξαμενής βοθρίων μεγάλου βάθους αντί πλάκας βοθρίων μεγάλου βάθους οδηγεί σε αμαλγάμωση των δειγμάτων και μπορεί να παραγάγει εσφαλμένα αποτελέσματα.

## Διαδικασία

1. Ανοίξτε το AppLauncher και επιλέξτε **VeriSeq NIPT Method** (Μέθοδος VeriSeq NIPT).
2. Εισαγάγετε ένα μοναδικό αναγνωριστικό παρτίδας (batch ID) και όνομα χρήστη και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.  
Το αναγνωριστικό παρτίδας μπορεί να περιέχει  $\leq 26$  χαρακτήρες. Μπορείτε να χρησιμοποιήσετε αριθμούς, γράμματα, κάτω παύλες (\_) ή παύλες (-). Για παράδειγμα: 2025-10-16\_Batch3.  
Στο αναγνωριστικό παρτίδας δεν εφαρμόζεται διάκριση πεζών-κεφαλαίων. Τα αναγνωριστικά παρτίδας με διάκριση πεζών-κεφαλαίων δεν θεωρούνται μοναδικά.  
Τα ονόματα των παρτίδων πρέπει να είναι μοναδικά και να μην διαφέρουν μόνο ως προς τη χρήση κεφαλαίων ή πεζών γραμμάτων. Για παράδειγμα, τα ονόματα Batch01 και batch01 δεν είναι μοναδικά. Ο ίδιος κανόνας ισχύει και για την ονοματοδοσία των αναγνωριστικών δειγμάτων.
3. Επιλέξτε **New Batch** (Νέα παρτίδα).
4. Μετά την έναρξη, επιλέξτε **OK** για να ξεκινήσει η απομόνωση του πλάσματος.
5. Επιλέξτε το μέγεθος παρτίδας και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
6. Επιλέξτε τον αριθμό αρνητικών μαρτύρων ελέγχου (no template controls – NTC) και επιλέξτε **OK**.  
Οι υποδοχές των NTC είναι πάντα οι τελευταίες υποδοχές που επιλέγονται. Για παράδειγμα, με δύο NTC σε μια εκτέλεση 24 δειγμάτων, οι θέσεις 23 και 24 είναι NTC.
7. Εκτελέστε ένα από τα παρακάτω βήματα:
  - Για να φορτώσετε ένα υπάρχον φύλλο δειγμάτων, επιλέξτε το φύλλο δειγμάτων που σχετίζεται με την παρτίδα και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
  - Για να προχωρήσετε χωρίς να επιλέξετε φύλλο δειγμάτων, επιλέξτε **No Sample Sheet** (Χωρίς φύλλο δειγμάτων).



Για πληροφορίες σχετικά με τη δημιουργία φύλλου δειγμάτων, ανατρέξτε στον *Οδηγό λογισμικού VeriSeq NIPT Solution v2* (αρ. εγγράφου 1000000067940).

**ΣΗΜΕΙΩΣΗ** Για να εξασφαλιστεί η σωστή ανάλυση των δεδομένων, ο τύπος δείγματος (μονήρες ή δίδυμο) πρέπει να καταγράφεται με ακρίβεια για κάθε δείγμα. Εάν επιλέξετε **No Sample Sheet** (Χωρίς φύλλο δειγμάτων), βεβαιωθείτε ότι ορίζετε προεπιλεγμένες τιμές δείγματος στα εργαλεία τεχνικής υποστήριξης του προγράμματος διαχείρισης ροής εργασιών. Για περισσότερες πληροφορίες ανατρέξτε στον *Οδηγό λογισμικού VeriSeq NIPT Solution v2* (αρ. εγγράφου 1000000067940).

8. Επιβεβαιώστε ότι έχουν επικολληθεί όλοι οι γραμμωτοί κώδικες και, στη συνέχεια, φορτώστε τα δείγματα, τα ρύγχη και τις πλάκες (με τον γραμμωτό κώδικα στραμμένο προς τα δεξιά) πάνω στον φορέα.
9. Επιλέξτε **OK** μετά από κάθε μήνυμα προτροπής για φόρτωση.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Αντικείμενο	Θέση εργαστηρίου
24, 48, 96	Ρύγχος πιπέττας	7–12	Ρύγχη πιπέττας των 1.000 μl	5
			Ρύγχη πιπέττας των 1.000 μl (μόνο για παρτίδα 96 δειγμάτων)	4, 5
	Σωλήνας	15	Προετοιμασμένοι σωλήνες δειγμάτων αίματος 1–24 (για όλα τα μεγέθη παρτίδων)	1–24
	Σωλήνας	16	Προετοιμασμένοι σωλήνες δειγμάτων αίματος 25–48 (μόνο μέγεθος παρτίδας 48 και 96)	25–48
	Σωλήνας	17	Προετοιμασμένοι σωλήνες δειγμάτων αίματος 49–72 (μόνο μέγεθος παρτίδας 96)	49–72
	Σωλήνας	18	Προετοιμασμένοι σωλήνες δειγμάτων αίματος 73–96 (μόνο μέγεθος παρτίδας 96)	73–96
	Multiflex	19–24	Κενή πλάκα βοθρίων μεγάλου βάθους, Τελικό πλάσμα – με γραμμωτό κώδικα	4
	Multiflex	19–24	Κενή πλάκα βοθρίων μεγάλου βάθους, Ενδιάμεσο πλάσμα – με γραμμωτό κώδικα	5
	Αντιδραστήριο	47	[Προαιρετικά] Ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα Dulbecco (DPBS) - χρήση ως αρνητικός μάρτυρας ελέγχου (no template control, NTC)	5

10. Βεβαιωθείτε ότι έχουν φορτωθεί σωστά οι φορείς, το εργαστηριακό υλικό και τα αντιδραστήρια.
11. Στην οθόνη Pre-Spin Deck Verification (Επαλήθευση θαλάμου πριν από την περιστροφή), επιλέξτε **OK**.
12. Επιτηρείτε το ML STAR όταν εκτελεί τα αυτοματοποιημένα βήματα.
13. Όταν σας ζητηθεί από το πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασιών, βεβαιωθείτε ότι ο θάλαμος φόρτωσης του ML STAR είναι απαλλαγμένος από εμπόδια ώστε το ML STAR να μπορέσει να εκφορτώσει τους φορείς.
14. Επιλέξτε **Unload** (Εκφόρτωση) για να εκφορτώσετε τον θάλαμο.
15. Αφαιρέστε την πλάκα βοθρίων μεγάλου βάθους Intermediate Plasma (Ενδιάμεσο πλάσμα) όπως περιγράφεται παρακάτω.
  - a. Επιθεωρήστε την πλάκα για να διαπιστώσετε εάν υπάρχει συνέπεια όσον αφορά τους όγκους σε κάθε βοθρίο (κανένα σφάλμα πιπέτας). Ο αναμενόμενος όγκος είναι 1.000 μl.

- b. Καταγράψτε τυχόν ασυνέπειες όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία απομόνωσης πλάσματος.
- c. Σφραγίστε την πλάκα, φορτώστε με ισορροπία και φυγοκεντρήστε σε ταχύτητα  $5.600 \times g$  για 10 λεπτά με το φρένο απενεργοποιημένο ή στη χαμηλότερη ρύθμιση.
16. Επιλέξτε **Yes** (Ναι) για να προχωρήσετε στην προετοιμασία του τελικού πλάσματος.
17. Αφαιρέστε τη σφράγιση της πλάκας και φορτώστε την ξανά επάνω στον φορέα.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Αντικείμενο	Θέση εργαστηρίου
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Πλάκα βοθρίων μεγάλου βάθους Intermediate Plasma (Ενδιάμεσο πλάσμα)	5

18. Επιλέξτε το πλαίσιο ελέγχου **Intermediate Plasma plate has been spun** [Η πλάκα Intermediate Plasma (Ενδιάμεσο πλάσμα) έχει περιστραφεί] και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
19. Επιτηρείτε το ML STAR όταν εκτελεί τα αυτοματοποιημένα βήματα.
20. Όταν σας ζητηθεί από το πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασιών, βεβαιωθείτε ότι ο θάλαμος φόρτωσης του ML STAR είναι απαλλαγμένος από εμπόδια ώστε το ML STAR να μπορέσει να εκφορτώσει τους φορείς.
21. Επιλέξτε **Unload** (Εκφόρτωση) για να εκφορτώσετε τον θάλαμο.
22. Όταν σας ζητηθεί από το πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασίας, αδειάστε τους φορείς και τον θάλαμο.
23. Αφαιρέστε την πλάκα βοθρίων μεγάλου βάθους Final Plasma (Τελικό πλάσμα).
24. Ελέγξτε την πλάκα για τα εξής σφάλματα:
- Συνέπεια των όγκων σε κάθε βοθρίο. Ο αναμενόμενος όγκος είναι 900 μλ.
  - Ορατά ιζήματα κυττάρων.
  - Υπερβολική αιμόλυση.
- Εάν παρατηρήσετε μη φυσιολογικά ορατά ιζήματα κυττάρων ή υπερβολική αιμόλυση, ακυρώστε το επηρεαζόμενο δείγμα μετά την ολοκλήρωση της μεθόδου απομόνωσης πλάσματος ή χρησιμοποιήστε το πρόγραμμα διαχείρισης παρτίδων. Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με το πρόγραμμα διαχείρισης παρτίδων, ανατρέξτε στον *Οδηγό λογισμικού VeriSeq NIPT Solution v2* (αρ. εγγράφου 1000000067940).
25. Όταν σας ζητηθεί από το πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασιών, επιλέξτε **OK**.
26. Εισαγάγετε σχόλια σχετικά με τα επηρεαζόμενα βοθρία και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
27. Εκτελέστε ένα από τα παρακάτω βήματα.
- Για να προχωρήσετε σε εκχύλιση cfDNA, επιλέξτε **Yes** (Ναι).
  - Για να διακόψετε, επιλέξτε **Exit** (Έξοδος).

### ΣΗΜΕΙΟ ΑΣΦΑΛΟΥΣ ΔΙΑΚΟΠΗΣ

Εάν διακόψετε, σφραγίστε την πλάκα Final Plasma (Τελικό πλάσμα) και αποθηκεύστε σε θερμοκρασία 2 °C έως 8 °C για έως 7 ημέρες.

## Εξαγωγή cfDNA

### Προετοιμασία

1. Επιθεωρήστε οπτικά τα κιβώτια εκχύλισης και παρελκομένων και βεβαιωθείτε ότι το κιτ δεν έχει λήξει.
2. Προετοιμάστε τα παρακάτω αντιδραστήρια. Επισημάνετε τα δοχεία των δεξαμενών και τις δεξαμενές βοθρίων μεγάλου βάθους με το όνομα των αντιδραστηρίων.

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες
Πλάκα βοθρίων μεγάλου βάθους Final Plasma (Τελικό πλάσμα)	2 °C έως 8 °C	Εάν ήταν αποθηκευμένη προηγουμένως, αφήστε τη να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Φυγοκεντρήστε σε ταχύτητα 1.000 × g για 20 δευτερόλεπτα. Αφαιρέστε τη σφράγιση της πλάκας βοθρίων μεγάλου μεγέθους Final Plasma (Τελικό πλάσμα) πριν από τη χρήση.

3. Προσθέστε αργά 3,75 ml Proteinase Buffer σε κάθε φιαλίδιο αντιδραστηρίου Proteinase K.
  - Προετοιμάστε 3 φιαλίδια για 24 και 48 δείγματα.
  - Προετοιμάστε 4 φιαλίδια για 96 δείγματα.

4. Πωματίστε τα φιαλίδια Proteinase K και περιδινήστε μέχρι να επανεναιωρηθούν.



#### ΠΡΟΣΟΧΗ

Μην επιμολύνετε το ελαστικό πώμα. Η επαφή άλλων ουσιών με το ελαστικό πώμα μπορεί να προκαλέσει επιμόλυνση μελλοντικών δειγμάτων.

5. Συγκεντρώστε την προετοιμασμένη πρωτεΐνάση K από όλα τα φιαλίδια σε ένα δοχείο αντιδραστηρίων και επισημάνετε το ως Proteinase K (Πρωτεΐνάση K).
6. Προσθέστε 100 ml EtOH 100% σε κάθε φιάλη αντιδραστηρίου Wash Buffer II.
  - Προετοιμάστε 1 φιάλη για 24 και 48 δείγματα.
  - Προετοιμάστε 2 φιάλες για 96 δείγματα.
7. Αναστρέψτε τις φιάλες Wash Buffer II για να αναμείξετε.
8. Σημειώστε τα πλαίσια ελέγχου στις φιάλες Wash Buffer II.
9. Επισημάνετε 1 νέα πλάκα τύπου full skirt με την ένδειξη Intermediate (Ενδιάμεσο) και εφαρμόστε γραμμωτό κώδικα στην πλάκα.
10. Επισημάνετε 1 νέα πλάκα τύπου full skirt με την ένδειξη cfDNA Elution (Έκλυση cfDNA) και εφαρμόστε έναν γραμμωτό κώδικα στην πλάκα.
11. Επισημάνετε 1 νέα πλάκα βοθρίων μεγάλου βάθους με την ένδειξη Extraction Intermediate (Εκχύλιση, Ενδιάμεσο) και εφαρμόστε έναν γραμμωτό κώδικα στην πλάκα βοθρίων μεγάλου βάθους.

12. Εφαρμόστε έναν γραμμωτό κώδικα στο DNA Binding Plate.
13. Εφαρμόστε σφράγιση αλουμινίου στα αχρησιμοποίητα βοθρία των παρτίδων 24 και 48 δειγμάτων.
14. Προετοιμάστε καθαριστικό διάλυμα EtOH 70% (70% EtOH, 30% νερό ελεύθερο DNase/RNase) για τον καθαρισμό του συστήματος κενού.
15. Προετοιμάστε το σύστημα κενού όπως περιγράφεται παρακάτω.
  - a. Αφαιρέστε την πολλαπλή κενού και καθαρίστε με 70% EtOH.  
Αποφύγετε να καθαρίσετε το παρέμβυσμα με EtOH διότι το υλικό μπορεί να καταστεί εύθραυστο.
  - b. Καθαρίστε τα απόβλητα κενού.
  - c. Βεβαιωθείτε ότι το σύστημα κενού του ML STAR είναι ενεργοποιημένο.

## Διαδικασία

1. Επιλέξτε **OK** για να ξεκινήσει η εκχύλιση cfDNA.
2. Εάν δεν είναι ανοιχτή η μέθοδος **VeriSeq NIPT Method**:
  - a. Ανοίξτε το AppLauncher και επιλέξτε **VeriSeq NIPT Method** (Μέθοδος VeriSeq NIPT).
  - b. Εισαγάγετε το αναγνωριστικό παρτίδας και το όνομα χρήστη και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
3. Φορτώστε τα ρύγχη στους φορείς ρυγχών όπως περιγράφεται παρακάτω και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.



### ΠΡΟΣΟΧΗ

Πριν από την έναρξη της μεθόδου για παρτίδες 24, 48 και 96 δειγμάτων, προσθέστε ένα γεμάτο rack ρυγχών 8 καναλιών.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Αντικείμενο	Θέση εργαστηρίου
24	Ρύγχος	1–6	Ρύγχη των 1.000 μl	1
		7–12	Ρύγχη των 300 μl	1
48	Ρύγχος	1–6	Ρύγχη των 1.000 μl	1, 2
		7–12	Ρύγχη των 300 μl	1
96	Ρύγχος	1–6	Ρύγχη των 1.000 μl	1, 2, 3, 4
		7–12	Ρύγχη των 300 μl	1

4. Φορτώστε τα μετρημένα ρύγχη στους φορείς ρυγχών όπως περιγράφεται παρακάτω.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Αντικείμενο	Θέση εργαστηρίου
24, 48, 96	Ρύγχος	49–54	Ρύγχη των 1.000 μl	1
			Ρύγχη των 300 μl	2
			Ρύγχη των 50 μl	3

5. Εισαγάγετε τη θέση του πρώτου και τελευταίου ρύγχους για κάθε rack ρυγχών και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
6. Σαρώστε τους γραμμωτούς κώδικες του κιβωτίου εκχύλισης.
7. Εισαγάγετε το όνομα χρήστη ή τα αρχικά του ατόμου που προετοιμάζει το αντιδραστήριο και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
8. Σαρώστε τους γραμμωτούς κώδικες του κιβωτίου παρελκομένων.
9. Εισαγάγετε το όνομα χρήστη ή τα αρχικά του ατόμου που προετοιμάζει το αντιδραστήριο και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
10. Επιβεβαιώστε ότι οι γραμμωτοί κώδικες είναι επικολλημένοι.
11. Αφαιρέστε τη σφράγιση της πλάκας βοθρίων μεγάλου βάθους Final Plasma (Τελικό πλάσμα), εάν χρειάζεται.
12. Φορτώστε τις πλάκες (με τον γραμμωτό κώδικα στραμμένο προς τα δεξιά) στον φορέα πλακών όπως υποδεικνύεται παρακάτω και επιλέξτε **OK**.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Αντικείμενο	Θέση εργαστηρίου
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Νέα πλάκα με βάση τύπου full skirt, Intermediate (Ενδιάμεσο), με γραμμωτό κώδικα	1
			Νέα πλάκα τύπου full skirt, cfDNA Elution (Έκλυση cfDNA), με γραμμωτό κώδικα	2
			Νέα πλάκα βοθρίων μεγάλου βάθους, Extraction Intermediate (Εκχύλιση, Ενδιάμεσο), με γραμμωτό κώδικα	4
			Πλάκα βοθρίων μεγάλου βάθους Final Plasma (Τελικό πλάσμα), με γραμμωτό κώδικα	5

13. Επιβεβαιώστε ότι το DNA Binding Plate φέρει γραμμωτό κώδικα και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
14. Για τις παρτίδες μερικών πλακών, εφαρμόστε μια περικεκομμένη σφράγιση πλάκας πάνω στα μη χρησιμοποιούμενα βοθρία (στήλες 4–12 για τις παρτίδες 24 δειγμάτων και στήλες 7–12 για τις παρτίδες 48 δειγμάτων).
15. Φορτώστε το DNA Binding Plate πάνω στην πολλαπλή κενού με τον γραμμωτό κώδικα στραμμένο προς τα δεξιά.
16. Πριν τοποθετήσετε την πλάκα δέσμησης στην πολλαπλή BVS, επιθεωρήστε οπτικά τα βοθρία για πιθανά εμπόδια.  
Αλλιώς, μπορεί να παρεμποδιστεί η ροή των αντιδραστηρίων κατά την εφαρμογή κενού.

17. Εάν χρησιμοποιείτε παρτίδες 24 ή 48 δειγμάτων, καλύψτε τα βοηθία που δεν χρησιμοποιούνται με σφράγιση αλουμινίου. Επιλέξτε το πλαίσιο ελέγχου **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (Οι στήλες του DNA Binding Plate είναι στεγανοποιημένες;) και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
18. Φορτώστε τα δοχεία αντιδραστηρίων στον φορέα αντιδραστηρίων όπως περιγράφεται παρακάτω και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Αντικείμενο	Θέση εργαστηρίου
24, 48	Αντιδραστήριο	47	16 ml Elution Buffer	1
			11 ml Proteinase K	2
96	Αντιδραστήριο	47	16 ml Elution Buffer	1
			15 ml Proteinase K	2

19. Μεταφέρετε τα καθορισμένα αντιδραστήρια στις δεξαμενές βοθρίων μεγάλου βάθους και, στη συνέχεια, φορτώστε τις δεξαμενές πάνω στους φορείς βοθρίων μεγάλου βάθους όπως υποδεικνύεται παρακάτω.
20. Επιλέξτε **OK**.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Αντικείμενο	Θέση εργαστηρίου
24, 48	Βοθρία μεγάλου βάθους	39–44	125 ml Wash Buffer II	1
			125 ml Wash Buffer I	2
			60 ml EtOH 100%	3
			100 ml Lysis Buffer	4
			60 ml νερό ελεύθερο DNase/RNase	5
96	Βοθρία μεγάλου βάθους	39–44	200 ml Wash Buffer II	1
			125 ml Wash Buffer I	2
			100 ml EtOH 100%	3
			100 ml Lysis Buffer	4
			100 ml νερό ελεύθερο DNase/RNase	5

21. Περιμένετε μέχρι να ολοκληρωθεί ο αυτοματοποιημένος έλεγχος όγκου αντιδραστηρίων
22. Επιβεβαιώστε ότι η φιάλη απόβλητων κενού είναι άδεια (συνιστάται να μην είναι γεμάτη πάνω από το μισό) και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
23. Επιβεβαιώστε την τοποθέτηση όλων των φορέων, του εργαστηριακού εξοπλισμού και των αντιδραστηρίων και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK** στην οθόνη Extraction Deck Verification (Επαλήθευση θαλάμου εκχύλισης).
24. Επιβλέπετε το ML STAR κατά τη διάρκεια των αυτοματοποιημένων βημάτων.

**ΠΡΟΣΟΧΗ**

Πρέπει να ακυρώσετε χειροκίνητα τις υπερχειλίσσεις δειγμάτων που δεν ανιχνεύονται από το σύστημα, προτού προκληθεί επιμόλυνση των παρακείμενων βοθρίων.

25. Μετά το τελικό βήμα κενού, αφαιρέστε το DNA Binding Plate και καθαρίστε την κάτω επιφάνεια με EtOH 70%.
26. Σφραγίστε τυχόν ακάλυπτα βοθρία στο DNA Binding Plate και, στη συνέχεια, τοποθετήστε το DNA Binding Plate στην κενή πλάκα βοθρίων μεγάλου βάθους Final Plasma (Τελικό πλάσμα).
27. Φυγοκεντρήστε το συγκρότημα DNA Binding Plate / πλάκας Final Plasma (Τελικό πλάσμα) σε ταχύτητα  $5.600 \times g$  για 10 λεπτά με το φρένο ενεργοποιημένο.
28. Επιλέξτε **OK**.
29. Κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρησης του DNA Binding Plate, ολοκληρώστε τον καθαρισμό κενού:
  - a. Αφαιρέστε την πολλαπλή κενού και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
  - b. Περιμένετε μέχρι να ολοκληρωθεί η αυτοματοποιημένη απόρριψη αποβλήτων.
  - c. Καθαρίστε την πολλαπλή κενού και το εσωτερικό του συστήματος κενού με EtOH 70% και, στη συνέχεια, επανατοποθετήστε την πολλαπλή κενού.
  - d. Επιλέξτε το πλαίσιο ελέγχου **Manifold is on Vacuum** (Η πολλαπλή είναι στη λειτουργία κενού) για να ξεκινήσει η μεταφορά της πλάκας έκλουσης στην πολλαπλή κενού και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
30. Μετά τη φυγοκέντρηση, αφαιρέστε τη σφράγιση από τα βοθρία που περιέχουν δείγματα στο DNA Binding Plate.
31. Τοποθετήστε το DNA Binding Plate πάνω από την πλάκα cfDNA Elution (Έκλουση cfDNA) που βρίσκεται στην πολλαπλή κενού.
32. Φορτώστε το DNA Binding Plate με τον γραμμωτό κώδικα στραμμένο προς τα δεξιά και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
33. Επιβλέπετε το ML STAR κατά τη διάρκεια των αυτοματοποιημένων βημάτων.
34. Μετά το βήμα επώασης, επιλέξτε το πλαίσιο ελέγχου **Plates are assembled as indicated** (Οι πλάκες είναι συγκεντρωμένες όπως υποδεικνύεται). Επιβεβαιώστε ότι το συγκρότημα των πλακών DNA Binding (Δέσμευση DNA)/cfDNA Elution (Έκλουση cfDNA) είναι τοποθετημένο σε βάση στήριξης (εάν απαιτείται από τη φυγόκεντρο).
35. Σφραγίστε τα ακάλυπτα βοθρία πάνω στο DNA Binding Plate.
36. Φυγοκεντρήστε σε ταχύτητα  $5.600 \times g$  για 2 λεπτά με το φρένο ενεργοποιημένο και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
37. Επιθεωρήστε οπτικά την πλάκα cfDNA Elution (Έκλουση cfDNA) και επιβεβαιώστε ότι υπάρχει συνέπεια όσον αφορά τους όγκους σε κάθε βοθρίο. Ο αναμενόμενος όγκος είναι περίπου 55 μl.
38. Σφραγίστε και διατηρήστε την πλάκα cfDNA Elution (Έκλουση cfDNA) για προετοιμασία βιβλιοθηκών.
39. Όταν σας ζητηθεί από το πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασιών, βεβαιωθείτε ότι ο θάλαμος φόρτωσης του ML STAR είναι απαλλαγμένος από εμπόδια ώστε το ML STAR να μπορέσει να εκφορτώσει τους φορείς.



40. Επιλέξτε **Unload** (Εκφόρτωση) για να εκφορτώσετε τον θάλαμο.
41. Εκφορτώστε όλους τους φορείς και καθαρίστε τον θάλαμο του ML STAR και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
42. Εισαγάγετε σχόλια σχετικά με τα επηρεαζόμενα βοηθία και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
43. Εκτελέστε ένα από τα παρακάτω βήματα:
  - Για να συνεχίσετε στην προετοιμασία βιβλιοθηκών, επιλέξτε **Yes** (Ναι).
  - Για να διακόψετε, επιλέξτε **Exit** (Έξοδος).

#### **ΣΗΜΕΙΟ ΑΣΦΑΛΟΥΣ ΔΙΑΚΟΠΗΣ**

Εάν διακόψετε, σφραγίστε την πλάκα cfDNA Elution (Έκλυση cfDNA) και αποθηκεύστε σε θερμοκρασία -25 °C έως -15 °C για έως 7 ημέρες.

## Προετοιμασία βιβλιοθηκών

### Προετοιμασία

1. Επιθεωρήστε οπτικά τα κιβώτια προετοιμασίας βιβλιοθηκών και παρελκομένων για να βεβαιωθείτε ότι τα κιτ δεν έχουν λήξει.
2. Προετοιμάστε τα παρακάτω αντιδραστήρια. Επισημάνετε τα δοχεία των δεξαμενών και τις δεξαμενές βοθρίων μεγάλου βάθους με τα ονόματα των αντιδραστηρίων.

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες
Μείγμα A-Tailing	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου. Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
Πλάκα cfDNA Elution (Έκλυση cfDNA)	-25 °C έως -15 °C	Εάν ήταν αποθηκευμένη προηγουμένως, επιβεβαιώστε ότι η πλάκα δεν αποθηκεύτηκε για πάνω από 7 ημέρες και αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου. Περιδινήστε σε ταχύτητα 1.500 rpm για 1 λεπτό. Φυγοκεντρήστε σε ταχύτητα 1.000 × g για 20 δευτερόλεπτα.
End Repair Mix	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου. Περιδινήστε για ανάμειξη.
Hybridization Buffer	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου. Περιδινήστε για ανάμειξη. <b>Επιστρέψτε το στην αποθήκευση μετά τη χρήση.</b>
Ligation Mix	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου. Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
NIPT DNA Adapter Plate	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου. Περιδινήστε για ανάμειξη. Φυγοκεντρήστε σε ταχύτητα 1.000 × g για 20 δευτερόλεπτα.
Resuspension Buffer	2 °C έως 8 °C	Περιδινήστε για ανάμειξη. <b>Επιστρέψτε το στην αποθήκευση μετά τη χρήση.</b>
Σφαιρίδια καθαρισμού δειγμάτων	2 °C έως 8 °C	Αφήστε τα να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Περιδινήστε δυνατά πριν από κάθε χρήση. Αναμείξτε με περιδίνηση ή αναστροφή μέχρι όλα τα σφαιρίδια να εναιωρηθούν και το μείγμα να γίνει ομοιογενές.

**ΠΡΟΣΟΧΗ**

Κατά την αφαίρεση της σφράγισης από το NIPT DNA Adapter Plate, απαιτείται εξαιρετικά μεγάλη προσοχή για την αποφυγή της επιμόλυνσης μεταξύ βοθρίων με αερόλυμα, καθώς κάτι τέτοιο μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα αποτελέσματα.

3. Εάν η πλάκα έκλουσης cfDNA είχε αποθηκευτεί σε κατάψυξη, ακολουθήστε τα παρακάτω βήματα για την προετοιμασία της.
  - a. Αποφύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.
  - b. Περιδινήστε σε ταχύτητα 1.500 rpm για 1 λεπτό.
  - c. Φυγοκεντρήστε σε ταχύτητα 1.000 × g για 20 δευτερόλεπτα.
4. Επισημάνετε μία νέα πλάκα τύπου full skirt με την ένδειξη «Βιβλιοθήκες» και εφαρμόστε γραμμωτό κώδικα στην πλάκα.
5. Ετοιμάστε διάλυμα EtOH 80% με απόλυτη EtOH. Συνδυάστε 40 ml EtOH 100% και 10 ml νερό ελεύθερο DNase/RNase. Αναστρέψτε για να αναμείξετε.
6. Βεβαιωθείτε ότι ο θερμικός έλεγχος του ML STAR είναι ενεργοποιημένος.

**Αραίωση ενζύμων**

1. Συνδυάστε A-Tailing Mix και Resuspension Buffer σε έναν σωλήνα με βιδωτό πώμα. Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Μείγμα A-tailing (μl)	Resuspension Buffer (μl)
24, 48	900	1200
96	1800	2400

2. Συνδυάστε Ligation Mix και Resuspension Buffer σε έναν σωλήνα με βιδωτό πώμα. Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Ligation Mix (μl)	Resuspension Buffer (μl)
24, 48	230	1713
96	440	3278

**Διαδικασία**

1. Επιλέξτε **OK** για να ξεκινήσει η προετοιμασία βιβλιοθηκών. Εάν η μέθοδος **VeriSeq NIPT Method** δεν είναι ήδη ανοικτή:
  - a. Ανοίξτε το AppLauncher και επιλέξτε **VeriSeq NIPT Method** (Μέθοδος VeriSeq NIPT).
  - b. Εισαγάγετε το αναγνωριστικό παρτίδας και το όνομα χρήστη και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
2. Επιβεβαιώστε ότι τα παρακάτω αναλώσιμα έχουν προετοιμαστεί όπως υποδεικνύεται στην οθόνη Reagent Preparation (Προετοιμασία αντιδραστηρίων):
  - A-Tailing Mix, Ligation Mix και EtOH 80%

- Sample Purification Beads, End Repair Mix και NIPT DNA Adapter Plate
3. Επιλέξτε τα πλαίσια ελέγχου και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
  4. Σαρώστε τους γραμμωτούς κώδικες του κιβωτίου προετοιμασίας βιβλιοθηκών.
  5. Εισαγάγετε το όνομα χρήστη ή τα αρχικά του ατόμου που προετοιμάζει το αντιδραστήριο και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
  6. Σαρώστε τους γραμμωτούς κώδικες του κιβωτίου παρελκομένων.
  7. Εισαγάγετε το όνομα χρήστη ή τα αρχικά του ατόμου που προετοιμάζει το αντιδραστήριο και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
  8. Φορτώστε τα ρύγχη στους φορείς ρυγχών όπως περιγράφεται παρακάτω και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK** για κάθε φορέα.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Αντικείμενο	Θέση εργαστηρίου
24	Ρύγχος	1-6	Ρύγχη των 50 μl	1
		7-12	Ρύγχη των 300 μl	1, 2
48	Ρύγχος	1-6	Ρύγχη των 50 μl	1, 2
		7-12	Ρύγχη των 300 μl	1, 2, 3, 4
96	Ρύγχος	1-6	Ρύγχη των 50 μl	1, 2, 3, 4
		7-12	Ρύγχη των 300 μl	1, 2, 3, 4, 5

9. Εάν διακόψατε το πρωτόκολλο μετά τη διαδικασία εκχύλισης cfDNA, φορτώστε τα μετρημένα ρύγχη στους φορείς ρυγχών όπως περιγράφεται παρακάτω.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Αντικείμενο	Θέση εργαστηρίου
24, 48, 96	Ρύγχος	49-54	Ρύγχη των 1.000 μl	1
			Ρύγχη των 300 μl	2
			Ρύγχη των 50 μl	3

10. Εισαγάγετε τη θέση του πρώτου ρύγχους για κάθε rack ρυγχών και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.

11. Επιβεβαιώστε ότι έχουν επικολληθεί οι γραμμωτοί κώδικες, φορτώστε τις πλάκες (με τον γραμμωτό κώδικα στραμμένο προς τα δεξιά) πάνω στον φορέα πλακών όπως περιγράφεται παρακάτω και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Αντικείμενο	Θέση εργαστηρίου
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Πλάκα έκλουσης cfDNA, με γραμμωτό κώδικα	1
			NIPT DNA Adapter Plate, με γραμμωτό κώδικα	2
			Νέα πλάκα 96 βοθρίων τύπου full skirt για προετοιμασία βιβλιοθηκών, με γραμμωτό κώδικα	3
			Νέες πλάκες 96 βοθρίων τύπου full skirt	4, 5

12. Φορτώστε τον φορέα βοθρίων μεγάλου βάθους όπως περιγράφεται παρακάτω και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Αντικείμενο	Θέση εργαστηρίου
24, 48, 96	Βοθρία μεγάλου βάθους	39–44	50 ml EtOH 80% σε δεξαμενή βοθρίων μεγάλου βάθους	1
			Νέες πλάκες 96 βοθρίων τύπου full skirt	2, 3, 4, 5

13. Φορτώστε τα δοχεία αντιδραστηρίων στον φορέα αντιδραστηρίων όπως περιγράφεται παρακάτω και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Αντικείμενο	Θέση εργαστηρίου
24, 48, 96	Αντιδραστήριο	47	2,5 ml End Repair Mix	1
			Προετοιμασμένο A-Tailing Mix (συνολικός όγκος)	2
			Προετοιμασμένο Ligation Mix (συνολικός όγκος)	3
			10 ml Sample Purification Beads	4
			12 ml Hybridization Buffer	5

14. Φυλάξτε την υπολειπόμενη ποσότητα του Hybridization Buffer 12 ml (HT1) μέσα στο δοχείο για χρήση κατά την ομαδοποίηση.
15. Βεβαιωθείτε ότι οι φορείς, ο εργαστηριακός εξοπλισμός και τα αντιδραστήρια έχουν φορτωθεί όπως υποδεικνύεται και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK** στην οθόνη Library Deck Verification (Επαλήθευση θαλάμου βιβλιοθήκης).
16. Περιμένετε μέχρι να ολοκληρωθεί ο αυτοματοποιημένος έλεγχος όγκου αντιδραστηρίων
17. Επιβλέπετε το ML STAR κατά τη διάρκεια των αυτοματοποιημένων βημάτων.
18. Όταν σας ζητηθεί από το πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασιών, βεβαιωθείτε ότι ο θάλαμος φόρτωσης του ML STAR είναι απαλλαγμένος από εμπόδια ώστε το ML STAR να μπορέσει να εκφορτώσει τους φορείς.
19. Επιλέξτε **Unload** (Εκφόρτωση) για να εκφορτώσετε τον θάλαμο.
20. Επιθεωρήστε την πλάκα Libraries (Βιβλιοθήκες) για να διαπιστώσετε εάν υπάρχει συνέπεια όσον αφορά τους όγκους σε κάθε βοθρίο.



#### ΠΡΟΣΟΧΗ

Εάν υπάρχει ασυνέπεια στους όγκους των βοθρίων, ο αυτοματοποιημένος έλεγχος ποιότητας των δειγμάτων μπορεί να αποτύχει.

21. Σε περίπτωση αποθήκευσης, σφραγίστε και διατηρήστε την πλάκα Libraries (Βιβλιοθήκες).
22. Εκφορτώστε τους φορείς, καθαρίστε τον θάλαμο και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
23. Εισαγάγετε σχόλια σχετικά με τα επηρεαζόμενα βοθρία και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
24. Εκτελέστε ένα από τα παρακάτω βήματα:
  - Για να συνεχίσετε στον ποσοτικό προσδιορισμό βιβλιοθηκών, επιλέξτε **Yes** (Ναι).
  - Για να διακόψετε, επιλέξτε **Exit** (Έξοδος).

#### ΣΗΜΕΙΟ ΑΣΦΑΛΟΥΣ ΔΙΑΚΟΠΗΣ

Εάν διακόψετε, σφραγίστε την πλάκα Libraries (Βιβλιοθήκες) πριν από την αποθήκευση. Η πλάκα Libraries (Βιβλιοθήκες) διατηρεί τη σταθερότητά της για έως 7 ημέρες από την ημερομηνία προετοιμασίας σε θερμοκρασία -25 °C έως -15 °C.

# Ποσοτικός προσδιορισμός βιβλιοθηκών

## Προετοιμασία

1. Προετοιμάστε τα παρακάτω αντιδραστήρια:

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες
DNA Quantification Reagent	2 °C έως 8 °C	Προστατεύετε από το φως. Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου για 30-150 λεπτά. (Συνιστάται η αφαίρεση αντιδραστηρίου στην αρχή της διαδικασίας προετοιμασίας βιβλιοθηκών.) Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
DNA Quantification Standard	2 °C έως 8 °C	Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
Resuspension Buffer	2 °C έως 8 °C	Περιδινήστε για ανάμειξη.

2. Εάν η πλάκα προετοιμασίας βιβλιοθηκών είχε αποθηκευτεί σε κατάψυξη, ακολουθήστε τα παρακάτω βήματα για την προετοιμασία της.
  - a. Επιβεβαιώστε ότι η πλάκα δεν αποθηκεύτηκε για περισσότερες από 7 ημέρες και αποψύξτε τη σε θερμοκρασία δωματίου.
  - b. Περιδινήστε για ανάμειξη
  - c. Φυγοκεντρήστε σε ταχύτητα 1.000 × g για 1 λεπτό.
3. Ενεργοποιήστε το φθορισμόμετρο 10 λεπτά πριν από τη χρήση.
4. Εφαρμόστε έναν γραμμωτό κώδικα πλάκας σε μια νέα πλάκα 384 βοθρίων.
5. Εφαρμόστε έναν γραμμωτό κώδικα πλάκας σε μια νέα πλάκα τύπου full skirt.

## Διαδικασία

1. Επιλέξτε **OK** για να ξεκινήσει ο ποσοτικός προσδιορισμός.
2. Εάν η μέθοδος VeriSeq NIPT δεν είναι ήδη ανοικτή:
  - a. Ανοίξτε το AppLauncher και επιλέξτε **VeriSeq NIPT Method** (Μέθοδος VeriSeq NIPT).
  - b. Εισαγάγετε το αναγνωριστικό παρτίδας και το όνομα χρήστη και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
3. Σαρώστε τους γραμμωτούς κώδικες του κιβωτίου παρελκομένων.
4. Εισαγάγετε το όνομα χρήστη ή τα αρχικά του ατόμου που προετοιμάζει το αντιδραστήριο και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.

5. Φορτώστε τα ρύγχη στον φορέα ρυγχών όπως περιγράφεται παρακάτω και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Αντικείμενο	Θέση εργαστηρίου
24, 48	Ρύγχος	1–6	Rack ρυγχών των 300 μl	1
			Rack ρυγχών των 50 μl	2
96	Ρύγχος	1–6	Rack ρυγχών των 300 μl	1
			Rack ρυγχών των 50 μl	2, 3

6. Επιβεβαιώστε ότι οι γραμμωτοί κώδικες είναι επικολλημένοι.  
 7. Εάν χρειάζεται, αφαιρέστε τη σφράγιση από την πλάκα προετοιμασίας βιβλιοθηκών.  
 8. Φορτώστε τις πλάκες (με τον γραμμωτό κώδικα στραμμένο προς τα δεξιά) στον φορέα Multiflex όπως περιγράφεται παρακάτω και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Αντικείμενο	Θέση εργαστηρίου
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Νέες πλάκες τύπου full skirt, με γραμμωτό κώδικα	1
			Νέα πλάκα 384 βοθρίων, με γραμμωτό κώδικα	2
			Πλάκα «Βιβλιοθήκες», με γραμμωτό κώδικα	3
			Νέες πλάκες 96 βοθρίων τύπου full skirt	4, 5

9. Φορτώστε τους σωλήνες αντιδραστηρίων χωρίς πώματα στον φορέα σωλήνων όπως περιγράφεται παρακάτω και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Αντικείμενο	Θέση εργαστηρίου
24, 48, 96	Σωλήνας	46	DNA Quantification Standard	1
			DNA Quantification Reagent	2

10. Φορτώστε τα δοχεία αντιδραστηρίων στον φορέα αντιδραστηρίων όπως περιγράφεται παρακάτω και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Αντικείμενο	Θέση εργαστηρίου
24, 48, 96	Αντιδραστήριο	47	Νέο δοχείο αντιδραστηρίων (κενό)	1
			16 ml Resuspension Buffer	2



11. Εάν διακόψατε το πρωτόκολλο μετά τη διαδικασία προετοιμασίας βιβλιοθηκών, φορτώστε τα μετρημένα ρύγχη στους φορείς ρυγχών όπως περιγράφεται παρακάτω.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Αντικείμενο	Θέση εργαστηρίου
24, 48, 96	Ρύγχος	49–54	Ρύγχη των 1.000 μl	1
			Ρύγχη των 300 μl	2
			Ρύγχη των 50 μl	3

12. Εισαγάγετε τη θέση του πρώτου και τελευταίου ρύγχους για κάθε rack ρυγχών και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
13. Βεβαιωθείτε ότι οι φορείς, ο εργαστηριακός εξοπλισμός και τα αντιδραστήρια έχουν φορτωθεί όπως υποδεικνύεται και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK** στην οθόνη Quant Deck Verification (Ποσοτική επαλήθευση θαλάμου).
14. Περιμένετε μέχρι να ολοκληρωθεί ο αυτοματοποιημένος έλεγχος όγκου αντιδραστηρίων
15. Επιβλέπετε το ML STAR κατά τη διάρκεια των αυτοματοποιημένων βημάτων.
16. Όταν σας ζητηθεί από το πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασιών, βεβαιωθείτε ότι ο θάλαμος φόρτωσης του ML STAR είναι απαλλαγμένος από εμπόδια ώστε το ML STAR να μπορέσει να εκφορτώσει τους φορείς.
17. Επιλέξτε **Unload** (Εκφόρτωση) για να εκφορτώσετε τον θάλαμο.
18. Φορτώστε την πλάκα Libraries (Βιβλιοθήκες).
- Επιθεωρήστε την πλάκα για να διαπιστώσετε εάν υπάρχει συνέπεια όσον αφορά τους όγκους σε κάθε βοθρίο.
  - Σφραγίστε την πλάκα Libraries (Βιβλιοθήκες) και αποθηκεύστε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να ολοκληρωθεί η φθορισμομετρική ανάλυση δεδομένων.
19. Εκφορτώστε τις υπόλοιπες πλάκες 96 βοθρίων και ελέγξτε εάν υπάρχει συνέπεια όσον αφορά τους όγκους σε κάθε βοθρίο.  
Εάν υπάρχουν μεγάλα σφάλματα στον όγκο, αυτό μπορεί να αποτελεί ένδειξη προβλήματος με τα βήματα μεταφοράς με πιπέτα.
20. Εκφορτώστε την πλάκα 384 βοθρίων και ελέγξτε εάν υπάρχει υγρό στα κατάλληλα βοθρία.
21. Σφραγίστε την πλάκα με σφράγιση αλουμινίου.
22. Φυγοκεντρήστε σε ταχύτητα 1.000 × g για 20 δευτερόλεπτα.
23. Επιάστε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά μακριά από το φως.
24. Εκφορτώστε όλους τους φορείς.
25. Καθαρίστε τον θάλαμο του ML STAR και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.



### ΠΡΟΣΟΧΗ

Μην απορρίπτετε τα αντιδραστήρια ποσοτικού προσδιορισμού μέχρι να ληφθούν δεδομένα. Θα χρειαστείτε τα αντιδραστήρια εάν χρειαστεί να εκτελέσετε εκ νέου ποσοτικό προσδιορισμό.

26. Μετά την επώαση, αφαιρέστε τη σφράγιση αλουμινίου και φορτώστε την πλάκα 384 βοθρίων στη συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών. Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείτε τη μοβ πλάκα προσαρμογέα (αριθμός εξαρτήματος: 0310-4336) που παρέχεται από τη Molecular Devices ή ισοδύναμη, κατά περίπτωση, ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο όργανο.
  - Βεβαιωθείτε ότι το A1 βρίσκεται στην επάνω αριστερή γωνία κατά τη φόρτωση.
27. Κάντε διπλό κλικ στο πρότυπο VeriSeq NIPT για να το ανοίξετε σε SoftMax Pro.
28. Επιλέξτε **New Experiment** (Νέο πείραμα) στην καρτέλα Home (Αρχική).
29. Επιλέξτε **Read** (Ανάγνωση).
30. Εξαγάγετε τα δεδομένα ως XML όπως περιγράφεται παρακάτω.
  - a. Κάντε δεξί κλικ στο **Plate** (Πλάκα) και επιλέξτε **Rename** (Μετονομασία).
  - b. Σαρώστε τον γραμμωτό κώδικα της πλάκας Quantification (Ποσοτικός προσδιορισμός) και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
  - c. Στην επάνω αριστερή γωνία της οθόνης, επιλέξτε το εικονίδιο πλάκας και, στη συνέχεια, επιλέξτε **Export** (Εξαγωγή) από το μενού.
  - d. Επιλέξτε το πλαίσιο επιλογής **Expt name** (Όνομα εξαγ.), ορίστε την επιλογή ημερομηνίας πλάκας σε raw, ορίστε τη μορφή εξόδου σε XML και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
  - e. Ορίστε διαδρομή αρχείου εξόδου και ονομάστε το αρχείο και, στη συνέχεια, επιλέξτε **Save** (Αποθήκευση).

Ο υπολογιστής Hamilton πρέπει να μπορεί να έχει πρόσβαση στην τοποθεσία του αρχείου. Μην χρησιμοποιείτε κενά στο όνομα αρχείο ή στη διαδρομή αρχείου.

## Ανάλυση

1. Στο ML STAR, στην οθόνη Scanner Information (Πληροφορίες σαρωτή), εισαγάγετε το αναγνωριστικό φθορισμόμετρου.
2. Εισαγάγετε σχόλια σχετικά με την εκτέλεση φθορισμόμετρου και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
3. Μεταβείτε στο αρχείο ποσοτικού προσδιορισμού \*.xml που περιέχει τα φθορισμομετρικά δεδομένα και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
4. Εξετάστε τα αποτελέσματα της ανάλυσης για την πρότυπη καμπύλη και τη συγκέντρωση δείγματος και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
5. Εάν πρέπει να σαρώσετε ξανά την πλάκα, επιλέξτε **Rescan** (Εκ νέου σάρωση). Τα δείγματα είναι ευαίσθητα στον χρόνο και στο φως. Όταν χρειάζεται, η εκ νέου σάρωση πρέπει να εκτελείται αμέσως.
6. Εισαγάγετε σχόλια σχετικά με τα επηρεαζόμενα βοθρία και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.

7. Αξιολογήστε τα αποτελέσματα και προχωρήστε όπως περιγράφεται παρακάτω.
- Εάν τα αποτελέσματα πληρούν τις προδιαγραφές, προχωρήστε σε [Ομαδοποίηση βιβλιοθηκών στη σελίδα 43](#). Για τις προδιαγραφές, ανατρέξτε στον πίνακα με τις μετρήσεις και τα όρια ποιοτικού ελέγχου ποσοτικού προσδιορισμού στον *Οδηγό λογισμικού VeriSeq NIPT Solution v2 (αρ. εγγράφου 1000000067940)*.
  - Εάν τα αποτελέσματα δεν συμφωνούν με τις προδιαγραφές, το σύστημα ματαιώνει τη μέθοδο. Επαναλάβετε τις διαδικασίες ποσοτικού προσδιορισμού ξεκινώντας με την [Προετοιμασία στη σελίδα 39](#).
8. Εκτελέστε ένα από τα παρακάτω βήματα:
- Για να προχωρήσετε σε [Ομαδοποίηση βιβλιοθηκών στη σελίδα 43](#), επιλέξτε **Yes** (Ναι).
  - Για να διακόψετε, επιλέξτε **Exit** (Έξοδος).

### ΣΗΜΕΙΟ ΑΣΦΑΛΟΥΣ ΔΙΑΚΟΠΗΣ

Εάν διακόψετε, σφραγίστε την πλάκα Libraries (Βιβλιοθήκες) πριν από την αποθήκευση. Η πλάκα Libraries (Βιβλιοθήκες) διατηρεί τη σταθερότητά της για έως 7 ημέρες συνολικής αποθήκευσης σε θερμοκρασία -25 °C έως -15 °C.

## Ομαδοποίηση βιβλιοθηκών

### Προετοιμασία

1. Προετοιμάστε τα παρακάτω αντιδραστήρια:

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες
Ρυθμιστικό διάλυμα υβριδισμού	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου. Περιδινήστε για ανάμειξη. Επιστρέψτε το στην αποθήκευση μετά τη χρήση.

2. Εάν η πλάκα προετοιμασίας βιβλιοθηκών είχε αποθηκευτεί σε κατάψυξη, ακολουθήστε τα παρακάτω βήματα για την προετοιμασία της.
- Επιβεβαιώστε ότι η πλάκα δεν αποθηκεύτηκε για περισσότερες από 7 ημέρες και αποψύξτε τη σε θερμοκρασία δωματίου.
  - Περιδινήστε σε ταχύτητα 1.500 rpm για 1 λεπτό.
  - Φυγοκεντρήστε σε ταχύτητα 1.000 × g για 20 δευτερόλεπτα.
  - Πιπετάρετε για ανάμειξη.
3. Επισημάνετε έναν κενό σωλήνα ομαδοποίησης με την ένδειξη «Ομάδα Α». Για 96 δείγματα, επισημάνετε έναν δεύτερο κενό σωλήνα ομαδοποίησης με την ένδειξη «Ομάδα Β».

4. Αποθηκεύστε το παρακάτω πρόγραμμα αποδιάταξης στον θερμικό κυκλοποιητή με θερμασμένο καπάκι.
  - a. Επιλέξτε την επιλογή προθερμασμένου καπακιού και ορίστε τη θερμοκρασία τους 102 °C.
  - b. Ορίστε τον όγκο αντίδρασης στα 50 μl.
  - c. Ορίστε τον ρυθμό μεταβολής θερμοκρασίας στη μέγιστη ρύθμιση ( $\geq 2$  °C ανά δευτερόλεπτο).
  - d. Επώαστε στους 96 °C για 10 λεπτά και, στη συνέχεια, στους 4 °C για 5 δευτερόλεπτα.
  - e. Διατηρήστε στους 4 °C.

## Διαδικασία

1. Τοποθετήστε την πλάκα Libraries (Βιβλιοθήκες) πάνω στον εκ των προτέρων προγραμματισμένο θερμικό κυκλοποιητή και εκτελέστε το πρόγραμμα αποδιάταξης.  
Μην εκτελείτε αποδιάταξη της πλάκας Libraries (Βιβλιοθήκες) προτού ο ποσοτικός προσδιορισμός ολοκληρώσει επιτυχώς τις μετρήσεις ποιοτικού ελέγχου, καθώς μπορεί να θέλετε να εκτελέσετε ξανά ποσοτικό προσδιορισμό.
2. Φυγοκεντρήστε την πλάκα Libraries (Βιβλιοθήκες) σε ταχύτητα 1.000 × g για 20 δευτερόλεπτα.
3. Επιλέξτε **OK**, για να ξεκινήσει η ομαδοποίηση των βιβλιοθηκών.
4. Εάν δεν είναι ανοιχτή η μέθοδος VeriSeq NIPT:
  - a. Ανοίξτε το AppLauncher και επιλέξτε **VeriSeq NIPT Method** (Μέθοδος VeriSeq NIPT).
  - b. Εισαγάγετε το αναγνωριστικό παρτίδας και το όνομα χρήστη και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
5. Επιλέξτε τη συγκέντρωση ομαδοποίησης και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.  
Η στοχευόμενη πυκνότητα συστάδων είναι 220–260 K/mm<sup>2</sup>.

**ΣΗΜΕΙΩΣΗ** Οι συγκεντρώσεις ή/και οι όγκοι για την ομαδοποίηση μπορεί να χρειαστεί να αυξηθούν για παρτίδες 24 δειγμάτων, προκειμένου να διατηρηθούν παρόμοιες πυκνότητες συστάδων με εκείνες που λαμβάνονται με τις παρτίδες 48/96 δειγμάτων.

6. Εάν σας ζητηθεί από το πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασίας, εκτελέστε ένα από τα παρακάτω βήματα:
  - Για να φορτώσετε ένα φύλλο δειγμάτων, επιλέξτε το φύλλο δειγμάτων που σχετίζεται με την παρτίδα και, στη συνέχεια, επιλέξτε **Load** (Φόρτωση).
  - Για να χρησιμοποιήσετε τις προεπιλεγμένες τιμές του συστήματος για τους υπόλοιπους τύπους δείγματος, την αναφορά φύλλου ή τον τύπο εξέτασης ανίχνευσης, επιλέξτε **Use Default** (Χρήση προεπιλογής) για κάθε ρύθμιση.  
Για πληροφορίες σχετικά με τη δημιουργία φύλλου δειγμάτων, ανατρέξτε στον *Οδηγό λογισμικού VeriSeq NIPT Solution v2* (αρ. εγγράφου 1000000067940).

7. Επιλέξτε **Start** (Έναρξη) για να ξεκινήσει το χρονόμετρο για την αποδιάταξη της πλάκας.
8. Φορτώστε τα ρύγχη στους φορείς ρυγχών όπως περιγράφεται παρακάτω.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Αντικείμενο	Θέση εργαστηρίου
24, 48, 96	Ρύγχος	7–12	Ρύγχη με φίλτρο των 50 μl	1

9. Φορτώστε την πλάκα Denatured Library (Αποδιατεταγμένη βιβλιοθήκη) (με τον γραμμωτό κώδικα στραμμένο προς τα δεξιά) στον φορέα Multiflex όπως περιγράφεται παρακάτω και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Αντικείμενο	Θέση εργαστηρίου
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Πλάκα Denatured Library (Αποδιατεταγμένη βιβλιοθήκη) (με γραμμωτό κώδικα)	1

10. Φορτώστε τους σωλήνες ομαδοποίησης στον φορέα σωλήνων όπως περιγράφεται παρακάτω και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Αντικείμενο	Θέση εργαστηρίου
24, 48	Σωλήνας	46	Νέος σωλήνας 2 ml, ομάδα A	1
96	Σωλήνας	46	Νέος σωλήνας 2 ml, ομάδα A	1
			Νέος σωλήνας 2 ml, ομάδα B	2

11. Φορτώστε τα δοχεία αντιδραστηρίων στον φορέα αντιδραστηρίων όπως περιγράφεται παρακάτω και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Αντικείμενο	Θέση εργαστηρίου
24, 48, 96	Αντιδραστήριο	47	3 ml Hybridization Buffer	1

12. Φορτώστε τα ρύγχη στους φορείς ρυγχών όπως περιγράφεται παρακάτω.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Αντικείμενο	Θέση εργαστηρίου
24, 48, 96	Ρύγχος	49–54	Ρύγχη με φίλτρο των 1.000 μl	1
			Ρύγχη με φίλτρο των 300 μl	2
			Ρύγχη με φίλτρο των 50 μl	3

13. Εισαγάγετε τη θέση του πρώτου και τελευταίου ρύγχους για κάθε rack ρυγχών και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.

14. Βεβαιωθείτε ότι οι φορείς, το εργαστηριακό υλικό και τα αντιδραστήρια έχουν φορτωθεί με τον ενδεδειγμένο τρόπο.
15. Στην οθόνη Pooling Deck Verification (Επαλήθευση θαλάμου ομαδοποίησης), επιλέξτε **OK**.
16. Επιβλέπετε το ML STAR κατά τη διάρκεια των αυτοματοποιημένων βημάτων.
17. Εισαγάγετε σχόλια για τα επηρεαζόμενα βοηθία και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
18. Όταν σας ζητηθεί από το πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασιών, βεβαιωθείτε ότι ο θάλαμος φόρτωσης του ML STAR είναι απαλλαγμένος από εμπόδια ώστε το ML STAR να μπορέσει να εκφορτώσει τους φορείς.
19. Επιλέξτε **Unload** (Εκφόρτωση) για να εκφορτώσετε τον θάλαμο.
20. Εκφορτώστε τον φορέα σωλήνων.
21. Πωματίστε κάθε σωλήνα ομαδοποίησης, περιδινήστε και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε σύντομα.
22. Επιλέξτε **OK**.
23. Αλληλουχίστε τις βιβλιοθήκες το συντομότερο δυνατόν μετά την ομαδοποίηση. Σφραγίστε την πλάκα προετοιμασίας βιβλιοθηκών και αποθηκεύστε τη σε θερμοκρασία  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  έως  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  μέχρι και για 7 ημέρες, ώστε να καταστεί δυνατή η εκ νέου ομαδοποίηση.

#### ΣΗΜΕΙΟ ΑΣΦΑΛΟΥΣ ΔΙΑΚΟΠΗΣ

Εάν διακόψετε, πωματίστε τους σωλήνες ομαδοποίησης και αποθηκεύστε σε θερμοκρασία  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  έως  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  για έως 7 ημέρες.

## Προετοιμασία ομαδοποιημένων βιβλιοθηκών για αλληλούχιση

### Προετοιμασία

1. Προετοιμάστε τα παρακάτω αντιδραστήρια:

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες
Ομαδοποίηση σωλήνων	$-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ έως $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$	Εάν ήταν προηγουμένως αποθηκευμένοι, αποφύγετε για να έλθουν σε θερμοκρασία δωματίου. Περιδινήστε σύντομα. Φυγοκεντρήστε σύντομα.

2. Προετοιμάστε το σύστημα αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS) συμπληρώνοντας τα παρακάτω πεδία στο module του Local Run Manager VeriSeq NIPT:
  - a. Run Name (Όνομα εκτέλεσης)
  - b. [Προαιρετικά] Run Description (Περιγραφή εκτέλεσης)
  - c. Pool Barcode (Γραμμωτός κωδικός ομάδας δειγμάτων)



## ΠΡΟΣΟΧΗ

Ο γραμμωτός κώδικας ομάδας που εισάγεται στο module του Local Run Manager πρέπει να αντιστοιχεί στον γραμμωτό κώδικα ομάδας που έχει εισαχθεί στο πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασίας. Οι εσφαλμένες ρυθμίσεις εκτέλεσης απορρίπτονται από το λογισμικό ανάλυσης και απαιτείται επανάληψη της αλληλούχισης.

Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τη χρήση του module του Local Run Manager VeriSeq NIPT, ανατρέξτε στον *Οδηγό λογισμικού VeriSeq NIPT Solution v2* (αρ. εγγράφου 1000000067940).

## Διαδικασία

1. Συνδυάστε τους ακόλουθους όγκους στην κασέτα αντιδραστηρίων και, στη συνέχεια, χρησιμοποιήστε πιπέτα για να αναμείξετε.
  - Hybridization Buffer (900 μl)
  - 450 μl Ομάδα A (450 μl)
2. Προχωρήστε στην εκτέλεση της αλληλούχισης, χρησιμοποιώντας τον οδηγό αναφοράς για το όργανο αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS) που έχετε στην κατοχή σας. Για όργανα NextSeq 550Dx, ανατρέξτε στον *Οδηγό αναφοράς οργάνου NextSeq 550Dx* (αρ. εγγράφου 1000000009513) (ή ανατρέξτε στο κατάλληλο ένθετο συσκευασίας που παρατίθεται στη σελίδα υποστήριξης της Illumina στη διεύθυνση [www.support.illumina.com](http://www.support.illumina.com)).
3. Επιβεβαιώστε ότι η εκτέλεση έχει διαμορφωθεί κατάλληλα, όταν εμφανιστεί το σχετικό μήνυμα προτροπής.
4. Εάν είναι απαραίτητο, επαναλάβετε αυτήν τη διαδικασία για την Ομάδα B.
  - Για να επιτύχετε το στοχευόμενο εύρος πυκνότητας συστάδων, η πλάκα «Βιβλιοθηκών» μπορεί να υποβληθεί εκ νέου σε ομαδοποίηση με τη χρήση διαφορετικής συγκέντρωσης ομαδοποίησης στο Hamilton H εκ νέου ομαδοποίηση ακυρώνει την αρχική ομάδα.
  - Εναλλακτικά, ο λόγος της ομάδας προς το HT1 (450 μl + 900 μl) μπορεί να τροποποιηθεί για την επίτευξη του στοχευόμενου εύρους πυκνότητας συστάδων.

## Αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS)

Το VeriSeq NIPT Solution v2 μπορεί να χρησιμοποιηθεί με σύστημα αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS) με τις παρακάτω προδιαγραφές:

- Δυνατότητα 2x36 αναγνώσεων συζευγμένων άκρων
- Συμβατό με τους προσαρμογείς ευρετηρίου του κιτ προετοιμασίας δειγμάτων VeriSeq NIPT Sample Prep Kit
- Χημική ανάλυση δύο καναλιών
- Αυτόματη παραγωγή αρχείων BCL (\*.bcl) (ακατέργαστα δεδομένα από όργανο αλληλούχισης)
- 400 εκατομμύρια αναγνώσεις αλληλούχισης συζευγμένων άκρων ανά εκτέλεση

- Συμβατό με το λογισμικό VeriSeq NIPT Assay Software v2
- Το NextSeq 550Dx είναι συμβατό με το VeriSeq NIPT Solution v2

## Ανάλυση δεδομένων αλληλουχίας

Μόλις ολοκληρωθεί η αλληλούχιση, τα δεδομένα αλληλούχισης αποστέλλονται αυτόματα στο λογισμικό VeriSeq NIPT Assay Software v2 για ανάλυση και δημιουργία αναφοράς. Η αναφορά περιλαμβάνει ταξινομήσεις για κάθε δείγμα της παρτίδας, καθώς και αξιολόγηση όλων των μετρήσεων ελέγχου ποιότητας της εκτέλεσης. Η διαδικασία ανάλυσης από την ολοκλήρωση της αλληλούχισης μέχρι τα τελικά αποτελέσματα διαρκεί περίπου 4 ώρες για μια παρτίδα 48 δειγμάτων. Για αναλυτικές πληροφορίες σχετικά με την ανάλυση δειγμάτων και το αρχείο εξόδου, ανατρέξτε στον *Οδηγό λογισμικού VeriSeq NIPT Solution v2* (αρ. εγγράφου 1000000067940).

## Ερμηνεία αποτελεσμάτων

Ο αλγόριθμος του VeriSeq NIPT Solution v2 χρησιμοποιεί ένα εξελεγμένο στατιστικό μοντέλο που συνδυάζει αρκετούς διαφορετικούς τύπους πληροφοριών από τη συλλογή τμημάτων βιβλιοθηκών που έχουν υποστεί αλληλούχιση συζευγμένων άκρων. Αυτό το μοντέλο χρησιμοποιείται για την ανίχνευση περιοχών του γονιδιώματος που υποεκπροσωπούνται ή υπερεκπροσωπούνται στη βιβλιοθήκη κάθε δείγματος. Πολύ σημαντικό είναι το γεγονός ότι αυτό το μοντέλο εξετάζει εάν ο βαθμός υποεκπροσώπησης ή υπερεκπροσώπησης συνάδει ποσοτικά με ανευπλοειδία στο εμβρυϊκό γονιδίωμα στο επίπεδο του εμβρυϊκού κλάσματος που εκτιμήθηκε για τη βιβλιοθήκη.

Για όλα τα χρωμοσώματα, τα δεδομένα αλληλούχισης συζευγμένων άκρων ευθυγραμμίζονται με το γονιδίωμα αναφοράς (HG19). Οι μοναδικές, μη διπλότυπες ευθυγραμμισμένες αναγνώσεις συγκεντρώνονται σε οριοθετημένες κατηγορίες των 100 kb. Οι μετρήσεις της αντίστοιχης οριοθετημένης κατηγορίας προσαρμόζονται κατάλληλα για μεροληψία GC και σύμφωνα με την ειδική ανά περιοχή γονιδιωματική κάλυψη που προσδιορίστηκε προηγουμένως. Με τη χρήση τέτοιων κανονικοποιημένων μετρήσεων οριοθετημένης κατηγορίας, προκύπτουν οι στατιστικές βαθμολογίες για κάθε αυτοσωμικό χρωμόσωμα μέσω της σύγκρισης των περιοχών κάλυψης που μπορούν να επηρεαστούν από ανευπλοειδία με τα υπόλοιπα αυτοσωμικά χρωμοσώματα. Ο λογαριθμικός λόγος πιθανοτήτων (LLR) υπολογίζεται για κάθε δείγμα με συνεκτίμηση αυτών των βαθμολογιών, βάσει της κάλυψης και του εκτιμώμενου εμβρυϊκού κλάσματος. Ο LLR είναι η πιθανότητα επηρεασμού ενός δείγματος δεδομένης της παρατηρηθείσας κάλυψης και του εμβρυϊκού κλάσματος έναντι της πιθανότητας μη επηρεασμού ενός δείγματος δεδομένης της ίδιας παρατηρηθείσας κάλυψης. Στον υπολογισμό αυτού του λόγου λαμβάνεται επίσης υπόψη η εκτιμώμενη αβεβαιότητα στο εμβρυϊκό κλάσμα. Για τους επόμενους υπολογισμούς, χρησιμοποιείται ο φυσικός λογάριθμος του λόγου. Το λογισμικό προσδιορισμού αξιολογεί τον LLR για κάθε χρωμόσωμα-στόχο και κάθε δείγμα ώστε να παράσχει έναν προσδιορισμό για την ανευπλοειδία.

Κατά τη διάρκεια της δημιουργίας παρτίδας, πρέπει να καθορίσετε τον τύπο δείγματος (μονήρες ή δίδυμο), τον τύπο εξέτασης ανίχνευσης (βασική ή στο πλήρες γονιδίωμα) και την αναφορά των φυλετικών χρωμοσωμάτων (Ναι, Όχι και SCA) που προτιμάτε για κάθε δείγμα. Ο συνδυασμός αυτών των επιλογών καθορίζει τις πληροφορίες που αναφέρονται για κάθε δείγμα.



Για όλους τους τύπους δειγμάτων, ο τύπος εξέτασης ανίχνευσης καθορίζει ποιες αυτοσωμικές ανωμαλίες αναφέρονται. Για τον βασικό τύπο εξέτασης ανίχνευσης, αναφέρονται μόνο συμβάντα ολικής χρωμοσωμικής τρισωμίας που περιλαμβάνουν τα χρωμοσώματα 13, 18 και 21. Για τον τύπο εξέτασης ανίχνευσης στο πλήρες γονιδίωμα, αναφέρονται η ολική ή μερική χρωμοσωμική διαγραφή ή ο διπλασιασμός οποιουδήποτε αυτοσωμικού χρωμοσώματος. Το μήκος της μικρότερης μερικής διαγραφής χρωμοσώματος ή διπλασιασμού που μπορεί να αναφερθεί είναι 7 Mb.

Για δείγματα από μονήρεις κυήσεις, μπορείτε να απενεργοποιήσετε την αναφορά φυλετικών χρωμοσωμάτων. Μπορείτε επίσης να διαμορφώσετε την αναφορά ανευπλοειδιών των φυλετικών χρωμοσωμάτων είτε με είτε χωρίς την αναφορά του φύλου των ευπλοειδικών δειγμάτων.

Για τα δείγματα από δίδυμες κυήσεις, εάν επιλέξετε «Ναι» για την αναφορά των φυλετικών χρωμοσωμάτων, το αποτέλεσμα περιορίζεται στην αναφορά της παρουσίας ή της απουσίας ενός χρωμοσώματος Y στη βιβλιοθήκη. Η ανευπλοειδία των φυλετικών χρωμοσωμάτων δεν μπορεί να αναφερθεί για δείγματα από δίδυμες κυήσεις.

**ΣΗΜΕΙΩΣΗ** Όταν όλα τα δείγματα μιας παρτίδας έχουν ίδιο αναφερόμενο φύλο, ο χρήστης λαμβάνει ειδοποίηση σφάλματος μέσω email/WebUI με προειδοποίηση για πρόσμειξη/επιμόλυνση των δειγμάτων. Η παρτίδα ακυρώνεται και δεν δημιουργείται αναφορά. (Ισχύει για λογισμικό VeriSeq NIPT Solution v2 v2.2 και μεταγενέστερη.)

Ένα αποτέλεσμα ANOMALY DETECTED (Ανιχνεύτηκε ανωμαλία) υποδεικνύει ότι το δείγμα ελέγχεται ως θετικό για μία ή περισσότερες ανωμαλίες που συμφωνούν με τον επιλεγμένο τύπο εξέτασης ανίχνευσης και την επιλογή αναφοράς των φυλετικών χρωμοσωμάτων. Όταν ανιχνεύεται μια ανωμαλία, η αναφορά παρέχει μια περιγραφή της ανωμαλίας σε κυτταρογενετικό υπόμνημα.

Το λογισμικό VeriSeq NIPT Assay Software v2 χρησιμοποιεί στατιστικές που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της αλληλούχησης για την παροχή μιας εκτίμησης εμβρυϊκού κλάσματος (FFE) για κάθε δείγμα. Η FFE είναι η εκτιμώμενη εμβρυϊκή συνιστώσα του cfDNA που ανακτάται από τον προσδιορισμό και αναφέρεται ως στρογγυλοποιημένο ποσοστό για κάθε δείγμα. Η μέση τυπική απόκλιση αυτής της εκτίμησης σε όλα τα δείγματα είναι 1,3%. Η FFE δεν χρησιμοποιείται χωριστά για τον αποκλεισμό δειγμάτων κατά την αναφορά αποτελεσμάτων.

Για να δώσει αποτελέσματα χρωμοσωμικής εκπροσώπησης, το λογισμικό VeriSeq NIPT Assay Software v2 χρησιμοποιεί την εξατομικευμένη εξέταση εμπιστοσύνης εμβρυϊκής ανευπλοειδίας [Fetal Aneuploidy Confidence Test (iFACT)], μια δυναμική μέθοδο μέτρησης κατώτατου ορίου που υποδεικνύει εάν το σύστημα έχει δημιουργήσει επαρκή κάλυψη αλληλούχησης, δεδομένης της εκτίμησης εμβρυϊκού κλάσματος για κάθε δείγμα. Τα αρνητικά αποτελέσματα αναφέρονται μόνο εάν το δείγμα πληροί το κατώτατο όριο iFACT. Εάν το δείγμα δεν πληροί αυτό το κατώτατο όριο, η αξιολόγηση ελέγχου ποιότητας εμφανίζει την ένδειξη FAILED iFACT (Αποτυχία iFACT) και το σύστημα δεν παράγει αποτέλεσμα.

Εκτός από την iFACT, το λογισμικό VeriSeq NIPT Assay Software v2 αξιολογεί διάφορες άλλες μετρήσεις ελέγχου ποιότητας κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Οι πρόσθετες μετρήσεις περιλαμβάνουν αξιολογήσεις της ομοιομορφίας της κάλυψης σε γενωμικές περιοχές αναφοράς και την κατανομή των μηκών των τμημάτων cfDNA. Η αξιολόγηση ελέγχου ποιότητας εμφανίζει είτε μια επισήμανση ελέγχου ποιότητας είτε μια αποτυχία ελέγχου ποιότητας για οποιαδήποτε μέτρηση εκτός του αποδεκτού εύρους. Σε περίπτωση μη επιτυχούς

ολοκλήρωσης του ελέγχου ποιότητας, το σύστημα δεν δημιουργεί αποτέλεσμα για το δείγμα. Εάν το δείγμα δεν ολοκληρώσει επιτυχώς τον έλεγχο ποιότητας, το δείγμα μπορεί να υποβληθεί εκ νέου σε επεξεργασία εφόσον ο όγκος πλάσματος στον σωλήνα συλλογής αίματος είναι επαρκής.

Το VeriSeq NIPT Solution v2 δημιουργεί δεδομένα για χρήση σε μια τελική αναφορά. Δεν δημιουργεί τελική αναφορά για τον ασθενή. Οι πελάτες είναι υπεύθυνοι για τον σχεδιασμό και το περιεχόμενο της τελικής αναφοράς που θα παραδοθεί στον ιατρό στο σημείο περίθαλψης. Η Illumina δεν είναι υπεύθυνη για την ακρίβεια της διατύπωσης στην τελική αναφορά για τους πελάτες.



## ΠΡΟΣΟΧΗ

Ελέγχετε τις εκτιμήσεις εμβρυϊκού κλάσματος όλων των δειγμάτων. Εάν οι εκτιμήσεις εμβρυϊκού κλάσματος είναι παρόμοιες για όλα τα δείγματα σε μια εκτέλεση, ενδέχεται να έχει προκύψει αμαλγάμωση και να έχει επηρεάσει τα αποτελέσματα. Επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής υποστήριξης της Illumina για βοήθεια στην αντιμετώπιση του προβλήματος.

## Χαρακτηριστικά απόδοσης

Τα παρακάτω δεδομένα που περιγράφονται στις ενότητες για την κλινική απόδοση και την αναλυτική απόδοση δημιουργήθηκαν με τη χρήση των πρωτοκόλλων και των υλικών που περιγράφονται στις οδηγίες χρήσης, ξεκινώντας με το πλάσμα. Όλα τα δεδομένα αλληλούχισης για αυτήν την ενότητα δημιουργήθηκαν σε σύστημα αλληλούχισης NextSeq 500/550 ή σε σύστημα αλληλούχισης NextSeq 550Dx με τις παρακάτω ρυθμίσεις:

	NextSeq 500/550	NextSeq 550Dx
Λογισμικό επί του οργάνου	NextSeq Control Software 4.0	NextSeq Operating Software 1.3
Έκδοση κιτ αντιδραστηρίων	NextSeq 500/550 High Output v2.5 Reagent Kit (75 κύκλοι)	NextSeq 550Dx High Output v2.5 Reagent Kit (75 κύκλοι)
Μέθοδος αλληλούχισης	Εκτέλεση αλληλούχισης συζευγμένων άκρων 2x36 σε τρόπο λειτουργίας υψηλής απόδοσης	Εκτέλεση αλληλούχισης συζευγμένων άκρων 2x36 σε τρόπο λειτουργίας υψηλής απόδοσης

## Κλινική μελέτη

Η κλινική ακρίβεια του συστήματος VeriSeq NIPT Solution v2 αποδείχτηκε μέσω της αξιολόγησης δειγμάτων πλάσματος από εγκύους γυναίκες με μονήρεις και δίδυμες κυήσεις. Τα δείγματα ελήφθησαν από αποταυτοποιημένα δείγματα πλάσματος που φυλάσσονταν σε τράπεζα και τα οποία είχαν υποβληθεί προηγουμένως σε επεξεργασία από δείγματα περιφερικού ολικού αίματος. Εξετάστηκαν πάνω από 45.000 δείγματα για συμπερίληψη στη μελέτη. Τα δείγματα αυτά είχαν υποβληθεί σε προηγούμενο προγεννητικό έλεγχο ανίχνευσης για εμβρυϊκές χρωμοσωμικές ανευπλοειδίες και μερικές διαγραφές και διπλασιασμούς μήκους 7 Mb ή μεγαλύτερου. Όλα τα δείγματα από επηρεαζόμενες κυήσεις και ένα

υποσύνολο διαδοχικών δειγμάτων από μη επηρεαζόμενες κήσεις κρίθηκαν κατάλληλα για έλεγχο εφόσον υπήρχαν διαθέσιμες κλινικές εκβάσεις και πληρούνταν τα κριτήρια δείγματος. Το σύνολο ανάλυσης ελέγχου περιλάμβανε συνολικά 2.335 δείγματα. Από αυτό το σύνολο, 2.328 δείγματα προέρχονταν από μονήρεις κήσεις και επτά δείγματα προέρχονταν από δίδυμες κήσεις.

Από τα δείγματα αυτά, στα 28 (1,2%, 28/2.335) δείγματα ο έλεγχος ποιότητας της μεθόδου προσδιορισμού απέτυχε κατά τη διάρκεια της ανάλυσης των δεδομένων της ολοκληρωμένης αλληλούχησης:

- 27 αποτυχίες iFACT (ένα ΧΟ, 26 μη επηρεαζόμενα)
- Μία αποτυχία για δεδομένα εκτός του αναμενόμενου εύρους

## Δημογραφικά στοιχεία και χαρακτηριστικά κήσης

Ο Πίνακας 7 συνοψίζει την ηλικία της μητέρας, την ηλικία κήσης και το τρίμηνο κήσης για τα δείγματα στην εξέταση ανίχνευσης στο πλήρες γονιδίωμα, συμπεριλαμβανομένων δειγμάτων γνωστών μωσαϊκών. Η πλειονότητα (98%) των δειγμάτων ελέγχου αντιπροσωπεύουν κήσεις πρώτου τριμήνου.

Τα δημογραφικά στοιχεία αξιολογήθηκαν μεταξύ των κοόρτεων βασικού ελέγχου και ελέγχου στο πλήρες γονιδίωμα και δεν κατέδειξαν στατιστική διαφορά. Τα δημογραφικά στοιχεία και τα χαρακτηριστικά εγκυμοσύνης ήταν παρόμοια είτε συμπεριλήφθηκαν είτε αποκλείστηκαν γνωστά μωσαϊκά.

Πίνακας 7 Δημογραφικά στοιχεία και χαρακτηριστικά κύησης

Σύνοψη στατιστικών στοιχείων	Στο πλήρες γονιδίωμα (συμπεριλαμβανομένων γνωστών μωσαϊκών)
Αριθμός δειγμάτων	2.307*
<b>Ηλικία μητέρας – έτη</b>	
Μέση τιμή	35,08
Τυπική απόκλιση	4,04
Διάμεση τιμή	34,95
25ο εκατοστημόριο, 75ο εκατοστημόριο	32,31, 37,79
Ελάχιστη τιμή, μέγιστη τιμή	20,22, 53,02
<b>Ηλικία κύησης κατά την αιμοληψία – εβδομάδες</b>	
Μέση τιμή	10,93
Τυπική απόκλιση	1,20
Διάμεση τιμή	10,57
25ο εκατοστημόριο, 75ο εκατοστημόριο	10,29, 11,14
Ελάχιστη τιμή, μέγιστη τιμή	10,00, 27,86
<b>Τρίμηνο εγκυμοσύνης – n (%)</b>	
< Πρώτο (<14 εβδομάδες)	2.252 (98%)
Δεύτερο	54 (2%)
Τρίτο (≥27 εβδομάδες)	1 (0%)

\*Τα τελικά δείγματα που παρουσιάστηκαν περιείχαν 7 δίδυμα.

## Κλινική απόδοση

Τα αποτελέσματα, όπως προέκυψαν από το σύστημα VeriSeq NIPT Solution v2, συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα του προτύπου κλινικής αναφοράς. Όλα τα δείγματα της μελέτης είχαν αποτελέσματα του κλινικού προτύπου αναφοράς (κλινική αλήθεια) σε σχέση με την κατάσταση της εμβρυϊκής χρωμοσωμικής ανευπλοειδίας και τις μερικές διαγραφές και διπλασιασμούς μήκους 7 Mb ή μεγαλύτερου. Το αποτέλεσμα του κλινικού προτύπου αναφοράς για τα δείγματα που περιλήφθηκαν σε αυτήν τη μελέτη εξαρτιόταν από τα

αποτελέσματα της χρωμοσωμικής ανάλυσης ή την κλινική εξέταση ενός νεογνού με αρνητική εξέταση ανίχνευσης NIPT βάσει NGS. Καταρτισμένο προσωπικό της μελέτης εκτέλεσε την ταξινόμηση των δεδομένων του κλινικού προτύπου αναφοράς σύμφωνα με το έγγραφο ιατρικής κωδικοποίησης από τον χορηγό.

Στις μεθόδους χρωμοσωμικής ανάλυσης περιλαμβάνονταν ο προσδιορισμός καρυότυπου, ο υβριδισμός *in situ* με φθορισμό (FISH) ή η χρωμοσωμική ανάλυση με μικροσυστοιχίες (CMA) συγκριτικού γενωμικού υβριδισμού. Η χρωμοσωμική ανάλυση διενεργήθηκε σε περιφερικό αίμα ή σίελο νεογνού ή βρέφους, δείγματα προϊόντων της σύλληψης (products of conception – POC), αμνιοκύτταρα, χοριακές λάχνες, πλακουντιακούς ιστούς ή αίμα ομφάλιου λώρου μετά τη γέννηση.

Ο μωσαϊκισμός ορίζεται ως η παρουσία δύο ή περισσότερων κυτταρικών σειρών διαφορετικής χρωμοσωμικής σύνθεσης σε ένα άτομο. Οι κυτταρικές σειρές προέρχονται από το ίδιο ζύγωμα. Ο τύπος και το επίπεδο μωσαϊκισμού ποικίλλουν και εξαρτώνται από τον χρόνο των μωσαϊκών συμβάντων κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Οι διαφορετικοί τύποι μωσαϊκισμού εμφανίζονται σε προγεννητικές διαγνώσεις ανάλογα με την κατανομή των μη φυσιολογικών έναντι των φυσιολογικών κυτταρικών σειρών σε κυτταροτροφοβλάστη, μεσέγχυμα ή στο έμβρυο.<sup>10</sup> Παρότι ο μωσαϊκισμός μπορεί να διαπιστωθεί με οποιαδήποτε χρωμοσωμική ανωμαλία, ο επιπολασμός του μωσαϊκισμού σε σπάνιες τρισωμίες είναι υψηλότερος απ' ό,τι στις τρισωμίες των χρωμοσωμάτων 21, 18 και 13 (T21, T18 και T13).<sup>11</sup> Στην αξιολόγηση της απόδοσης, στην ανάλυση στο πλήρες γονιδίωμα περιλήφθηκαν περιστατικά μωσαϊκισμού, δεδομένου ότι ο σκοπός αυτού του τύπου εξέτασης ανίχνευσης για αυτόν τον προσδιορισμό είναι η ανίχνευση σπάνιων αυτοσωμικών ανευπλοειδιών (rare autosomal aneuploidies – RAA).

## Απόδοση βασικής εξέτασης ανίχνευσης

Η βασική εξέταση ανίχνευσης καλύπτει τις ανωμαλίες T21, T18 και T13. Στην ανάλυση περιλήφθηκαν συνολικά 2.243 δείγματα από μονήρεις και διδυμες κυήσεις. Και οι επτά διδυμες κυήσεις ανιχνεύτηκαν σωστά ως T21 και δεν αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 8 Ευαισθησία και ειδικότητα του συστήματος VeriSeq NIPT Solution v2 για την ανίχνευση των τρισωμιών 21, 18 και 13 σε βασική εξέταση ανίχνευσης για μονήρεις κυήσεις (εξαιρουμένων γνωστών μωσαϊκών)

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

Η απόδοση του προσδιορισμού στη βασική εξέταση ανίχνευσης που παρουσιάζει ο Πίνακας 8 υπολογίζεται με αποκλεισμό υποσυνόλου 64 δειγμάτων που επηρεάζονται από RAA, αυτοσωμικές μερικές διαγραφές ή διπλασιασμούς ή γνωστό μωσαϊκισμό. Αυτά τα 64 δείγματα περιλάμβαναν οκτώ μωσαϊκά T21 και τρία μωσαϊκά T18. Πέντε από αυτά τα 11 δείγματα προσδιορίστηκαν ως επηρεαζόμενα από την ανωμαλία που ανίχνευσε το λογισμικό VeriSeq NIPT Assay Software v2.

## Απόδοση εξέτασης ανίχνευσης στο πλήρες γονιδίωμα

Για την εξέταση ανίχνευσης στο πλήρες γονιδίωμα, οποιαδήποτε ανωμαλία περιλαμβάνει τρισωμίες, μονοσωμίες και μερικές διαγραφές ή διπλασιασμούς μήκους 7 Mb ή μεγαλύτερου. Τα δείγματα για την εξέταση ανίχνευσης στο πλήρες γονιδίωμα περιλάμβαναν 36 δείγματα με γνωστό μωσαϊκισμό. Ελέγχθηκαν συνολικά 2.307 δείγματα μονήρων και διδύμων κυήσεων. Και οι επτά δίδυμες κυήσεις ανιχνεύτηκαν σωστά με παρουσία ανωμαλίας του χρωμοσώματος 21 και δεν αναφέρονται στους παρακάτω πίνακες.

## Απόδοση εξέτασης ανίχνευσης στο πλήρες γονιδίωμα για οποιαδήποτε ανωμαλία

Πίνακας 9 Ευαισθησία και ειδικότητα του VeriSeq NIPT Solution v2 για την ανίχνευση οποιασδήποτε ανωμαλίας στην εξέταση ανίχνευσης στο πλήρες γονιδίωμα (συμπεριλαμβανομένων γνωστών μωσαϊκών)

	Ευαισθησία	Ειδικότητα
Εκτιμώμενο % (n/N)	95,5% (318/333)	99,34% (1954/1967)
Αμφίπλευρο CI 95%	92,7%, 97,3%	98,87%, 99,61%

## Απόδοση εξέτασης ανίχνευσης στο πλήρες γονιδίωμα για σπάνια αυτοσωμική ανευπλοειδία

Πίνακας 10 Ευαισθησία και ειδικότητα του VeriSeq NIPT Solution v2 για σπάνια αυτοσωμική ανευπλοειδία (RAA) στην εξέταση ανίχνευσης στο πλήρες γονιδίωμα (συμπεριλαμβανομένων γνωστών μωσαϊκών)

	Ευαισθησία	Ειδικότητα
Εκτιμώμενο % (n/N)	96,4% (27/28)	99,80% (2001/2005)
Αμφίπλευρο CI 95%	82,3%, 99,4%	99,49%, 99,92%

## Απόδοση της εξέτασης ανίχνευσης στο πλήρες γονιδίωμα για μερικές διαγραφές και διπλασιασμούς

Πίνακας 11 Ευαισθησία και ειδικότητα του VeriSeq NIPT Solution v2 για μερικές διαγραφές και διπλασιασμούς μήκους 7 Mb ή μεγαλύτερου στην εξέταση ανίχνευσης στο πλήρες γονιδίωμα (συμπεριλαμβανομένων γνωστών μωσαϊκών)

	Ευαισθησία	Ειδικότητα
Εκτιμώμενο % (n/N)	74,1% (20/27)	99,80% (2000/2004)
Αμφίπλευρο CI 95%	55,3%, 86,8%	99,49%, 99,92%

## Διαφορές στην απόδοση μεταξύ της βασικής εξέτασης ανίχνευσης και της εξέτασης ανίχνευσης στο πλήρες γονιδίωμα

Η μεθοδολογία βαθμολόγησης για τις συνήθεις τρισωμίες και τις ανευπλοειδίες των φυλετικών χρωμοσωμάτων είναι η ίδια για τη βασική εξέταση ανίχνευσης και την εξέταση ανίχνευσης στο πλήρες γονιδίωμα. Η βασική εξέταση ανίχνευσης εφαρμόζει τον αλγόριθμο μόνο στις T21, T18 και T13. Αντιθέτως, η εξέταση ανίχνευσης στο πλήρες γονιδίωμα επεκτείνει αυτήν τη μεθοδολογία ώστε να ελέγξει για όλες τις τρισωμίες και τις RAA, καθώς και για μερικούς διπλασιασμούς και διαγραφές.

Υπάρχουν δύο διαφορές όσον αφορά την απόδοση για την αναφορά μεταξύ της βασικής εξέτασης ανίχνευσης και της εξέτασης ανίχνευσης στο πλήρες γονιδίωμα. Πρώτον, για την εξέταση ανίχνευσης στο πλήρες γονιδίωμα, συμπεριλήφθηκαν δείγματα με γνωστό μωσαϊκισμό τόσο για τις συνήθεις τρισωμίες όσο και για τις RAA και τις μερικές διαγραφές και διπλασιασμούς για μετρήσεις της απόδοσης. Δεύτερον, η εξέταση ανίχνευσης στο πλήρες γονιδίωμα μπορεί κατά προτίμηση να αναφέρει την ανίχνευση μερικού διπλασιασμού ή διαγραφής σε μια πλήρη τρισωμία. Η παρουσία πλήρους τρισωμίας εκτός από μερικό διπλασιασμό ή διαγραφή μπορεί να διαπιστωθεί με αναφορά στη βαθμολογία LLR που παρέχεται στη συμπληρωματική αναφορά.

## Συμπερίληψη μωσαϊκών στην εξέταση ανίχνευσης στο πλήρες γονιδίωμα

Ο μωσαϊκισμός παρατίθεται ως περιορισμός αυτού του προσδιορισμού. Όταν υπάρχει μωσαϊκισμός, το εμβρυϊκό σήμα μιας ανωμαλίας μειώνεται και, συνεπώς, μπορεί να είναι πιο δύσκολο να ανιχνευτεί χωρίς να διακυβευτεί η συνολική ειδικότητα του προσδιορισμού. Ωστόσο, επειδή ο μωσαϊκισμός είναι πιο σχετικός για εκτεταμένο περιεχόμενο, στην εξέταση ανίχνευσης στο πλήρες γονιδίωμα συμπεριλήφθηκαν δείγματα με μωσαϊκισμό.

Από τα 64 δείγματα που περιλήφθηκαν στην εξέταση ανίχνευσης στο πλήρες γονιδίωμα αλλά όχι στη βασική εξέταση ανίχνευσης, 36 δείγματα ταυτοποιήθηκαν ως έχοντα μωσαϊκισμό σύμφωνα με το κλινικό πρότυπο αναφοράς. Από αυτά τα 36 δείγματα, 23 αποτελέσματα συμφωνούσαν με το πρότυπο κλινικής αναφοράς.

## Ανίχνευση μερικής διαγραφής ή διπλασιασμού έναντι ολικής χρωμοσωμικής ανευπλοειδίας

Το σύστημα VeriSeq NIPT Solution v2 διαθέτει επιλογές μενού τόσο για βασική εξέταση ανίχνευσης όσο και για εξέταση ανίχνευσης στο πλήρες γονιδίωμα. Στη βασική εξέταση ανίχνευσης, το αποτέλεσμα ANOMALY DETECTED (Ανιχνεύτηκε ανωμαλία) αναφέρεται μόνο όταν ανιχνεύεται πλήρης ανευπλοειδία στα χρωμοσώματα 21, 18 ή 13 και εάν πληρούνται όλες οι μετρήσεις ελέγχου ποιότητας. Στην εξέταση ανίχνευσης στο πλήρες γονιδίωμα, το σύστημα ανιχνεύει την ανευπλοειδία σε όλα τα αυτοσωμικά χρωμοσώματα και συμβάντα μερικής διαγραφής και διπλασιασμού μήκους τουλάχιστον 7 Mb.

Όταν χρησιμοποιείται η εξέταση ανίχνευσης στο πλήρες γονιδίωμα και υπάρχει τόσο συμβάν σε ολόκληρο το χρωμόσωμα όσο και συμβάν CNV εντός του ίδιου χρωμοσώματος που υπερβαίνουν το κατώτατο όριο LLR, το σύστημα δίνει προτεραιότητα αναφοράς σε ένα συμβάν μερικής διαγραφής ή διπλασιασμού έναντι ενός αποτελέσματος σε ολόκληρο το χρωμόσωμα εάν το μέγεθος της μερικής διαγραφής ή του διπλασιασμού είναι

μικρότερο ή ίσο με το 75% του χρωμοσώματος στο οποίο ανιχνεύεται το συμβάν. Εάν η περιοχή μερικής διαγραφής και διπλασιασμού που ανιχνεύεται είναι μεγαλύτερη από το 75% του μεγέθους του χρωμοσώματος, το συμβάν αναφέρεται ως πλήρης τρισωμία ή μονοσωμία ολόκληρου του χρωμοσώματος εάν υπάρχει ταυτόχρονα και υπέρβαση του κατώτατου ορίου LLR για ολόκληρο το χρωμόσωμα. Επομένως, οι σημαντικά μεγάλες διαγραφές και διπλασιασμοί με μέγεθος μικρότερο ή ίσο του 75% του μεγέθους του χρωμοσώματος μπορεί να είναι ενδεικτικές ολικής χρωμοσωμικής ανευπλοειδίας.

Σε όλα τα δείγματα, η βαθμολογία LLR για την ταξινόμηση ολόκληρου του χρωμοσώματος είναι διαθέσιμη στη συμπληρωματική αναφορά. Η βαθμολογία LLR θα πρέπει να εξετάζεται σε σχέση με την καθορισμένη τιμή αποκοπής στην [Εικόνα 2](#) πριν από την ερμηνεία του αποτελέσματος. Παραδείγματος χάριν, μια αντιστοίχιση CNV σε περιπτώσεις βαθμολογιών LLR σε επίπεδο χρωμοσώματος που υπερβαίνουν την τιμή αποκοπής παρέχουν περαιτέρω υποστήριξη για μια ερμηνεία που συνάδει με ανευπλοειδία ολόκληρου του χρωμοσώματος. Ο [Πίνακας 12](#) δείχνει παραδείγματα.

Στην κλινική μελέτη, υπήρχαν δύο δείγματα μονήρους κύησης με σημαντικά μεγάλους διπλασιασμούς (έναν στο χρωμόσωμα 21 και έναν στο χρωμόσωμα 18) που ήταν μικρότεροι από το 75% του σχετικού μεγέθους του χρωμοσώματος ([Πίνακας 12](#)). Και τα δύο συμβάντα αναφέρθηκαν ως μερικοί διπλασιασμοί και όχι ως πλήρης τρισωμία για αυτό το χρωμόσωμα. Οι βαθμολογίες LLR για αυτά τα συμβάντα ήταν πάνω από την τιμή αποκοπής, συμφωνώντας με επηρεαζόμενο αποτέλεσμα για πλήρη τρισωμία. Για αποτέλεσμα είτε μερικού διπλασιασμού είτε πλήρους τρισωμίας, η διαχείριση παρακολούθησης για ένα θετικό αποτέλεσμα του NIPT προσφέρει στον ασθενή έλεγχο επιβεβαίωσης μέσω προγεννητικής διάγνωσης.

Πίνακας 12 Παραδείγματα συμβάντων μεγάλου διπλασιασμού που εντοπίστηκαν στην εξέταση ανίχνευσης στο πλήρες γονιδίωμα

	Κλινική αλήθεια	Αποτέλεσμα συστήματος στο πλήρες γονιδίωμα	Μέγεθος ανωμαλίας (Mb)	% χρωμοσώματος	Βαθμολογίες LLR
Δείγμα 1	Τρισωμία 21 σε μονήρες έμβρυο	Μερικός διπλασιασμός του 21	22,50	48,9	19,43
Δείγμα 2	Τρισωμία 18 σε μονήρες έμβρυο	Μερικός διπλασιασμός του 18	47,00	60,2	12,99

Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τις μετρήσεις ελέγχου ποιότητας που χρησιμοποιούνται για την αναφορά αποτελεσμάτων ανευπλοειδίας, ανατρέξτε στον *Οδηγό λογισμικού VeriSeq NIPT Solution v2* (αρ. εγγράφου 1000000067940).

## Φυλετικά χρωμοσώματα

Τα αποτελέσματα του συστήματος VeriSeq NIPT Solution v2 για τα φυλετικά χρωμοσώματα συγκρίθηκαν με το αποτέλεσμα του κλινικού προτύπου αναφοράς και παρουσιάζονται συνοπτικά στον παρακάτω πίνακα. Η ποσοστιαία συμφωνία υπολογίστηκε για κάθε φυλετικό χρωμόσωμα σε κάθε αποτέλεσμα του κλινικού προτύπου αναφοράς. Η ποσοστιαία συμφωνία υπολογίστηκε ως ο αριθμός των δειγμάτων στα οποία το



αποτέλεσμα του συστήματος VeriSeq NIPT Solution v2 για τα φυλετικά χρωμοσώματα συμφωνούσε με την ταξινόμηση του κλινικού προτύπου αναφοράς, διαιρούμενος με τον συνολικό αριθμό δειγμάτων με την ίδια ταξινόμηση του κλινικού προτύπου αναφοράς.

Πίνακας 13 Ποσοστιαία συμφωνία για την ταξινόμηση εμβρυϊκού φύλου\*

Ταξινόμηση εμβρυϊκού φύλου		Φαινότυπος από την κλινική εξέταση του νεογέννητου		Κυτταρογενετικά αποτελέσματα								
		Θήλυ	Άρρεν	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY	Άλλο**	Ελλείπον	
Ανιχνεύτηκε	Καρούτυπος											
Δεν ανιχνεύτηκε ανωμαλία	XX	997	0	21	0	2	0	0	0	0	0	0
Δεν ανιχνεύτηκε ανωμαλία	XY	0	966	0	15	0	0	0	0	0	0	1
Ανιχνεύτηκε ανωμαλία	XO	0	0	0	0	19	0	0	1	0	0	0
Ανιχνεύτηκε ανωμαλία	XXX	0	0	0	0	0	17	0	0	1	0	0
Ανιχνεύτηκε ανωμαλία	XXY	0	0	0	0	0	0	23	0	1	0	0
Ανιχνεύτηκε ανωμαλία	XYY	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0
Σύνολο		997	966	21	15	21	17	23	12	2	1	
Ποσοστό συμφωνίας		100	100	100	100	90,5	100	100	91,7	Δεν ισχύει	Δεν ισχύει	

\*Πέντε δίδυμες κήσεις ταξινομήθηκαν σωστά ως κήσεις με παρουσία Y. Δύο δίδυμες κήσεις ταξινομήθηκαν σωστά ως κήσεις χωρίς παρουσία Y.

\*\* Άλλα κυτταρογενετικά αποτελέσματα ήταν XXXXX και XXYY.

## Θετική προγνωστική τιμή και αρνητική προγνωστική τιμή του συστήματος VeriSeq NIPT Solution v2

Η θετική προγνωστική τιμή (Positive predictive value – PPV) και η αρνητική προγνωστική τιμή (negative predictive value – NPV) της εξέτασης παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την ικανότητα της εξέτασης να συμβάλλει στη λήψη κλινικών αποφάσεων με βάση την ευαισθησία και την ειδικότητα της εξέτασης και να ελέγχει εκ των προτέρων την πιθανότητα να επηρεαστεί ένα έμβρυο από τρισωμία (επιπολασμός). Δεδομένου ότι η PPV και η NPV εξαρτώνται από τον επιπολασμό και ότι ο επιπολασμός για αυτές τις ανευπλοειδίες μπορεί να ποικίλλει σε διαφορετικούς πληθυσμούς ασθενών, η PPV και η NPV υπολογίστηκαν για ένα εύρος

αληθοφανών τιμών επιπολασμού με βάση τις τιμές της ευαισθησίας και της ειδικότητας που παρατηρήθηκαν στη βασική εξέταση ανίχνευσης (χωρίς γνωστά μωσαϊκά) της μελέτης κλινικής ακρίβειας. Ο Πίνακας 17 βασίζεται στην εξέταση ανίχνευσης στο πλήρες γονιδίωμα (με γνωστά μωσαϊκά).

Πίνακας 14 Επιπολασμός τρισωμίας 21, PPV και NPV σε βασική εξέταση ανίχνευσης (εξαιρουμένων των γνωστών μωσαϊκών)

Επιπολασμός (%)	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

Πίνακας 15 Επιπολασμός τρισωμίας 18, PPV και NPV σε βασική εξέταση ανίχνευσης (εξαιρουμένων των γνωστών μωσαϊκών)

Επιπολασμός (%)	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

Πίνακας 16 Επιπολασμός τρισωμίας 13, PPV και NPV σε βασική εξέταση ανίχνευσης (εξαιρουμένων των γνωστών μωσαϊκών)

Επιπολασμός (%)	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

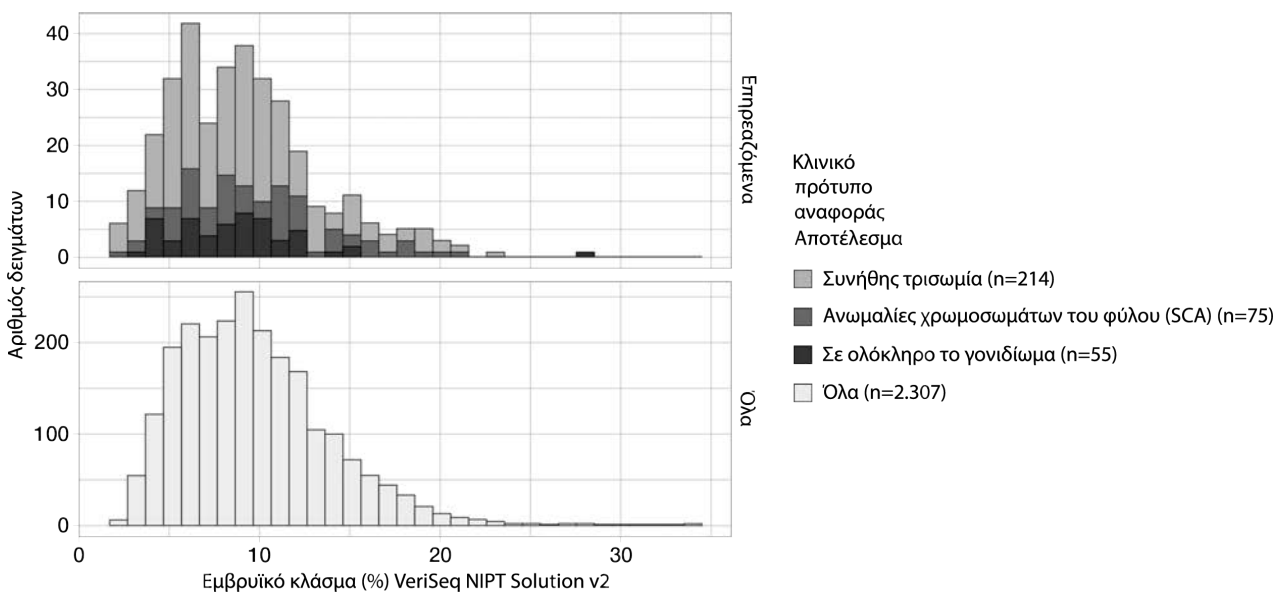
Πίνακας 17 Επιπολασμός οποιασδήποτε ανωμαλίας, PPV και NPV σε εξέταση ανίχνευσης στο πλήρες γονιδίωμα (συμπεριλαμβανομένων των γνωστών μωσαϊκών)

Επιπολασμός (%)	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

## Κατανομή εμβρυϊκών κλασμάτων

Η κατανομή των εκτιμήσεων εμβρυϊκού κλάσματος (FF) του VeriSeq NIPT Solution v2 από την εξέταση ανίχνευσης στο πλήρες γονιδίωμα με μωσαϊκά παρουσιάζεται ανά κατηγορία αποτελέσματος του κλινικού προτύπου αναφοράς στην [Εικόνα 1](#).

Εικόνα 1 Κατανομή εμβρυϊκών κλασμάτων



5 δείγματα είχαν ανωμαλίες σε πολλαπλές κατηγορίες.

Η συνήθης τρισωμία περιλαμβάνει δείγματα με τρισωμία 21, 18 ή/και 13.

Ο έλεγχος σε ολόκληρο το γονιδίωμα περιλαμβάνει δείγματα με RAA ή μερικές διαγραφές ή/και διπλασιασμούς.

Το εύρος των εκτιμήσεων του FF ήταν 2% έως 34% συνολικά με διάμεσο 9% και ενδοτεταρτημοριακό (IQ) εύρος 6% έως 12%. Η διάμεση εκτίμηση του FF για συνήθεις τρισωμίες και συμβάντα που ανιχνεύτηκαν από την εξέταση ανίχνευσης στο πλήρες γονιδίωμα είναι 8% και για τις SCA είναι 9%. Το εύρος για τις εκτιμήσεις του FF ήταν συνεπές για όλα τα αποτελέσματα. Δεν υπάρχει εμφανής μεταβολή στην κατανομή του FF μεταξύ των τρισωμιών, των SCA και των συμβάντων που ανίχνευσε η εξέταση ανίχνευσης στο πλήρες γονιδίωμα ή όλων των δειγμάτων της ανάλυσης στο πλήρες γονιδίωμα.

## Απόδοση σε δίδυμες κυήσεις

### Εκτίμηση της απόδοσης για την τρισωμία 13, 18 και 21 και το χρωμόσωμα Y σε δίδυμες κυήσεις

Λόγω του χαμηλού επιπολασμού της τρισωμίας 21, 18 και 13 σε δίδυμες κυήσεις, μικρός μόνον αριθμός επηρεαζόμενων δειγμάτων από δίδυμες κυήσεις ήταν διαθέσιμος για την κλινική μελέτη. Για την εκτίμηση της απόδοσης του VeriSeq NIPT Solution v2 σε δίδυμες κυήσεις, χρησιμοποιήθηκαν μοντέλα *in silico* με βάση παρατηρήσεις από κλινικά δείγματα για την προσομοίωση πληθυσμών δίδυμων κυήσεων. Αυτή η προσομοίωση συμφωνούσε με τον πληθυσμό για την προβλεπόμενη χρήση. Η κατανομή του εμβρυϊκού κλάσματος προσδιορίστηκε από περίπου 4.500 δείγματα από δίδυμες κυήσεις και συγκρίθηκε με την κατανομή από περίπου 120.000 δείγματα από μονήρεις κυήσεις. Η κατανομή του εμβρυϊκού κλάσματος που εξαρτάται από την κατάσταση ανευπλοειδίας προσδιορίστηκε από υποτιθέμενα αποτελέσματα μονήρων κυήσεων (1.044 τρισωμίες 21, 307 τρισωμίες 18 και 192 τρισωμίες 13). Ο συνδυασμός των δύο κατανομών επέτρεψε τη συναγωγή συμπερασμάτων για την ανίχνευση ανευπλοειδίας σε δίδυμα. Πραγματοποιήθηκε προσομοίωση συνόλων διζυγωτικών και μονοζυγωτικών διδύμων και υπολογίστηκε ένας σταθμισμένος μέσος όρος που αντιπροσωπεύει τον επιπολασμό τους στον πληθυσμό προβλεπόμενης χρήσης (2 διζυγωτικά: 1 μονοζυγωτικό) για να εκτιμηθεί η ευαισθησία. Για την ειδικότητα, πραγματοποιήθηκε προσομοίωση συνόλων μη επηρεαζόμενων διδύμων.

Το κλάσμα κάθε προσομοιωμένου δείγματος που επηρεάζεται από την τρισωμία (δηλ. το επηρεαζόμενο κλάσμα) υπολογίστηκε διαφορετικά για κάθε κατηγορία δειγμάτων:

- Για τα μονοζυγωτικά δίδυμα, το επηρεαζόμενο κλάσμα κάθε δείγματος ορίστηκε σε 1.0 διότι, σε αυτήν την περίπτωση, η τρισωμία επηρεάζει αμφότερα τα δίδυμα.
- Για τα διζυγωτικά δίδυμα, ελήφθη ως υπόθεση ότι επηρεάστηκε μόνο το ένα δίδυμο (η πιθανότητα να επηρεαστούν αμφότερα τα διζυγωτικά δίδυμα είναι εξαιρετικά σπάνια). Πραγματοποιήθηκε προσομοίωση των τιμών επηρεαζόμενου κλάσματος με χρήση της γνωστής κατανομής των λόγων εμβρυϊκού κλάσματος όπως προσδιορίστηκε από κλινικά δείγματα διδύμων διαφορετικού φύλου. Εφαρμόστηκε μια συντηρητική προσέγγιση στο πλαίσιο της οποίας ελήφθη ως υπόθεση ότι το επηρεαζόμενο δίδυμο είχε πάντα το χαμηλότερο εμβρυϊκό κλάσμα μεταξύ των δύο διδύμων. Εφαρμόστηκε συντελεστής διόρθωσης για τα εμβρυϊκά κλάσματα που ήταν κατά μέσο όρο χαμηλότερα σε κυήσεις με τρισωμία 13 και 18.
- Για τα μη επηρεαζόμενα δίδυμα, το επηρεαζόμενο κλάσμα κάθε δείγματος ορίστηκε σε μηδέν.

Για τα δίδυμα που επηρεάζονται από την τρισωμία 18 ή 13, το εμβρυϊκό κλάσμα που αντιστοιχεί στο επηρεαζόμενο κλάσμα του δείγματος μειώθηκε. Η μείωση ήταν αναλογική προς τη μέση μείωση του εμβρυϊκού κλάσματος που παρατηρήθηκε σε κλινικά δεδομένα σε μονήρη έμβρυα με τρισωμία 18 ή 13 έναντι μονήρων εμβρύων με ευπλοειδία.

Τόσο το συνολικό εμβρυϊκό κλάσμα όσο και το επηρεαζόμενο κλάσμα κάθε προσομοιωμένου δείγματος χρησιμοποιήθηκαν, στη συνέχεια, για τον υπολογισμό βαθμολογίας για την ανευπλοειδία με τη χρήση του τυπικού αλγορίθμου του συστήματος VeriSeq NIPT Solution v2. Η ευαισθησία υπολογίστηκε με καθορισμό της συχνότητας με την οποία οι βαθμολογίες για την ανευπλοειδία για τα προσομοιωμένα επηρεαζόμενα δείγματα διδύμων ήταν πάνω από την αντίστοιχη τιμή αποκοπής για την ανευπλοειδία. Αντίστοιχα, η ειδικότητα υπολογίστηκε με καθορισμό της συχνότητας με την οποία οι βαθμολογίες για την ανευπλοειδία για τα προσομοιωμένα μη επηρεαζόμενα δείγματα διδύμων ήταν κάτω από την αντίστοιχη τιμή αποκοπής για την ανευπλοειδία (Πίνακας 18). Η εκτίμηση των διαστημάτων εμπιστοσύνης 95% έγινε με βάση τον αριθμό πραγματικών κλινικών δειγμάτων διδύμων στο αρχικό σύνολο δεδομένων, τα οποία ταξινομήθηκαν είτε ως επηρεαζόμενα είτε ως μη επηρεαζόμενα από τη σχετική τρισωμία.

Για την εκτίμηση της ευαισθησίας για το χρωμόσωμα Y σε δείγματα διδύμων, πραγματοποιήθηκε προσομοίωση διδύμων XY/XY και XX/XY. Προέκυψε ένας σταθμισμένος μέσος όρος που αντιπροσωπεύει τον επιπολασμό τους στον πληθυσμό προβλεπόμενης χρήσης (1 XY/XY: 1 XX/XY). Για την εκτίμηση της ειδικότητας για το χρωμόσωμα Y σε δείγματα διδύμων, πραγματοποιήθηκε προσομοίωση ενός συνόλου διδύμων XX/XX. Πραγματοποιήθηκε προσομοίωση των τιμών συνολικού εμβρυϊκού κλάσματος σύμφωνα με τη γνωστή κατανομή του εμβρυϊκού κλάσματος σε κλινικά δείγματα διδύμων.

Για τα δίδυμα XY/XY και XX/XY, η εκτίμηση των αντίστοιχων βαθμολογιών για το χρωμόσωμα Y έγινε με τη χρήση της γνωστής σχέσης μεταξύ του εμβρυϊκού κλάσματος και των βαθμολογιών για το χρωμόσωμα Y σε κλινικά δείγματα μονήρων εμβρύων που ταξινομήθηκαν ως αρσενικά. Για τα δίδυμα XX/XY μόνο, πραγματοποιήθηκε προσομοίωση των επηρεαζόμενων τιμών εμβρυϊκού κλάσματος με χρήση της γνωστής κατανομής των λόγων εμβρυϊκού κλάσματος που παρατηρήθηκαν μεταξύ διδύμων από την ίδια κύηση, όπως προσδιορίστηκε από κλινικά δείγματα διδύμων διαφορετικού φύλου. Εφαρμόστηκε μια συντηρητική προσέγγιση σύμφωνα με την οποία το επηρεαζόμενο κλάσμα επιλέχθηκε έτσι ώστε να αντιστοιχεί στο μικρότερο από τα δύο δίδυμα. Για κάθε προσομοιωμένο δείγμα XX/XY, η βαθμολογία για το χρωμόσωμα Y πολλαπλασιάστηκε με το επηρεαζόμενο κλάσμα.

Για τα δίδυμα XX/XX, οι βαθμολογίες για το χρωμόσωμα Y ελήφθησαν από τις βαθμολογίες που παρατηρήθηκαν σε κλινικά δείγματα μονήρων βρεφών που ταξινομήθηκαν ως θήλεα. Η βαθμολογία για το χρωμόσωμα Y και το συνολικό εμβρυϊκό κλάσμα χρησιμοποιήθηκαν, στη συνέχεια, για την ταξινόμηση κάθε προσομοιωμένου δείγματος ως δείγματος με παρουσία χρωμοσώματος Y ή δείγματος με απουσία χρωμοσώματος Y με τη χρήση του τυπικού αλγορίθμου του συστήματος VeriSeq NIPT Solution v2.

Η ευαισθησία υπολογίστηκε με καθορισμό της συχνότητας ορθής ταξινόμησης των προσομοιωμένων δειγμάτων διδύμων XY/XY ή XX/XY ως δειγμάτων με παρουσία χρωμοσώματος Y. Η ειδικότητα υπολογίστηκε με καθορισμό της συχνότητας ορθής ταξινόμησης των προσομοιωμένων δειγμάτων διδύμων XX/XX ως δειγμάτων με απουσία χρωμοσώματος Y. Η εκτίμηση των διαστημάτων εμπιστοσύνης 95% έγινε με βάση τον αριθμό των πραγματικών κλινικών δειγμάτων διδύμων στο αρχικό σύνολο δεδομένων που ταξινομήθηκαν ως δείγματα με παρουσία χρωμοσώματος Y ή απουσία χρωμοσώματος Y.

Πίνακας 18 Εκτιμήσεις για την τρισωμία 21, 18 και 13 σε προσομοιωμένο πληθυσμό δίδυμων κυήσεων

	Τρισωμία 21	Τρισωμία 18	Τρισωμία 13	Παρουσία Υ
Ευαισθησία	96,4%	95,7%	93,6%	>99,9%
Αμφίπλευρο CI 95%	(86,4%, 98,9%)	(68,3%, 99,4%)	(64,1%, 98,9%)	(99,9%, >99,9%)
Ειδικότητα	99,9%	>99,9%	>99,9%	>99,9%
Αμφίπλευρο CI 95%	(99,8%, >99,9%)	(99,9%, >99,9%)	(99,9%, >99,9%)	(99,7%, >99,9%)

Ο Πίνακας 18 παρέχει σημειακές εκτιμήσεις και εκτιμώμενα διαστήματα εμπιστοσύνης 95% για την ευαισθησία και την ειδικότητα του VeriSeq NIPT Solution v2 όσον αφορά την ανίχνευση της τρισωμίας 21, 18, 13 και της παρουσίας του χρωμοσώματος Υ σε προσομοιωμένο πληθυσμό δίδυμων κυήσεων που συνάδει με τον πληθυσμό της προβλεπόμενης χρήσης. Η εκτίμηση των διαστημάτων εμπιστοσύνης έγινε με βάση τον αριθμό των κλινικών δειγμάτων δίδυμων που ολοκλήρωσαν επιτυχώς τον έλεγχο ποιότητας και τα οποία ταξινομήθηκαν είτε ως επηρεαζόμενα είτε ως μη επηρεαζόμενα από τη σχετική τρισωμία. Για τον υπολογισμό της ευαισθησίας λαμβάνεται ως υπόθεση ότι τα δύο τρίτα των επηρεαζόμενων δίδυμων κυήσεων είναι διζυγωτικές με ένα επηρεαζόμενο δίδυμο, ενώ το ένα τρίτο των επηρεαζόμενων δίδυμων κυήσεων είναι μονοζυγωτικές με αμφότερα τα δίδυμα να επηρεάζονται.

Ο Πίνακας 18 παραθέτει εκτιμήσεις που αφορούν μόνο δίδυμες κυήσεις. Λόγω του ακόμη χαμηλότερου επιπολασμού, τα δεδομένα για κυήσεις περισσότερων εμβρύων (τρίδυμες και άνω) ήταν ανεπαρκή για την ανάπτυξη κατάλληλων στατιστικών μοντέλων για την εκτίμηση της ακρίβειας ανίχνευσης ανευπλοειδίας.

## Αναλυτική απόδοση

### Ακρίβεια

Για την αξιολόγηση και την ποσοτικοποίηση του προσδιορισμού, διεξήχθη επαναληπτική ανάλυση των δεδομένων με το λογισμικό ανάλυσης του συστήματος VeriSeq NIPT Solution v2 από δύο προηγούμενες μελέτες με το σύστημα VeriSeq NIPT Solution:

- Μια μελέτη αναπαραγωγιμότητας σε πολλαπλά εργαστήρια που περιλάμβανε τρεις εκτελέσεις από τρεις χειριστές σε τρία εργαστήρια με τη χρήση μίας παρτίδας αντιδραστηρίου για συνολικά εννέα εκτελέσεις.
- Μια μελέτη ενδοεργαστηριακής ακρίβειας που περιλάμβανε 12 εκτελέσεις σε ένα εργαστήριο με τη χρήση δύο ML STAR, δύο συστημάτων οργάνων αλληλούχισης και τριών παρτίδων αντιδραστηρίων αλληλούχισης.

Στόχος της μελέτης ακρίβειας ήταν ο ποσοτικός προσδιορισμός της ακρίβειας του προσδιορισμού όσον αφορά την τρισωμία 21 (T21) και το χρωμόσωμα Υ, καθώς και η εκτίμηση της μεταβλητότητας μεταξύ διαφορετικών οργάνων, κιτ προετοιμασίας βιβλιοθηκών και παρτίδων αντιδραστηρίων αλληλούχισης. Η αναπαραγωγιμότητα για συνθήκες που δεν περιγράφονται παραπάνω δεν αξιολογήθηκε στο πλαίσιο των μελετών αυτών.

Δημιουργήθηκε μια ομάδα T21 εμβρυϊκού κλάσματος 5% με συνδυασμό cfDNA που εξήχθη από μητρικό πλάσμα από έγκυες γυναίκες (με έμβρυο επηρεαζόμενο από T21) και cfDNA που εκχυλίστηκε από πλάσμα από μη εγκύους γυναίκες. Δημιουργήθηκε επίσης ομάδα μητρικού-αρσενικού (έμβρυο XY) cfDNA με εμβρυϊκό κλάσμα 10%. Το πάνελ δειγμάτων για κάθε μελέτη για κάθε εκτέλεση περιλάμβανε 4 αντίγραφα της ομάδας επηρεαζόμενων από T21 δειγμάτων με εμβρυϊκό κλάσμα 5% και 20 αντίγραφα της ομάδας μητρικού-αρσενικού cfDNA με εμβρυϊκό κλάσμα 10%. Ο έλεγχος διενεργήθηκε για 10 ημέρες για σύνολο 21 εκτελέσεων για τις δύο μελέτες συνδυαστικά.

Η T21 και η παρουσία χρωμοσώματος Y επιλέχθηκαν για αξιολόγηση με βάση την αντιπροσωπευτικότητα των κλινικών καταστάσεων και την πολυπλοκότητα ανίχνευσης της ανωμαλίας. Δεδομένου ότι πρόκειται για το μικρότερο ανθρώπινο αυτοσωμικό χρωμόσωμα, το μέγεθος του χρωμοσώματος 21 έχει άμεσο αντίκτυπο στην ευαισθησία ανίχνευσης της T21, ιδίως σε χαμηλές τιμές εμβρυϊκού κλάσματος, όπως εκείνες που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν τη μελέτη. Το χρωμόσωμα Y, όπως υπάρχει στο μητρικό πλάσμα, είναι αποκλειστικά εμβρυϊκής προέλευσης και, συνεπώς, είναι πιο εύκολο να ανιχνευτεί από τον προσδιορισμό.

Ο μέσος όρος και οι τυπικές αποκλίσεις που παρατηρήθηκαν για τη βαθμολογία LLR για το χρωμόσωμα 21 και οι κανονικοποιημένες χρωμοσωμικές τιμές (normalized chromosomal values – NCV) για το χρωμόσωμα Y έδειξαν ότι η τυπική απόκλιση (standard deviation – SD) των αντιγράφων ήταν η μεγαλύτερη πηγή μεταβλητότητας. Οι διαφοροποιήσεις μεταξύ των εργαστηρίων, των οργάνων και των παρτίδων αντιδραστηρίων προσέθεσαν ασήμαντο βαθμό μεταβλητότητας, όπως καταδεικνύει η διαφορά μεταξύ της συνολικής SD και SD αντιγράφων που παρουσιάζει ο Πίνακας 19 και ο Πίνακας 20.

Πίνακας 19 Σύνοψη τυπικής απόκλισης (SD) (αναπαραγωγιμότητας) για την απόκριση αλληλούχισης σε πολλαπλά εργαστήρια

Απόκριση	N	Μέση τιμή	SD αντιγράφων	Συνολική SD αναπαραγωγιμότητας*
Βαθμολογία LLR για το χρωμόσωμα 21	36	34,43	11,36	11,36
NCV χρωμοσώματος Y	180	190,56	7,96	10,20

\*Το σύνολο περιλαμβάνει τη μεταβλητότητα λόγω εργαστηρίου, χειριστή, εκτέλεσης, ημέρας και αντιγράφου.

Πίνακας 20 Σύνοψη της ενδοεργαστηριακής ακρίβειας απόκρισης αλληλούχισης

Απόκριση	N	Μέση τιμή	SD αντιγράφων	Σύνολο ενδοεργαστηριακής SD*
Βαθμολογία LLR για το χρωμόσωμα 21	48	36,01	9,07	10,25
NCV χρωμοσώματος Y	240	198,68	7,63	7,82

\*Το σύνολο περιλαμβάνει τη μεταβλητότητα λόγω οργάνου αλληλούχισης, παρτίδας αντιδραστηρίου, χειριστή, εκτέλεσης, ημέρας και αντιγράφου.

Διεξήχθη πρόσθετη μελέτη για τη σύγκριση της ακρίβειας αλληλούχισης του συστήματος VeriSeq NIPT Solution v2 (συνολική τυπική απόκλιση) με τη χρήση της έκδοσης 2.0 κυψελίδας ροής αντί της έκδοσης 2.5. Η μελέτη περιλάμβανε δύο τύπους κυψελίδων ροής (v2.0 και v2.5), τρεις παρτίδες κιτ αλληλούχισης, τέσσερα συστήματα οργάνων και δύο εκτελέσεις αλληλούχισης ανά συνδυασμό για σύνολο 48 εκτελέσεων σε ένα μόνο εργαστήριο. Προετοιμάστηκε μία ομάδα αλληλούχισης από πλάκες cfDNA οι οποίες προετοιμάστηκαν χειροκίνητα. Το πάνελ δειγμάτων περιλάμβανε 4 αντίγραφα της ομάδας επηρεαζόμενων από T21 δειγμάτων με εμβρυϊκό κλάσμα 5% και 20 αντίγραφα της ομάδας μητρικού-αρσενικού (έμβρυο XY) cfDNA με εμβρυϊκό κλάσμα 10%. Τα αποτελέσματα της μελέτης που παρουσιάζει ο Πίνακας 21 υποστηρίζουν ότι δεν υπάρχει διαφορά στην ακρίβεια αλληλούχισης κατά τη χρήση κυψελίδας ροής v2.0 έναντι κυψελίδας ροής v2.5.

Πίνακας 21 Σύνοψη της ακρίβειας απόκρισης αλληλούχισης με τη χρήση κυψελίδας ροής v2.0 έναντι κυψελίδας ροής v2.5

Απόκριση	Αριθμός παρατηρήσεων ανά έκδοση	Συνολική SD για την v2.0*	Συνολική SD για την v2.5*	Στατιστικό αποτέλεσμα**
Βαθμολογία LLR για το χρωμόσωμα 21	96	9,56	8,44	Στατιστικά ισοδύναμο (τιμή-p = 0,25)
NCV χρωμοσώματος Y	480	7,74	7,38	Στατιστικά ισοδύναμο (τιμή-p = 0,38)

\*Το σύνολο περιλαμβάνει τη μεταβλητότητα λόγω οργάνου αλληλούχισης, παρτίδας αντιδραστηρίου, εκτέλεσης, ημέρας και αντιγράφου.

\*\*Βάσει ελέγχου F για την ισότητα των διακυμάνσεων (τυπικές αποκλίσεις στο τετράγωνο)

## Διασταυρούμενη επιμόλυνση

Η διασταυρούμενη επιμόλυνση αξιολογήθηκε στη ροή εργασιών προετοιμασίας δειγμάτων του συστήματος VeriSeq NIPT Solution. Ομάδες πλάσματος από μη εγκύους γυναίκες (XX) και ενήλικους άνδρες (XY) ελέγχθηκαν με τη μέθοδο της σκακιέρας (checkerboard) στη μορφή πλάκας 96 βοθρίων σε 4 πλάκες. N = 48 για τα δείγματα γυναικών και 48 για τα δείγματα ανδρών ανά πλάκα, για σύνολο 192 δειγμάτων γυναικών και 192 δειγμάτων ανδρών. Κανένα από τα δείγματα γυναικών δεν κατέδειξε κάλυψη με το χρωμόσωμα Y στατιστικά υψηλότερη από το εκτιμώμενο υπόβαθρο, γεγονός που υποδεικνύει απουσία επιμόλυνσης από δείγματα ανδρών εντός της ίδιας πλάκας. Δεν παρατηρήθηκε ανιχνεύσιμη διασταυρούμενη επιμόλυνση στο σύστημα VeriSeq NIPT Solution.

## Δυνητικά παρεμβαλλόμενες ουσίες

Ο αντίκτυπος δυνητικά παρεμβαλλόμενων ουσιών στο VeriSeq NIPT Solution εκτιμήθηκε με την αξιολόγηση της απόδοσης του προσδιορισμού παρουσία τέτοιων ουσιών.



Ομάδες μητρικού πλάσματος από μη επηρεαζόμενες κυήσεις θηλυκών εμβρύων (έμβρυο XX) εμπλουτίστηκαν με λευκωματίνη, χολερυθρίνη, αιμοσφαιρίνη και τριγλυκερίδια (ενδογενή). Ελέγχθηκαν σε δύο συγκεντρώσεις για κάθε ουσία της εξέτασης (n=16 για εκάστη). Δεν παρατηρήθηκε παρεμβολή στην απόδοση του προσδιορισμού.

Πίνακας 22 Δυνητικά παρεμβαλλόμενες ουσίες (ενδογενείς)

Εξεταζόμενη ουσία	Χαμηλή συγκέντρωση εξέτασης (mg/ml)	Υψηλή συγκέντρωση εξέτασης (mg/ml)
Λευκωματίνη	35	50
Χολερυθρίνη	0,01	0,15
Αιμοσφαιρίνη	100	200
Τριγλυκερίδια	1,5	5

Το γενωμικό DNA που απαντάται φυσικά (gDNA) στο πλάσμα μπορεί επίσης να επηρεάσει την απόδοση του προσδιορισμού, καθώς μπορεί να εκχυλιστεί μαζί με το εμβρυϊκό cfDNA. Τα επίπεδα του γενωμικού DNA στα 1,6, 3,3 και 4,9 ng ανά δείγμα (τα οποία αντιστοιχούν σε τυπικές αποκλίσεις 1, 2 και 3 πάνω από τη μέση αναμενόμενη συγκέντρωση gDNA έπειτα από 7 ημέρες αποθήκευσης του ολικού αίματος<sup>12</sup>) προστέθηκαν στο cfDNA που εκχυλίστηκε από μητρικό πλάσμα από μη επηρεαζόμενες κυήσεις θηλυκών εμβρύων (έμβρυο XX). Στη συνέχεια, τα δείγματα ελέγχθηκαν στο σύστημα VeriSeq NIPT Solution (n=16 για κάθε συγκέντρωση). Δεν παρατηρήθηκε παρεμβολή στην απόδοση του προσδιορισμού παρουσία αυξημένων επιπέδων gDNA.

Είκοσι δυνητικά παρεμβαλλόμενες ουσίες που βασίζονται σε φάρμακα (εξωγενείς) και χρησιμοποιούνται συνήθως ή συνταγογραφούνται κατά τη διάρκεια της κύησης ελέγχθηκαν σύμφωνα με το έγγραφο καθοδήγησης EP7-A2 [Interference Testing in Clinical Chemistry, Approved Guideline-Second Edition (Έλεγχος παρεμβαλλόμενων ουσιών στην κλινική χημεία. Εγκεκριμένο έγγραφο καθοδήγησης, δεύτερη έκδοση)]. Οι 20 δυνητικά παρεμβαλλόμενες ουσίες συνδυάστηκαν σε τέσσερις ομάδες, ενοφθαλμίστηκαν σε μητρικό πλάσμα από μη επηρεαζόμενες κυήσεις θηλυκών εμβρύων (έμβρυο XX) και ελέγχθηκαν στο σύστημα VeriSeq NIPT Solution (N=16 για κάθε ομάδα). Δεν παρατηρήθηκε παρεμβολή στην απόδοση του προσδιορισμού παρουσία αυτών των εξωγενών ουσιών.

Πίνακας 23 Δυνητικά παρεμβαλλόμενες ουσίες (εξωγενείς)

Ομάδα 1	Ομάδα 2	Ομάδα 3	Ομάδα 4
Παρακεταμόλη	Διφαινυδραμίνη	Αλβουτερόλη	Σετιριζίνη
Ακετυλοκυστεΐνη	Ερυθρομυκίνη	Βουπροπιόνη	Δεξτρομεθορφάνη
Βισοπρολόλη	Γουαΐφενεσίνη	Καφεΐνη	L-ασκορβικό οξύ
Σιταλοπράμη	Ηπαρίνη	Σερτραλίνη	Μετοπρολόλη
Δεσλοραταδίνη	Λιδοκαΐνη	Φθοριούχο νάτριο	Ναδολόλη

## Όριο ανίχνευσης

Το όριο ανίχνευσης (LOD) ορίζεται ως το επίπεδο του εμβρυϊκού κλάσματος που αντιστοιχεί στην πιθανότητα ανίχνευσης 95% μιας κατάστασης ενδιαφέροντος, όπως η τρισωμία 21 (T21). Για την αξιολόγηση του LOD του συστήματος VeriSeq NIPT Solution v2 για διάφορες συνθήκες καταστάσεις, διεξήχθησαν μελέτες και στατιστικές αναλύσεις.

Η πιθανότητα ανίχνευσης μιας κατάστασης ενδιαφέροντος σε ένα επηρεαζόμενο δείγμα που υποβάλλεται σε επεξεργασία με το σύστημα VeriSeq NIPT Solution v2 εξαρτάται κυρίως από τρεις παράγοντες:

- Εμβρυϊκό κλάσμα
- Βάθος αλληλούχισης
- Μέγεθος και πολυπλοκότητα της γενωμικής περιοχής ενδιαφέροντος

Εάν υποθεθεί ότι το βάθος αλληλούχισης είναι σταθερό, μια δεδομένη απόκλιση είναι πιο εύκολο να ανιχνευτεί σε ένα δείγμα με υψηλότερο ποσοστό εμβρυϊκού κλάσματος απ' ό,τι σε ένα δείγμα με χαμηλότερο ποσοστό εμβρυϊκού κλάσματος. Αντιθέτως, εάν υποθεθεί ότι το εμβρυϊκό κλάσμα είναι σταθερό, μια δεδομένη απόκλιση είναι πιο εύκολο να ανιχνευτεί σε ένα δείγμα με μεγαλύτερο βάθος αλληλούχισης απ' ό,τι σε ένα δείγμα με μικρότερο βάθος αλληλούχισης. Τέλος, οι αποκλίσεις σε μικρότερες ή πιο πολύπλοκες γενωμικές περιοχές είναι πιο δύσκολο να ανιχνευτούν απ' ό,τι οι αποκλίσεις σε μεγαλύτερες ή λιγότερο πολύπλοκες γενωμικές περιοχές, εάν υποθεθεί ότι το εμβρυϊκό κλάσμα και το βάθος αλληλούχισης είναι σταθερά.

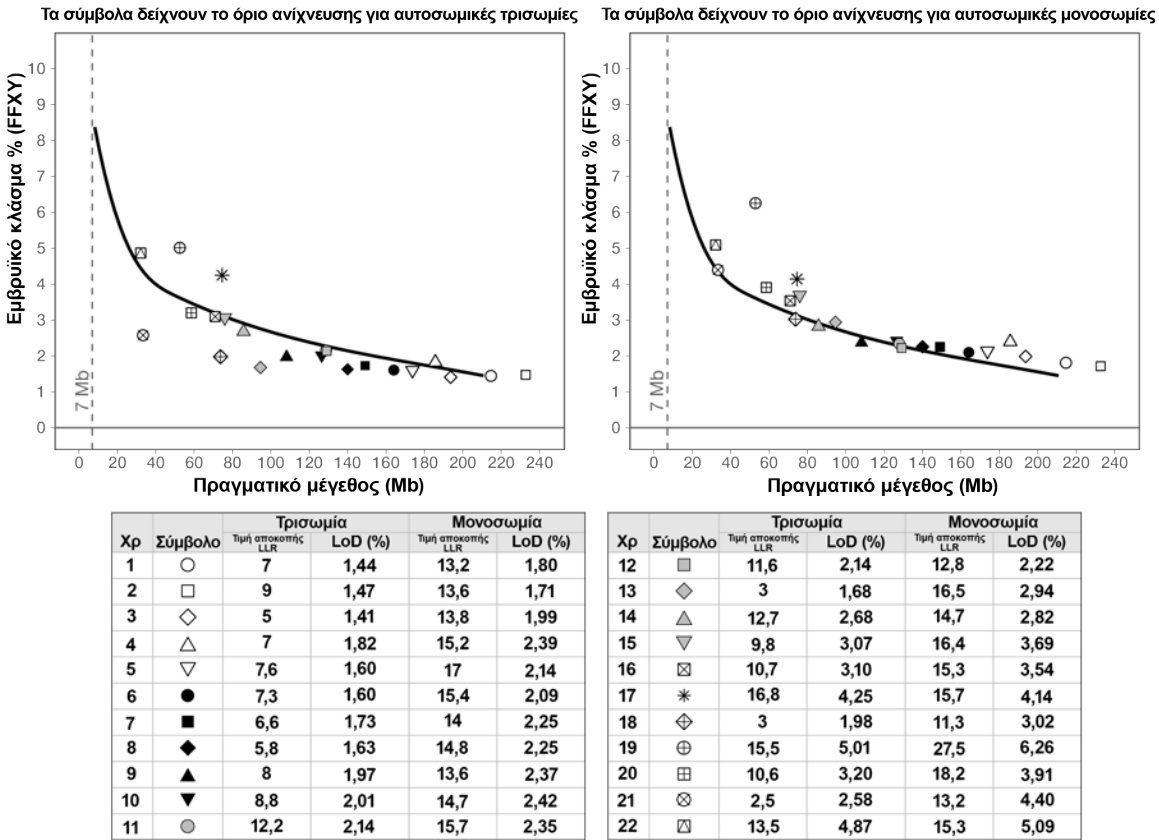
Για να προσδιοριστεί το LOD για την ανίχνευση της T21, αναλύθηκαν δείγματα που περιείχαν μείγματα ομαδοποιημένων δειγμάτων T21 και ομαδοποιημένων μη επηρεαζόμενων δειγμάτων. Οι δύο τύποι αναλυόμενης ουσίας αναμείχθηκαν σε μια σειρά τιτλοποίησης για να δημιουργηθεί ένα σύνολο επτά επιπέδων εμβρυϊκού κλάσματος (0, 2, 3, 4, 5, 6 και 10%). Κάθε επίπεδο αντιπροσωπευόταν από συνολικά 10 αντίγραφα.

Για την περαιτέρω αύξηση της ανάλυσης του πίνακα εμβρυϊκών κλασμάτων για την ανάλυση LOD, στα δεδομένα από αυτήν τη μελέτη προστέθηκαν δεδομένα που ελήφθησαν από αραίωση *in silico*. Οι επιδράσεις της πειραματικής αραίωσης και της τιτλοποίησης προσομοιώθηκαν με ελεγχόμενη ανάμειξη των δεδομένων αλληλούχισης. Τα δεδομένα από αυτήν την τιτλοποίηση *in silico* κάλυπταν ένα σύνολο 14 επιπέδων εμβρυϊκού κλάσματος (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 και 4,50%) με 32 αντίγραφα για κάθε επίπεδο. Στα δεδομένα που προέκυψαν εφαρμόστηκε ανάλυση πιθανομονάδων (probit) για να προσδιοριστεί το LOD για την T21.

Ανεξάρτητα από τα παραπάνω, αναπτύχθηκε ένα στατιστικό μοντέλο που χρησιμοποιούσε το εμβρυϊκό κλάσμα, το βάθος αλληλούχισης και το μέγεθος / την πολυπλοκότητα της γενωμικής περιοχής για την πρόβλεψη της πιθανότητας ανίχνευσης τυχόν απόκλισης σε οποιοδήποτε δείγμα. Αυτό το μοντέλο δημιουργήθηκε από τα δεδομένα που αντιστοιχούσαν σε ένα σύνολο 1.405 δειγμάτων XY. Το LOD για την T21, όπως προβλέφθηκε από αυτό το μοντέλο, προσδιορίστηκε ότι είναι σύμφωνο με την εκτίμηση που βασίστηκε σε ανάλυση πιθανομονάδων (probit), η οποία περιγράφεται παραπάνω. Αυτό το στατιστικό μοντέλο χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση των τιμών LOD για ανευπλοειδίες σε όλα τα αυτοσωμικά χρωμοσώματα και για μερικές διαγραφές και διπλασιασμούς.

Η **Εικόνα 2** δείχνει την πιθανότητα ανίχνευσης 95% για μέσες περιοχές ανά μέγεθος και τα αυτοσωμικά όρια ανίχνευσης για όλες τις τρισωμίες και όλες τις μονοσωμίες. Η τιμή αποκοπής LLR για CNV είναι 15,1.

Εικόνα 2 95% πιθανότητες ανίχνευσης για μέσες περιοχές ανά μέγεθος για το VeriSeq NIPT Solution v2



# Αντιμετώπιση προβλημάτων

## Αντιμετώπιση προβλημάτων του VeriSeq NIPT Solution v2

Λειτουργία αποτυχίας	Πιθανό αποτέλεσμα	Ερμηνεία	Συνιστώμενη ενέργεια	Σχόλια
Εισαγωγή ανεπαρκούς πλάσματος	Αποτυχία ελέγχου ποιότητας δείγματος	Ανεπαρκής όγκος πλάσματος.	Εκ νέου λήψη	Βάσει οπτικής επιθεώρησης του όγκου πλάσματος.
Αποτυχία σωλήνα αίματος	Δεν γίνεται διαχωρισμός του αίματος σε στιβάδες	Το δείγμα δεν υποβλήθηκε σε φυγοκέντρηση.	Βεβαιωθείτε ότι η φυγοκέντρηση ξεκίνησε και ότι ο σωλήνας περιστράφηκε με τη σωστή δύναμη. Επαναλάβετε τη λήψη δείγματος.	
		Ακατάλληλη αποθήκευση ή μεταφορά δείγματος (αιμόλυση δείγματος).	Επαναλάβετε τη λήψη δείγματος.	Τα κατεψυγμένα δείγματα δεν θα διαχωριστούν. Οι ακατάλληλες συνθήκες μεταφοράς ή αποθήκευσης ενδέχεται να οδηγήσουν σε αιμόλυση των δειγμάτων.

Λειτουργία αποτυχίας	Πιθανό αποτέλεσμα	Ερμηνεία	Συνιστώμενη ενέργεια	Σχόλια
Απόφραξη ή αργή ροή δείγματος	Μόλυνση πλάσματος	Μεμονωμένα δείγματα μπορεί να προκαλέσουν απόφραξη της πλάκας δέσμευσης εάν υπάρχει σημαντική μόλυνση στο δείγμα πλάσματος.	Επιθεωρήστε το δείγμα. Εάν το εναπομείναν πλάσμα στον σωλήνα είναι κόκκινο ή γαλακτώδες, ακυρώστε το δείγμα και ζητήστε εκ νέου λήψη. Εάν το δείγμα φαίνεται φυσιολογικό, επανεξετάστε το δείγμα.	
	Υπερχείλιση δειγμάτων	Ακατάλληλη οπτική επιθεώρηση κάθε σωλήνα για την καταλληλότητα των δειγμάτων.	Ακυρώστε τυχόν δείγματα σε παρακείμενα βοθρία που επηρεάζονται από την υπερχείλιση.	Ενδέχεται να υποδεικνύει ακατάλληλη μεταφορά ή αποθήκευση των δειγμάτων πριν από την επεξεργασία. Αποκλείστε τα ακατάλληλα δείγματα από την επεξεργασία.
	Δυσλειτουργία υλικού	Ανεπαρκής πέψη υλικού κατά την εκχύλιση.	Επανεξετάστε το δείγμα. Εάν το πρόβλημα συνεχίζεται στο σημείο των βοθρίων με άλλα δείγματα, επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής υποστήριξης της Illumina.	

Λειτουργία αποτυχίας	Πιθανό αποτέλεσμα	Ερμηνεία	Συνιστώμενη ενέργεια	Σχόλια
Αποτυχία ελέγχου ποιότητας ανάλυσης μεμονωμένου δείγματος	Αποτυχία ελέγχου ποιότητας αλληλούχησης	<p>Πιθανές αιτίες:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Εισαγωγή ανεπαρκούς γενετικού υλικού</li> <li>• Εσφαλμένη μεταφορά κατά τον χειρισμό του δείγματος</li> <li>• Αστοχία του αντιδραστηρίου αλληλούχησης</li> </ul>	<p>Ελέγξτε την επισημείωση του δείγματος. Ελέγξτε για παρόμοια απόδοση σε προηγούμενα δείγματα σε σχετική θέση πλάκας. Επανεξετάστε το δείγμα.</p>	<p>Υποδεικνύει είτε εισαγωγή ανεπαρκούς δείγματος είτε εσφαλμένη μεταφορά στο ML STAR. Το ανεπαρκές γενετικό υλικό μπορεί να οφείλεται σε ανεπαρκές DNA ελεύθερο κυττάρων (cell-free) στο πλάσμα ή σε κυτταρικό (cell-based) DNA που προκαλεί υπεραραίωση του δείγματος προς αλληλούχηση.</p>
	Χαμηλό FF ή χαμηλός αριθμός μη αποκλειόμενων περιοχών (NES)	Τα δεδομένα που δημιουργήθηκαν είναι ανεπαρκή ακριβή αναφορά.	Επανεξετάστε από πλάσμα.	

Λειτουργία αποτυχίας	Πιθανό αποτέλεσμα	Ερμηνεία	Συνιστώμενη ενέργεια	Σχόλια
Αποτυχία ελέγχου ποιότητας ποσοτικού προσδιορισμού	Ο ποσοτικός προσδιορισμός απέτυχε. Διάμεσος παρτίδων κάτω από την ελάχιστη τιμή	Ανεπαρκής απόδοση διαδικασίας.	Επαναλάβετε τον ποσοτικό προσδιορισμό. Εάν η επανάληψη αποτύχει, επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής υποστήριξης της Illumina.	Εάν οι μετρήσεις της πρότυπης καμπύλης δεν είναι επιτυχείς, αυτό μπορεί να υποδεικνύει προβλήματα είτε με τη δημιουργία βιβλιοθήκης (δηλ. χρήση αιθανόλης με βαθμό καθαρότητας ακατάλληλο για βιολογικές εφαρμογές) είτε με τη διαδικασία ποσοτικού προσδιορισμού.
	Ο ποσοτικός προσδιορισμός απέτυχε	Αποτυχία πρότυπης καμπύλης.	Επαναλάβετε τον ποσοτικό προσδιορισμό. Εάν η επανάληψη αποτύχει, επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής υποστήριξης της Illumina.	
Αποτυχία ομαδοποίησης	Αποτυχία ολοκλήρωσης της ομαδοποίησης των δειγμάτων	Η ανάλυση ομαδοποίησης δεν μπορεί να υπολογίσει κατάλληλους όγκους στην ομάδα.	Επαναξιολογήστε τη στοχευόμενη συγκέντρωση της ομάδας. Επανεκτελέστε την ανάλυση ομαδοποίησης	

## Αντιμετώπιση προβλημάτων VeriSeq NIPT Microlab STAR

Βήμα διαδικασίας	Κωδικός σφάλματος	Πλαίσιο διαλόγου σφάλματος	Περιγραφή	Επίλυση από τον χρήστη
Δημιουργία παρτίδας	EM0044	The Batch ID entered contains forbidden characters. (Το αναγνωριστικό παρτίδας που εισήχθη περιέχει απαγορευμένους χαρακτήρες.)	Το VeriSeq NIPT Solution v2 δέχεται μόνο αριθμούς, γράμματα, κάτω παύλες και παύλες για όλα τα πεδία δεδομένων.	Μετονομάστε την παρτίδα χρησιμοποιώντας ένα όνομα που δεν περιέχει ειδικούς χαρακτήρες.
Δημιουργία παρτίδας	EM0051	The Batch ID is greater than 36 characters in length. (Το μήκος του αναγνωριστικού παρτίδας είναι μεγαλύτερο από 36 χαρακτήρες.)	Το VeriSeq NIPT Solution v2 περιορίζει το μήκος των ονομάτων παρτίδας σε 36 χαρακτήρες ή λιγότερο.	Μετονομάστε την παρτίδα χρησιμοποιώντας ένα όνομα που περιέχει λιγότερους από 36 χαρακτήρες.
Δημιουργία παρτίδας	EM0076	Unable to connect to VeriSeq Onsite Server v2 (Δεν είναι δυνατή η σύνδεση στον επιτόπιο διακομιστή VeriSeq v2)	Ο επιτόπιος διακομιστής VeriSeq v2 δεν ανταποκρίνεται σε αιτήματα δεδομένων από το πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασιών.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Βεβαιωθείτε ότι το ML STAR είναι συνδεδεμένο στο δίκτυο.</li> <li>2. Βεβαιωθείτε ότι ο επιτόπιος διακομιστής VeriSeq v2 είναι ενεργοποιημένος.</li> <li>3. Ελέγξτε ότι το ML STAR μπορεί να συνδεθεί στον επιτόπιο διακομιστή VeriSeq v2 (μέσω αιτήματος ring).</li> <li>4. Εάν το πρόβλημα δεν επιλυθεί με τα παραπάνω βήματα, επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής υποστήριξης της Illumina.</li> </ol>



Βήμα διαδικασίας	Κωδικός σφάλματος	Πλαίσιο διαλόγου σφάλματος	Περιγραφή	Επίλυση από τον χρήστη
Δημιουργία παρτίδας	EM0118	This batch has been failed and cannot be further processed. (Αυτή η παρτίδα απέτυχε και δεν μπορεί να υποβληθεί σε περαιτέρω επεξεργασία.)	Η καθορισμένη παρτίδα έχει αποτύχει ήδη και δεν μπορεί να υποβληθεί σε περαιτέρω επεξεργασία.	Σύμφωνα με το αρχείο παρτίδων στον επιτόπιο διακομιστή VeriSeq v2, η επιλεγμένη παρτίδα έχει αποτύχει. Δεν επιτρέπεται περαιτέρω επεξεργασία. Δημιουργήστε άλλη παρτίδα με τα απαιτούμενα δείγματα.
Δημιουργία παρτίδας	Δεν ισχύει	This batch has already completed processing. Would you like to repool? (Η επεξεργασία αυτής της παρτίδας έχει ολοκληρωθεί ήδη. Θα θέλατε να εκτελεστεί εκ νέου ομαδοποίηση;)	Η αναφερόμενη παρτίδα έχει υποβληθεί σε επεξεργασία μέσω ομαδοποίησης. Η μόνη επιτρεπόμενη επεξεργασία είναι η εκ νέου ομαδοποίηση.	Για εκ νέου ομαδοποίηση, ακολουθήστε τα παρακάτω βήματα. <ul style="list-style-type: none"> <li>• Επιλέξτε <b>Re-Pool</b> (Εκ νέου ομαδοποίηση).</li> <li>• Μатаιώστε τη μέθοδο και βεβαιωθείτε ότι το όνομα της παρτίδας είναι σωστό, πριν από την εκτέλεση εκ νέου ομαδοποίησης.</li> </ul>
Απομόνωση πλάσματος	WP0087	Duplicate sample barcodes loaded. (Φορτώθηκαν διπλότυποι γραμμωτοί κώδικες δειγμάτων.)	Έχουν φορτωθεί στο σύστημα δείγματα με πανομοιότυπους γραμμωτούς κώδικες.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ακολουθήστε τα μηνύματα προτροπής του προγράμματος διαχείρισης ροής εργασιών για να εντοπίσετε τα δείγματα που είναι διπλότυπα.</li> <li>2. Αφαιρέστε τα διπλότυπα και επισημάνετε τα εκ νέου ή αντικαταστήστε τα.</li> <li>3. Επαναφορτώστε τα δείγματα.</li> </ol>

Βήμα διαδικασίας	Κωδικός σφάλματος	Πλαίσιο διαλόγου σφάλματος	Περιγραφή	Επίλυση από τον χρήστη
Απομόνωση πλάσματος	EP0102	Samples specified in the Sample Sheet were not loaded. (Τα δείγματα που καθορίζονται στο φύλλο δειγμάτων δεν φορτώθηκαν.)	Τα δείγματα που περιλαμβάνονται στο φύλλο δειγμάτων δεν συμπεριλήφθηκαν στους γραμμωτούς κώδικες που φορτώθηκαν.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ακολουθήστε τα μηνύματα προτροπής του προγράμματος διαχείρισης ροής εργασιών για να εντοπίσετε τα δείγματα που λείπουν.</li> <li>2. Εκτελέστε ένα από τα παρακάτω βήματα: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Προσθέστε τα δείγματα που λείπουν στην παρτίδα και επαναφορτώστε τα δείγματα.</li> <li>• Μатаιώστε τη μέθοδο και τροποποιήστε το φύλλο δειγμάτων όπως απαιτείται. Επανεκκινήστε τη μέθοδο.</li> </ul> </li> </ol>
Φόρτωση πλακών	Δεν ισχύει	Venus Barcode Mask Error (Σφάλμα μάσκας γραμμωτού κώδικα Venus)	Το πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασιών επιβάλλει σωστή συσχέτιση πλάκας και παρτίδας με τη χρήση μασκών γραμμωτού κώδικα Venus.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ελέγξτε την τοποθέτηση της πλάκας και επιβεβαιώστε ότι η διάταξη της πλάκας είναι σωστή.</li> <li>2. Βεβαιωθείτε ότι η πλάκα που έχει φορτωθεί είναι η σωστή πλάκα για την αναφερόμενη παρτίδα.</li> </ol>

Βήμα διαδικασίας	Κωδικός σφάλματος	Πλαίσιο διαλόγου σφάλματος	Περιγραφή	Επίλυση από τον χρήστη
Εκχύλιση cfDNA	WE0150	Pressure in the vacuum chamber is too low. (Η πίεση στον θάλαμο κενού είναι πάρα πολύ χαμηλή.)	Το πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασιών δεν προχωρά εάν η υπολειπόμενη αίσθηση πίεσης γραμμής κενού είναι <400 Torr.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ελέγξτε για συστροφές ή άλλα εμπόδια στη γραμμή κενού.</li> <li>2. Ανοίξτε τα κλιπ απελευθέρωσης γραμμής αποβλήτων, περιμένετε να εκτονωθεί η πίεση και κατόπιν κλείστε εντελώς τα κλιπ απελευθέρωσης γραμμής.</li> <li>3. Βεβαιωθείτε ότι ο ελεγκτής και η αντλία κενού έχουν ενεργοποιηθεί.</li> <li>4. Ελέγξτε τη φιάλη αποβλήτων κενού. Εάν η φιάλη αποβλήτων είναι γεμάτη πάνω από το μισό, αδειάστε την.</li> <li>5. Εάν το πρόβλημα παραμένει, επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής υποστήριξης της Illumina.</li> </ol>
Εκχύλιση cfDNA	WE0153	Pressure in the vacuum chamber is too high. (Η πίεση στον θάλαμο κενού είναι πάρα πολύ υψηλή.)	Εάν η μετρηθείσα πίεση κενού είναι πάρα πολύ υψηλή πριν από την έναρξη του ελέγχου πίεσης, μπορεί να υπάρχει δυσλειτουργία στο σύστημα.	Στο πίσω μέρος του ελεγκτή, βεβαιωθείτε ότι όλες οι συνδέσεις και οι γραμμές κενού είναι σταθερές.

Βήμα διαδικασίας	Κωδικός σφάλματος	Πλαίσιο διαλόγου σφάλματος	Περιγραφή	Επίλυση από τον χρήστη
Εκχύλιση cfDNA	WE0996	Vacuum failed to seal. (Αποτυχία σφράγισης κενού.)	Η αποτυχία σφράγισης πρέπει να διορθωθεί για να μπορείτε να συνεχίσετε.	<p>Επαληθεύστε ότι η αποτυχία σφράγισης έχει διορθωθεί και επιλέξτε <b>OK</b>.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Βεβαιωθείτε ότι η πλάκα δέσμευσης βρίσκεται δίπλα στην πολλαπλή κενού. Φορώντας γάντι, πιέστε με δύναμη προς τα κάτω την πλάκα δέσμευσης.</li> <li>Περιμένετε να ακουστεί ο βόμβος του συστήματος κενού και παρατηρήστε τη ροή νερού μέσα από την πλάκα δέσμευσης.</li> <li>Ανοίξτε την προβολή του αρχείου καταγραφής στο πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασιών. Όταν η πραγματική μέτρηση πίεσης φτάσει τουλάχιστον 50 μονάδες πίεσης κάτω από τη μέτρηση της πίεσης περιβάλλοντος, επιλέξτε <b>OK</b> για να προχωρήσετε στην εκχύλιση cfDNA.</li> <li>Εάν δεν επιτευχθεί η απαιτούμενη μέτρηση πίεσης εντός του προβλεπόμενου χρόνου, επιλέξτε <b>OK</b> για να προχωρήσετε στην πρώτη φόρτωση προϊόντος λύσης.</li> <li>Μετά τη διανομή του προϊόντος λύσης στην πλάκα δέσμευσης, προχωρήστε σε παύση της μεθόδου. Επανατοποθετήστε και πιέστε την πλάκα δέσμευσης με δύναμη προς τα κάτω.</li> <li>Εάν δεν υπάρχει ροή του προϊόντος λύσης μέσα από την πλάκα, επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής υποστήριξης της Illumina.</li> </ol>

Βήμα διαδικασίας	Κωδικός σφάλματος	Πλαίσιο διαλόγου σφάλματος	Περιγραφή	Επίλυση από τον χρήστη
Εκχύλιση cfDNA	WM0219	If Vacuum is on, manually rest the pump. (Εάν το κενό είναι ενεργοποιημένο, απενεργοποιήστε χειροκίνητα την αντλία.)	Το κενό μπορεί να παραμείνει ενεργό μετά από ματαίωση της μεθόδου κατά τη διάρκεια της εκχύλισης.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Στον ελεγκτή κενού, πατήστε το κουμπί <b>τροφοδοσίας</b> για να απενεργοποιήσετε το κενό.</li> <li>2. Περιμένετε 10 δευτερόλεπτα και, στη συνέχεια, πατήστε ξανά το κουμπί <b>τροφοδοσίας</b> για να ενεργοποιήσετε το κενό.</li> </ol>
Εκχύλιση cfDNA	EE0477	An error has occurred while moving a plate. (iSWAP error) [Πρόέκυψε σφάλμα κατά τη μετακίνηση μιας πλάκας. (σφάλμα iSWAP)]	Πρόέκυψε ένα σφάλμα iSWAP (πτώση πλάκας, αποτυχία σύλληψης κ.λπ.). Το σύστημα σας ζητά να ολοκληρώσετε τη μετακίνηση της πλάκας χειροκίνητα.	<p>Βεβαιωθείτε ότι η πλάκα μπορεί να ανακτηθεί (δεν υπάρχει διαρροή υλικού).</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Εάν η πλάκα δεν μπορεί να ανακτηθεί, ματαιώστε την εκτέλεση.</li> <li>• Εάν η πλάκα μπορεί να ανακτηθεί, ακολουθήστε τις εμφανιζόμενες οδηγίες για να ολοκληρώσετε τη μεταφορά της πλάκας χειροκίνητα.</li> </ul>
Εκχύλιση cfDNA	EE0519	Scanned barcode does not match Binding Plate barcode on record. (Ο σαρωμένος γραμμωτός κώδικας δεν συμφωνεί με τον καταχωρισμένο γραμμωτό κώδικα της πλάκας δέσμευσης.)	Η πλάκα δέσμευσης που φορτώθηκε δεν συμφωνεί με τον γραμμωτό κώδικα της πλάκας που αφαιρέθηκε.	Βεβαιωθείτε ότι η πλάκα που έχει φορτωθεί συμφωνεί με τον καταχωρισμένο γραμμωτό κώδικα (βλ. αρχείο καταγραφής για τον αναμενόμενο γραμμωτό κώδικα).

Βήμα διαδικασίας	Κωδικός σφάλματος	Πλαίσιο διαλόγου σφάλματος	Περιγραφή	Επίλυση από τον χρήστη
API	EA0372	Unable to connect to the data server. (Δεν είναι δυνατή σύνδεση στον διακομιστή δεδομένων.)	Ο επιτόπιος διακομιστής VeriSeq v2 δεν ανταποκρίνεται σε αιτήματα δεδομένων από το πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασιών.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Βεβαιωθείτε ότι το ML STAR είναι συνδεδεμένο στο δίκτυο.</li> <li>2. Βεβαιωθείτε ότι ο επιτόπιος διακομιστής VeriSeq v2 είναι ενεργοποιημένος.</li> <li>3. Ελέγξτε ότι το ML STAR μπορεί να συνδεθεί στον επιτόπιο διακομιστή VeriSeq v2 (μέσω αιτήματος ping).</li> </ol>
	EA0774	Connection Error. The API server connection failed to validate. (Σφάλμα σύνδεσης. Δεν ήταν δυνατή η επικύρωση της σύνδεσης με τον διακομιστή API.)	Ο επιτόπιος διακομιστής VeriSeq v2 έπαψε να ανταποκρίνεται σε αιτήματα δεδομένων από το πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασιών.	<p>Βεβαιωθείτε ότι:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Βεβαιωθείτε ότι το ML STAR είναι συνδεδεμένο στο δίκτυο.</li> <li>2. Ελέγξτε ότι το ML STAR μπορεί να συνδεθεί στον επιτόπιο διακομιστή VeriSeq v2 (μέσω αιτήματος ping).</li> <li>3. Βεβαιωθείτε ότι ο επιτόπιος διακομιστής VeriSeq v2 είναι ενεργοποιημένος.</li> </ol>
	EA0780	403: Invalid Request The current transaction is not valid. (403: Μη έγκυρο αίτημα. Η τρέχουσα συναλλαγή δεν είναι έγκυρη.)	Τα δεδομένα που στάλθηκαν παραβιάζουν τη λογική της ροής εργασιών του συστήματος.	Για περισσότερες πληροφορίες διαβάστε τις λεπτομέρειες σφάλματος. Οι συνήθεις αιτίες περιλαμβάνουν εισαγωγές με πάρα πολύ μεγάλο μήκος ή εισαγωγές που παραβιάζουν την αποδεκτή λίστα χαρακτήρων.

## Βιβλιογραφία

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.



# Ιστορικό αναθεωρήσεων

Έγγραφο	Ημερομηνία	Περιγραφή αλλαγής
Αρ. εγγράφου 1000000078751 έκδ. 09	Απρίλιος 2024	<p>Διαγραφές</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ο υπό κατάργηση αριθμός είδους 20030577.</li> <li>• Απαιτούμενη μέγιστη χωρητικότητα σωλήνα για τη φυγοκέντρηση σωλήνων συλλογής αίματος.</li> </ul> <p>Προσθήκες</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Νέος αριθμός είδους 20101927 για τον επιτόπιο διακομιστή VeriSeq v2.</li> <li>• Μονάδα διαστάσεων για τους σωλήνες συλλογής αίματος των 10 ml.</li> <li>• Αποσαφήνιση των συμβατών εκδόσεων του SoftMax Pro.</li> <li>• Σημείωση που αποσαφηνίζει ότι μόνο τα συμβατά πλαστικά είδη μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εναλλάξιμα στο VeriSeq NIPT MicroLab STAR.</li> <li>• Σημείωση για προειδοποίηση προσμείξεων στα δείγματα στην ενότητα «Ερμηνεία αποτελεσμάτων».</li> <li>• Σύσταση προσοχής όπου επισημαίνεται ότι τα δείγματα ολικού αίματος που έχουν συλλεγεί σε Cell-Free DNA BCT της Streck δεν πρέπει να καταψύχονται.</li> <li>• Σύσταση προσοχής για την αποφυγή της έκθεσης των δειγμάτων σε αυξημένες θερμοκρασίες.</li> <li>• Αποσαφήνιση των περιορισμών της μεθόδου προσδιορισμού και των συνθηκών αναπαραγωγιμότητας.</li> <li>• Επισήμανση της τιμής αποκοπής LLR για CNV στην Εικόνα 2 της ενότητας «Όριο ανίχνευσης».</li> </ul> <p>Ενημερώσεις</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Αλλαγή της αναφοράς στο συμβατό δοχείο αντιδραστηρίων από Roche Reagent Tub σε Illumina Reagent Tub και προσθήκη νέου αριθμού εξαρτήματος.</li> <li>• Αλλαγή του αριθμού εξαρτήματος καταλόγου για το Thermo Fisher Multifuge X4 Pro-MD σε 75016034.</li> </ul>

Έγγραφο	Ημερομηνία	Περιγραφή αλλαγής
Αρ. εγγράφου 1000000078751 έκδ. 09	Απρίλιος 2024	<ul style="list-style-type: none"> <li>Σύσταση προσοχής που επισημαίνει ότι η ασυνέπεια στους όγκους των βοθρίων μπορεί να προκαλέσει αποτυχία του αυτοματοποιημένου ελέγχου ποιότητας των δειγμάτων.</li> <li>Αναφορές σε ένθετα συσκευασίας οργάνων.</li> </ul>
Αρ. εγγράφου 1000000078751 έκδ. 08	Αύγουστος 2022	Ενημέρωση του αριθμού εξαρτήματος για τη ροή εργασιών Διαγραφή της οδηγίας για ανάμειξη με πιπετάρισμα σε περίπτωση κατάψυξης της πλάκας βιβλιοθήκης.
Αρ. εγγράφου 1000000078751 έκδ. 07	Μάιος 2022	<p>Διαχωρισμός των περιορισμών της διαδικασίας σε ειδική ενότητα για τις Αναφορές του VeriSeq NIPT Solution v2 και προσθήκη λίστας με κουκκίδες με δύο σημεία. Το υπόλοιπο κείμενο μετακινήθηκε σε νέα ενότητα με τίτλο «Περιορισμοί της μεθόδου προσδιορισμού».</p> <p>Διαγραφές</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Το VeriSeq από την επισήμανση όλων των αντιδραστηρίων.</li> <li>Η εφαρμογή γραμμωτού κώδικα πλάκας στην πλάκα προσαρμογέα VeriSeq NIPT στο στάδιο της προετοιμασίας βιβλιοθηκών.</li> </ul> <p>Προσθήκες</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Η λέξη «πιστοποιημένο» για το νερό ελεύθερο DNase/RNase.</li> <li>Ένα από τα παρακάτω συστήματα ανάγνωσης μικροπλακών ή ισοδύναμο και SpectraMax M2, M3, M4, M5 και σχετική σημείωση.</li> <li>Επεξήγηση των απαιτούμενων ενεργειών για τον χειρισμό σφαλμάτων στην ενότητα VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>Σημείωση για οπτική επιθεώρηση των βοθρίων.</li> <li>Οδηγίες για τις παρτίδες 24 και 48 δειγμάτων σε όλες τις ενότητες του πρωτοκόλλου.</li> <li>Προσθήκη βημάτων όταν πρέπει να χρησιμοποιηθεί η μοβ πλάκα προσαρμογέα ή ισοδύναμη.</li> <li>Κείμενο στην ενότητα «Δημογραφικά στοιχεία και χαρακτηριστικά κύησης», για να περιληφθούν αποτελέσματα για το πρώτο τρίμηνο της κύησης.</li> <li>Προσθήκη κουκκίδας «αντίσταση στη ροπή» στις προδιαγραφές για τις πλάκες βοθρίων μεγάλου βάθους.</li> </ul>

Έγγραφο	Ημερομηνία	Περιγραφή αλλαγής
		<p>Ενημερώσεις</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Κείμενο για μοναδικά ονόματα παρτίδων για μεγαλύτερη σαφήνεια και παράθεση παραδείγματος.</li> <li>• Σύμβολα και μορφοποίηση για σημειώσεις, συστάσεις προσοχής και προειδοποιήσεις.</li> <li>• Επιμέρους κουκκίδες στα αποτελέσματα δοκιμών.</li> <li>• Αλλαγή από «θειοκυανική γουανιδίνη» σε «υδροχλωρική γουανιδίνη».</li> <li>• Αλλαγή από CVS σε BVS (Basic Vacuum System, Βασικό σύστημα κενού)</li> <li>• Κείμενο για τη χρήση της εξέτασης ανίχνευσης στο πλήρες γονιδίωμα και τη βαθμολογία LLR.</li> <li>• Προδιαγραφές: Προδιαγραφές για δοχείο αντιδραστηρίων, πλάκες βοθρίων μεγάλου βάθους, πλάκες 384 βοθρίων και πλάκες 96 βοθρίων</li> </ul>
Αρ. εγγράφου 1000000078751 έκδ. 06	Αύγουστος 2021	Ενημέρωση της διεύθυνσης εξουσιοδοτημένου εκπροσώπου για την ΕΕ.

Έγγραφο	Ημερομηνία	Περιγραφή αλλαγής
Αρ. εγγράφου 1000000078751 έκδ. 05	Δεκέμβριος 2020	<p>Ενημέρωση των ενοτήτων «Αρχές της διαδικασίας», «Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις» και «Επισήμανση προϊόντος» με πρόσθετες διευκρινίσεις για την ικανοποίηση αιτημάτων ρυθμιστικής φύσεως.</p> <p>Ήσσονος σημασίας ενημερώσεις στο περιεχόμενο του πρωτοκόλλου για συμφωνία με το τρέχον ύφος και την τρέχουσα δομή της Illumina.</p> <p>Διόρθωση της περιγραφής του χρωμοσώματος 21 από «δεύτερο μικρότερο ανθρώπινο αυτοσωμικό χρωμόσωμα» σε «μικρότερο ανθρώπινο αυτοσωμικό χρωμόσωμα» στην ενότητα «Ακρίβεια» της αναλυτικής απόδοσης.</p> <p>Προσθήκη δηλώσεων σύστασης προσοχής για την αντιμετώπιση της ακατάλληλης χρήσης των δεξαμενών και των κινδύνων αμαλγαμάτωσης των δειγμάτων στις ενότητες «Διαδικασία απομόνωσης πλάσματος» και «Ερμηνεία αποτελεσμάτων».</p> <p>Προσθήκη νέων αριθμών εξαρτήματος για τον διακομιστή και το λογισμικό για την κυκλοφορία νέου μοντέλου διακομιστή και ενημερώσεις των αριθμών εξαρτήματος για το λογισμικό.</p> <p>Προσθήκη συστάσεων προσοχής στο πρωτόκολλο και πληροφοριών για την επίλυση προβλημάτων και την αποτροπή υπερχειλίσεων των δειγμάτων.</p> <p>Ενημέρωση των δραστικών συστατικών στο DNA Quantification Standard στο κιβώτιο παρελκομένων για ευθυγράμμιση με το φύλλο δεδομένων ασφάλειας</p> <p>Ενημέρωση των συμβάσεων ονοματολογίας για το module του Local Run Manager VeriSeq NIPT για συνέπεια με άλλα έγγραφα τεκμηρίωσης.</p> <p>Προσθήκη ιστορικού αναθεωρήσεων.</p>
Αρ. εγγράφου 1000000078751 έκδ. 04	Οκτώβριος 2020	Διορθώσεις ήσσονος σημασίας.
Αρ. εγγράφου 1000000078751 έκδ. 03	Σεπτέμβριος 2020	Ενημέρωση του καταλόγου υλικών για την παρουσίαση των προδιαγραφών του εργαστηριακού εξοπλισμού μαζί με γνωστές συμβατές επιλογές.

Έγγραφο	Ημερομηνία	Περιγραφή αλλαγής
Αρ. εγγράφου 1000000078751 έκδ. 02	Φεβρουάριος 2020	<p>Ενημέρωση της παρουσίασης των πληροφοριών κλινικής απόδοσης για την καλύτερη επεξήγηση των διαφορών μεταξύ του βασικού τύπου εξέτασης ανίχνευσης και του τύπου εξέτασης ανίχνευσης στο πλήρες γονιδίωμα. Προσθήκη νέων διαφορών στην ενότητα για την απόδοση μεταξύ της βασικής εξέτασης ανίχνευσης και της εξέτασης ανίχνευσης στο πλήρες γονιδίωμα. Αφαίρεση αντιφατικών πληροφοριών σχετικά με τη δυνατότητα χρήσης της συμπληρωματικής έκθεσης από την ενότητα «Αρχές της διαδικασίας».</p> <p>Ενημέρωση της σύμβασης ονοματολογίας για το λογισμικό του προγράμματος διαχείρισης ροής εργασιών VeriSeq NIPT v2 σε ολόκληρο το έγγραφο για συνοχή στο ύφος.</p> <p>Ενημέρωση της επισήμανσης για τις διευθύνσεις της Illumina στην Αυστραλία και τις Κάτω Χώρες ώστε να αντικατοπτρίζονται οι πρόσφατες αλλαγές.</p>
Αρ. εγγράφου 1000000078751 έκδ. 01	Αύγουστος 2019	Αφαίρεση διπλότυπου βήματος στην εξαγωγή cfDNA που οφείλεται σε σφάλμα του λογισμικού τυπογραφίας.
Αρ. εγγράφου 1000000078751 έκδ. 00	Μάιος 2019	Αρχική δημοσίευση.

## Διπλώματα ευρεσιτεχνίας και εμπορικά σήματα

Το παρόν έγγραφο και τα περιεχόμενά του αποτελούν ιδιοκτησία της Illumina, Inc. και των συνδεδεμένων εταιρειών της («Illumina») και προορίζονται αποκλειστικά για τη συμβατική χρήση του πελάτη της σε συνδυασμό με τη χρήση του(-ων) προϊόντος(-ων) που περιγράφονται στο παρόν έγγραφο και για κανέναν άλλον σκοπό. Απαγορεύεται η χρήση ή η διανομή του παρόντος εγγράφου και των περιεχομένων του για οποιονδήποτε άλλον σκοπό ή/και άλλη κοινοποίηση, αποκάλυψη ή αναπαραγωγή τους με οποιονδήποτε τρόπο χωρίς την πρότερη έγγραφη συναίνεση της Illumina. Η Illumina δεν μεταβιβάζει διά του παρόντος εγγράφου καμία άδεια δυνάμει διπλώματος ευρεσιτεχνίας, εμπορικού σήματος, πνευματικού δικαιώματος ή δικαιωμάτων κοινού δικαίου της.

Οι οδηγίες στο παρόν έγγραφο πρέπει να τηρούνται αυστηρά και με ακρίβεια από ειδικευμένο και κατάλληλα εκπαιδευμένο προσωπικό, προκειμένου να διασφαλιστεί η ορθή και ασφαλή χρήση των προϊόντων που περιγράφονται στο παρόν. Όλα τα περιεχόμενα του παρόντος εγγράφου πρέπει να διαβαστούν και να γίνουν πλήρως κατανοητά πριν από τη χρήση των προϊόντων.

ΕΑΝ ΔΕΝ ΔΙΑΒΑΣΤΟΥΝ ΚΑΙ ΔΕΝ ΤΗΡΗΘΟΥΝ ΜΕ ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΟΛΕΣ ΟΙ ΟΔΗΓΙΕΣ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΠΑΡΟΝ, ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΠΡΟΚΛΗΘΕΙ ΖΗΜΙΑ ΣΤΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ, ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟΣ ΑΤΟΜΩΝ, ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΤΩΝ ΧΡΗΣΤΩΝ Ή ΑΛΛΩΝ, ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΑΛΛΗ ΥΛΙΚΗ ΖΗΜΙΑ, ΚΑΙ ΘΑ ΚΑΤΑΣΤΕΙ ΑΚΥΡΗ Η ΕΓΓΥΗΣΗ ΠΟΥ ΙΣΧΥΕΙ ΓΙΑ ΤΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ.

Η ILLUMINA ΔΕΝ ΑΝΑΛΑΜΒΑΝΕΙ ΚΑΜΙΑ ΕΥΘΥΝΗ ΠΟΥ ΑΠΟΡΡΕΕΙ ΑΠΟ ΕΣΦΑΛΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΠΟΥ ΠΕΡΙΓΡΑΦΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΠΑΡΟΝ (ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΤΩΝ ΕΞΑΡΤΗΜΑΤΩΝ Ή ΤΟΥ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟΥ ΤΟΥΣ).

© 2024 Illumina, Inc. Με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

Όλα τα εμπορικά σήματα είναι ιδιοκτησία της Illumina, Inc. ή των αντίστοιχων κατόχων τους. Για συγκεκριμένες πληροφορίες σχετικά με τα σήματα κατατεθέντα, ανατρέξτε στην ιστοσελίδα [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Στοιχεία επικοινωνίας



Illumina, Inc.

5200 Illumina Way

San Diego, California 92122 ΗΠΑ

+1.800.809.ILMN (4566)

+1.858.202.4566 (εκτός Βορείου Αμερικής)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com



### Χορηγός στην Αυστραλία

Illumina Australia Pty Ltd

Nursing Association Building

Level 3, 535 Elizabeth Street

Melbourne, VIC 3000

Αυστραλία

## Επισήμανση προϊόντος

Για έναν πλήρη κατάλογο των συμβόλων που εμφανίζονται στη συσκευασία και την επισήμανση του προϊόντος, ανατρέξτε στο υπόμνημα συμβόλων για το κιτ σας στη διεύθυνση [support.illumina.com](http://support.illumina.com), στην καρτέλα *Documentation* (Τεκμηρίωση).

Μια περίληψη των δεδομένων ασφάλειας και επιδόσεων (SSP, Summary of Safety and Performance) παρέχεται στη διεύθυνση <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>, μετά τη δημιουργία της ευρωπαϊκής βάσης δεδομένων για τα ιατροτεχνολογικά προϊόντα (Eudamed). Είναι συνδεδεμένη με το βασικό κωδικό UDI-DI (0081627002NIPTRP).