

Príbalový leták

NA DIAGNOSTICKÉ ÚČELY IN VITRO.

Účel určenia

VeriSeq™ NIPT Solution v2 je diagnostický test *in vitro*, ktorý sa používa ako skriningový test na detekciu genómových anomálií zo vzoriek materskej periférnej plnej krvi tehotných žien, ktoré sú najmenej v 10. týždni tehotenstva. Test VeriSeq NIPT Solution v2 využíva sekvenovanie celého genómu na detekciu čiastočných duplikácií a delécií všetkých autozómov a stavu aneuploidie všetkých chromozómov. Tento test ponúka možnosť požiadať o vykázanie aneuploidie pohlavných chromozómov (SCA). Tento produkt sa nesmie používať ako výlučný základ na diagnostiku alebo prijímanie iných rozhodnutí týkajúcich sa manažmentu tehotenstva.

Test VeriSeq NIPT Solution v2 zahŕňa nasledujúce súčasti: modul správcu pracovného toku VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 pre zariadenie VeriSeq NIPT Microlab STAR, súpravu na prípravu vzoriek VeriSeq NIPT Sample Prep Kit a server VeriSeq Onsite Server v2 so softvérom VeriSeq NIPT Assay Software v2. Test VeriSeq NIPT Solution v2 je určený na použitie so sekvenčným prístrojom novej generácie.

Súhrn a vysvetlenie analýzy

Abnormality fetálnych chromozómov, obzvlášť aneuploidia, ktorá predstavuje abnormálny počet chromozómov, sú bežnou príčinou zlyhania tehotenstva, vrodených anomálií, oddialenia vývoja a intelektuálneho postihnutia. Aneuploidia ovplyvňuje približne 1 z 300 narodených detí, výrazne vyššia miera súvisí so spontánnymi potratmi či narodením mŕtveho plodu.^{1,2} Až donedávna existovali dva typy prenatalných testov týchto porúch: diagnostické testovanie alebo skrining. Diagnostické testovanie zahŕňa invazívne postupy, ku ktorým patrí napríklad amniocentéza alebo odber choriových klkov. Tieto metódy testovania patria ku zlatému štandardu detegovania aneuploidie plodu. Tieto metódy sú však sprevádzané rizikom potratenia v rozsahu od 0,11 % po 0,22 %.³ Konvenčný skrining na viacero markerov v sebe nenesie žiadne riziko potratu, lebo je neinvazívny, ale dosahuje nižšiu presnosť ako diagnostické testy. Miera úspešného detegovania trizómie 21. chromozómu kolíše od 69 – 96 % v závislosti od typu skriningu, veku matky a gestačného veku pri vykonaní testu.⁴ Dôležitý je však fakt, že miera falošnej pozitivity dosahuje až približne 5 %, čo môže viesť k vykonaniu invazívneho zákroku s cieľom potvrdenia výsledku a zároveň riziku potratenia plodu v súvislosti s týmto zákrokom.⁴ Ultrazvukovým skriningom je tiež možné detegovať chromozomálne abnormality, ale výsledok je interpretovaný s ešte nižšou istotou, ako pri iných metódach.

Aneuploidia chromozómov 21, 18, 13, X a Y plodu môže byť detegovaná s vysokou presnosťou neinvazívnym prenatalným testovaním (NIPT) použitím sekvenovania celého genómu na bezbunkovej cfDNA získanej z plazmy tehotnej ženy v 10. týždni tehotenstva a neskôr. Pri poslednej metaanalýze viacerých klinických štúdií sa vykázali združené vážené miery detegovania a špecifity pre trizómiu 21 a trizómiu 18 u tehotenstiev s jedným plodom nasledovne: trizómia 21 99,7 % a 99,96 % a trizómia 18 97,9 % a 99,96 %, v uvedenom poradí.⁵ Jedna zo štúdií navrhuje použitie testovania NIPT ako primárneho skriningu u všetkých tehotenstiev, čo môže znížiť počet invazívnych postupov na potvrdenie výsledku až o 89 %.⁶

Vzhľadom na významné zníženie miery falošne pozitívnych výsledkov u testovania NIPT v porovnaní s konvenčným skríningom založeným na viacerých markeroch vydali viaceré profesionálne zdravotnícke organizácie vyhlásenia podporujúce použitie testovania NIPT vzhľadom na niekoľké indikácie.

Obzvlášť organizácie International Society for Prenatal Diagnosis, American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG)/Society for Maternal Fetal Medicine (SMFM), American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) a European Society of Human Genetics/American Society of Human Genetics podporujú ponúknutie testovania NIPT všetkým tehotným ženám.^{7,8,9} Odporúča sa poskytnutie poradenstva pred vykonaním testu, informovaného súhlasu a diagnostického testovania na potvrdenie výsledku pozitívneho skríningu cfDNA.⁴

Test VeriSeq NIPT Solution v2 je testom na neinvazívnu diagnostiku in vitro (IVD), pri ktorej sa používa sekvenovanie fragmentov cfDNA v celom genóme vo vzorkách plnej krvi odobratej tehotným ženám, ktoré sú minimálne v 10. týždni tehotenstva. Test ponúka dve možnosti pre typy skríningu: základný a celogenómový. Základný skríning poskytuje informácie o stave aneuploidie iba u chromozómov 21, 18, 13, X a Y. Celogenómový skríning poskytuje informácie o čiastočných duplikáciách a deléciách pre všetky autozómy a o stave aneuploidie pre všetky chromozómy. Oba skríningy poskytujú možnosť vykázania aneuploidie pohlavných chromozómov (SCA) s vykázaním pohlavia alebo bez neho. Možnosť vykázania SCA je možné vypnúť. Ak sa vypne možnosť vykazovania SCA, nevykazuje sa ani pohlavie plodu. Ďalšie informácie o vykazovaní pohlavia nájdete v *Príručke k softvéru VeriSeq NIPT Solution v2 (č. dokumentu 1000000067940)*.

Zásady postupu

VeriSeq NIPT Solution v2 je automatizované riešenie určené na laboratórne neinvazívne prenatálne testovanie (NIPT), ktoré pozostáva z automatizovanej prípravy vzoriek a analýzy údajov získaných sekvenovaním. Súprava na prípravu vzoriek VeriSeq NIPT Sample Prep Kit obsahuje špecializované reagenty na jedno použitie, ktoré sa používajú v zariadení VeriSeq NIPT Microlab STAR na prípravu dávok obsahujúcich 24, 48 alebo 96 vzoriek určených na sekvenovanie novej generácie. Údaje sekvenovania z oboch koncov získané z celého genómu sú analyzované špeciálnym softvérom VeriSeq NIPT Assay Software v2 a následne sa vytvorí správa obsahujúca kvalitatívne výsledky.

Pracovný postup pozostáva z nasledujúcich krokov: odber vzoriek, izolácia plazmy, extrakcia cfDNA, príprava knižnice, kvantifikácia knižnice, poolovanie (združovanie) knižnice, sekvenovanie a analýza, ktoré sú opísané detailnejšie:

- **Odber vzoriek** – 7 – 10 ml periférnej plnej krvi sa tehotnej žene odoberie do skúmavky na zber plnej krvi s bezbunkovou DNA od spoločnosti Streck (BCT), ktorá bráni bunkovej lýze a genómovej kontaminácii a stabilizuje plnú krv.
- **Izolácia plazmy** – Do 5 dní od odberu sa plazma izoluje z tehotenskej periférnej plnej krvi pomocou štandardných techník odstredovania. Zariadenie VeriSeq NIPT Microlab STAR aspiruje a rozdelí plazmu do jamiek na doštičke s 96 hlbokými jamkami na jej následné spracovanie. V prípade, že sa vyžaduje opakovanie testu, je možné vzorky po spracovaní zaviečkovať a skladovať pri teplote 4 °C počas ďalších 5 dní (maximálne do 10 dní po zbere krvi).

**UPOZORNENIE**

Prekročenie uvedeného času skladovania môže negatívne ovplyvniť miery zlyhania jednotlivých vzoriek.

- **Extrakcia cfDNA** – Purifikácia cfDNA z plazmy sa dosiahne adsorpciou na doštičku určenú na viazanie, premývaním tejto doštičky s cieľom odstrániť možnú kontamináciu a elúciou.
- **Príprava knižnice** – Na fragmentoch purifikovanej cfDNA prebieha proces korekcie koncov, pri ktorom sa konvertujú presahy 5' a 3' na tzv. tupé (nekohezne) konce. Následne sa ku koncom 3' pridá deoxyadenozín nukleotid, aby sa vytvoril jednobázový presah. Indexované adaptéry obsahujúce jednobázový presah 3' deoxytymidínu sa ligujú na spracované fragmenty cfDNA. Ligovaná DNA je purifikovaná použitím guľôčok na reverznú imobilizáciu z pevnej látky. Každá vzorka v množine 24, 48 alebo 96 vzoriek prijme jedinečný indexovaný adaptér. Adaptéry slúžia na 2 ciele:

**UPOZORNENIE**

Dbajte na to, aby nedošlo ku krížovej kontaminácii indexov. Mohlo by to spôsobiť nesprávne výsledky.

- Indexy umožňujú identifikáciu vzoriek pri následnom sekvenovaní.
- Indexované adaptéry obsahujú sekvencie, ktoré umožňujú prichytenie knižnice na pevný povrch sekvenovacieho prietokového článku pri vytváraní klastrov a následnom sekvenovaní.
- **Kvantifikácia** – Výsledný produkt knižnice sa kvantifikuje pomocou fluorescenčného farbiva s koncentráciou určenou porovnaním so štandardnou krivkou DNA.
- **Združovanie (pooling) a sekvenovanie knižnice** – Knižnice vzoriek sú spoločne združené do 24 alebo 48 poolov vzoriek v upravených množstvách, aby sa minimalizovali odchýlky v pokrytí. Každý pool je následne sekvenovaný pomocou systému na sekvenovanie novej generácie.
- Test VeriSeq NIPT Solution v2 neobsahuje vybavenie na sekvenovanie ani spotrebný materiál.
- **Analýza** – pre každú vzorku analýza pozostáva z nasledovného:
 - Identifikácia fragmentov knižnice podľa indexovaných sekvencií a zarovnanie čítaní z oboch koncov s ľudským referenčným genómom.
 - Odhad fetálnej frakcie knižnice skombinovaním informácií z distribúcie koordinát dĺžok a genómových koordinát fragmentov danej knižnice.
 - Po zarátaní známych odchýlok štatistický model deteguje oblasti genómu, ktoré sú nedostatočne alebo nadmerne zastúpené v knižnici spôsobom, ktorý je konzistentný s anomáliou na odhadnutej úrovni fetálnej frakcie.
 - Správa NIPT poskytuje súhrn výsledkov pre vybratú ponuku testu, pričom sa výsledok ANOMALY DETECTED (DETEGOVALA SA ANOMÁLIA) alebo NO ANOMALY DETECTED (ŽIADNA DETEGOVANÁ ANOMÁLIA) uvádza spolu s odhadom fetálnej frakcie pre vzorky, ktoré splnili kontrolu kvality.
 - Súhrnná správa poskytuje kvantitatívne metriky, ktoré charakterizujú každú detegovanú anomáliu.

Obmedzenia postupu

Obmedzenia analytického testu

- Evidencia, ktorá podporuje citlivosť (senzitivitu) a špecifitu testu pokrýva tehotenstvo s jedným plodom a s dvojčatami. Tieto návody na použitie neobsahujú údaje o citlivosti ani špecifite pre tehotenstvá s tromi a viacerými plodmi.
- Test VeriSeq NIPT Solution v2 nie je určený na detegovanie polyploidie, napríklad triploidie.
- Test VeriSeq NIPT Solution v2 nie je určený na detegovanie vyvážených preusporiadaní chromozómov.
- Analytický test vyžaduje vzorky periférnej plnej krvi odobrané tehotným ženám, ktoré sú najmenej v 10. týždni tehotenstva.
- Pri základnom skríningu sa pomocou testu VeriSeq NIPT Solution v2 vyhľadávajú špecifické abnormality chromozómov. Výsledky, ktoré sú vykázané ako NO ANOMALY DETECTED (ŽIADNA DETEGOVANÁ ANOMÁLIA) nevylučujú možnosť výskytu chromozomálnej abnormality na testovaných chromozómoch. Negatívny výsledok neznamená, že pri tehotenstve sa nemohli vyskytnúť žiadne iné chromozomálne abnormality, genetické podmienky či poškodenia plodu (napríklad defekt otvorenej nervovej trubice).
- Pri skríningu celého genómu môžu veľké delécie a duplikácie, ktoré tvoria menej ako 75 % veľkosti chromozómu, indikovať celochromozómovú aneuploidiu.
- Pri skríningu celého genómu sú niektoré oblasti vylúčené z analýzy. Zoznam takýchto oblastí, ktoré sú vylúčené, je dostupný na stránke podpory spoločnosti Illumina. Detekcia genómovej anomálie sa vykonáva iba na nevylúčených oblastiach.
- Vykázanie pohlavia plodu nie je dostupné vo všetkých oblastiach vzhľadom na miestne nariadenia, ktoré sa týkajú vykazovania pohlavia.
- Na základe evidencie v literatúre výsledky skríningu bezbunkovej DNA môžu byť ovplyvnené konkrétnymi faktormi matky a plodu. Niektoré z týchto (ale nie všetky) sú uvedené nižšie:
 - nedávna transfúzia krvi u matky,
 - predošlá transplantácia orgánu/kmeňových buniek,
 - autoimunitné ochorenie u matky,
 - novotvary (benígne a malígne) u matky,
 - mozaicizmus u matky,
 - variácie v počte kópií (CNV) u matky,
 - fetoplacentárny mozaicizmus/mozaicizmus vzťahujúci sa iba na placentu,
 - úmrtie plodu/mumifikácia plodu u dvojčiat.

Vykazovanie testu VeriSeq NIPT Solution v2

- Test VeriSeq NIPT Solution v2 je skrínigový test a nemá sa používať oddelene od ostatných klinických nálezov a výsledkov testov. Konečný úsudok o stave plodu a rozhodnutiach týkajúcich sa manažmentu tehotenstva nemá byť založený iba na výsledkoch skrínigu NIPT.⁷
- Správa, ktorá je výsledkom testu VeriSeq NIPT Solution v2, opisuje nasledovné:
 - Pri základnom skrínigu sa testuje nadmerné zastúpenie chromozómov 13, 18 a 21.
 - Pri skrínigu celého genómu sa testuje nedostatočné alebo nadmerné zastúpenie všetkých autozómov vrátane čiastočných delécií a duplikácií vo veľkosti minimálne 7 Mb.
 - U tehotenstiev so samostatným plodom, ak sa vyberie možnosť Yes (Áno) alebo SCA pri možnosti vykázania pohlavia sa vykážu nasledovné anomálie pohlavných chromozómov: XO, XXX, XXY a XYY.
 - U tehotenstiev so samostatným plodom, ak sa vyberie možnosť Yes (Áno) pri vykazovaní pohlavia, vykáže sa pohlavie plodu.
 - Prítomnosť chromozómu Y u tehotenstiev s dvojčatami.

Komponenty produktu

Test VeriSeq NIPT Solution v2 pozostáva z týchto súprav na prípravu vzorky:

- VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (24 vzoriek) (č. dielu 20025895)
- VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (48 vzoriek) (č. dielu 15066801)
- VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (96 vzoriek) (č. dielu 15066802)

Test VeriSeq NIPT Solution v2 pozostáva z týchto súčastí softvéru:

- VeriSeq NIPT Assay Software v2 (č. dielu 20047024) vopred nainštalovaný na serveri VeriSeq Onsite Server v2.
 - VeriSeq Onsite Server v2 (č. dielu 20028403, 20047000, 20101927) alebo existujúci VeriSeq Onsite Server (č. dielu 15076164 alebo č. dielu 20016240), ktorý je inovovaný na verziu v2.
- VeriSeq NIPT Workflow Manager v2, (č. dielu 20044988), vopred nainštalovaný na zariadení VeriSeq NIPT Microlab STAR.
 - VeriSeq NIPT Microlab STAR (č. dielu Hamilton Company Reno: 95475-01 (115 V) & 95475-02 (230 V), Hamilton Company Bonaduz: 806288).
- Modul Local Run Manager VeriSeq NIPT (č. dielu 20044989)

Reagencie

Dodávané reagencie

Spoločnosť Illumina dodáva nasledujúce reagencie: VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (24 vzoriek) (č. dielu 20025895), VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (48 vzoriek) (č. dielu 15066801) a VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (96 vzoriek) (č. dielu 15066802). Súprava VeriSeq NIPT Sample Prep Kit je nakonfigurovaná na použitie so zariadením VeriSeq NIPT Microlab STAR (ML STAR) (č. dielu 95475-01, 95475-02 alebo 806288), ktoré poskytuje spoločnosť Hamilton Company.

Súprava na prípravu vzoriek VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, Extraction Box

Tabuľka 1 VeriSeq NIPT Extraction Box (24) a (48), č. dielu 20025869 a 15066803

Názov reagentu na označení	Počet zásobníkov v súprave	Aktívne látky	Skladovanie
Pufer na lýzu	1	Guanidínium chlorid v pufrovanom vodnom roztoku	15 °C až 30 °C
Pufer na premývanie Wash Buffer I	1	Guanidínium chlorid a 2-propanol v pufrovanom vodnom roztoku	15 °C až 30 °C
Pufer na premývanie Wash Buffer II	1	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci soli	15 °C až 30 °C
Pufer na elúciu	1	Pufrovaný vodný roztok	15 °C až 30 °C
Proteinázový pufer	1	Glycerol v pufrovanom vodnom roztoku	15 °C až 30 °C
Proteináza K	3	Lyofilizovaná proteináza K	15 °C až 30 °C

Tabuľka 2 VeriSeq NIPT Extraction Box (96), č. dielu 15066807

Názov reagensie na označení	Počet zásobníkov v súprave	Aktívne látky	Skladovanie
Pufer na lýzu	1	Guanidínium chlorid v pufrovanom vodnom roztoku	15 °C až 30 °C
Pufer na premývanie Wash Buffer I	1	Guanidínium chlorid a 2-propanol v pufrovanom vodnom roztoku	15 °C až 30 °C
Pufer na premývanie Wash Buffer II	2	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci soli	15 °C až 30 °C
Pufer na elúciu	1	Pufrovaný vodný roztok	15 °C až 30 °C
Proteinázový pufer	1	Glycerol v pufrovanom vodnom roztoku	15 °C až 30 °C
Proteináza K	4	Lyofilizovaná proteináza K	15 °C až 30 °C

Súprava na prípravu vzoriek VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, Library Prep Box

Tabuľka 3 VeriSeq NIPT Library Prep Box (24) a (48), č. dielu 20026030 a 15066809

Názov reagensie uvedený na označení	Počet zásobníkov v súprave	Aktívne látky	Skladovanie
Zmes End Repair Mix	1	DNA polymeráza a dNTP v pufrovanom vodnom roztoku	-25 °C až -15 °C
Zmes A-Tailing	1	DNA polymeráza a dATP v pufrovanom vodnom roztoku	-25 °C až -15 °C
Ligačná zmes	1	DNA ligáza v pufrovanom vodnom roztoku	-25 °C až -15 °C
Hybridizačný pufer	1	Pufrovaný vodný roztok	-25 °C až -15 °C
Doštička s adaptérmi NIPT DNA	1	Oligonukleotidy v pufrovanom vodnom roztoku	-25 °C až -15 °C

Tabuľka 4 VeriSeq NIPT Library Prep Box (96), č. dielu 15066810

Názov reagentie na označení	Počet zásobníkov v súprave	Aktívne látky	Skladovanie
Zmes na opravu konca	1	DNA polymeráza a dNTP v pufovanom vodnom roztoku	-25 °C až -15 °C
Zmes A-Tailing	2	DNA polymeráza a dATP v pufovanom vodnom roztoku	-25 °C až -15 °C
Ligačná zmes	2	DNA ligáza v pufovanom vodnom roztoku	-25 °C až -15 °C
Hybridizačný pufer	1	Pufovaný vodný roztok	-25 °C až -15 °C
Doštička s adaptérmi NIPT DNA	1	Oligonukleotidy v pufovanom vodnom roztoku	-25 °C až -15 °C

Súprava na prípravu vzoriek VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, balenie s príslušenstvom Accessory Box

Tabuľka 5 VeriSeq NIPT Accessory Box, č. dielu 15066811

Názov reagentie na označení	Počet zásobníkov v súprave	Aktívne látky	Skladovanie
Doštička na viazanie DNA	1	Propylénová mikrodoštička s modifikovanou silikónovou membránou	2 °C až 8 °C
Pufer na resuspenziu	1	Pufovaný vodný roztok	2 °C až 8 °C
Gulôčky na purifikáciu vzoriek	1	Paramagnetické gulôčky z tuhej látky v pufovanom vodnom roztoku	2 °C až 8 °C
Reagencia na kvantifikáciu DNA	1	Farbivo interkalujúce DNA v DMSO	2 °C až 8 °C
Kvantifikačný štandard pre DNA	1	Štandard pre dsDNA, nešpecifická DNA a azid sodný v pufovanom vodnom roztoku	2 °C až 8 °C

Súprava na prípravu vzoriek VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, skúmavky a štítky pracovného postupu

Tabuľka 6 Skúmavky a štítky pracovného postupu, č. dielu 15071543

Názov položky uvedený na označení	Počet položiek v súprave	Skladovanie
Označenie (LBL) – čiarový kód doštičky	9	15 °C až 30 °C
Označenie (LBL) – čiarový kód doštičky s hlbokými jamkami	12	15 °C až 30 °C
Skúmavka (TB) – prázdna skúmavka na združovanie	5	15 °C až 30 °C

Nedodávané reagensie

Požadované reagensie, ktoré sa nedodávajú

- Reagensie a spotrebný materiál na sekvenovanie vyžadované pre systém na sekvenovanie novej generácie (NGS)
- Certifikovaná voda bez obsahu DNázy/RNázy (trieda vhodná na molekulárnu biológiu)
- Etanol 100 % (kategória 200), trieda vhodná na molekulárnu mikrobiológiu

POZNÁMKA Etanol v triede, ktorá nie je vhodná na molekulárnu biológiu, môže potenciálne negatívne ovplyvniť funkčnosť analýzy.

Voliteľné reagensie, ktoré sa nedodávajú

- Fosfátom pufovaný fyziologický roztok Dulbecco (DPBS, Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) pre kontrolu bez šablóny (NTC, no template control)

Skladovanie a manipulácia

1. Izbová teplota je stanovená na 15 °C až 30 °C.
2. Všetky reagensie slúžia iba na jedno použitie. Po príprave reagensí na použitie sa reagensie musia použiť ihneď.
3. Ak je niektorý z obalov alebo obsah súčastí testu VeriSeq NIPT Solution poškodený alebo narušený, obráťte sa na oddelenie zákazníckeho servisu spoločnosti Illumina.

4. Reagencie sú stabilné až do dátumu expirácie uvedeného na označení súprav, ak sa skladujú podľa pokynov. Podmienky skladovania sú uvedené v stĺpci Skladovanie v tabuľkách v časti [Reagencie](#). Reagencie s uplynutou platnosťou nepoužívajte.
5. Zmeny vo fyzickom vzhľade dodaných reagencií môžu naznačovať zhoršenie kvality materiálov. Ak dôjde k zmenám vo fyzickom vzhľade (ako napr. zjavná zmena farby reagencií alebo zakalenie so zrejmovou mikrobiálnou kontamináciou), tieto reagencie nepoužívajte.
6. Pri manipulácii s guľôčkami na purifikáciu vzoriek postupujte podľa postupov najlepšej praxe.
 - Guľôčky nikdy nezmrazujte.
 - Pred použitím ponechajte guľôčky pri izbovej teplote, kým ju nedosiahnu.
 - Tesne pred použitím rozvirkte guľôčky, kým sa neodstredia a farba nebude vyzeráť homogénne.
7. Pufer na lýzu Lysis Buffer, pufer na premývanie Wash Buffer I, pufer na premývanie Wash Buffer II a proteínázový pufer môžu vytvárať viditeľné usadeniny alebo kryštáliky. Pred použitím ich silno premiešajte vírením a následne vizuálne skontrolujte, aby ste si boli istí, že nie sú prítomné žiadne usadeniny.
8. Plnú krv po odbere nikdy nemrazte.
9. Po združovaní (pooling) hneď, ako je to možné, vykonajte sekvenovanie knižníc. Združené knižnice sú stabilné následných sedem dní pri teplote $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nevýžaduje sa žiadna dodatočná denaturácia, ak sú skladované počas uvedeného času za uvedených podmienok.

Vybavenie a materiály

Požadované, ale nedodávané vybavenie a materiály

Požadované vybavenie, ktoré sa nedodáva

Vybavenie	Dodávateľ
Systém na sekvenovanie novej generácie (NGS) s nasledujúcimi možnosťami: <ul style="list-style-type: none"> • 2 × 36 bp, sekvenovanie spárovaného konca • Kompatibilný s duálnymi indexovacími adaptérmi súpravy na prípravu vzoriek VeriSeq NIPT Sample Prep Kit • Automatické generovanie súborov BCL • Dvojkanálová biochémia • 400 mil. čítaní z oboch koncov na jeden cyklus • Kompatibilný so softvérom VeriSeq NIPT Assay Software v2 alebo systémom na sekvenovanie NextSeq 550Dx. 	Dodávateľ prístroja alebo Illumina, č. dielu 20005715
Mraznička, -25 °C až -15 °C	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Mikroodstredivka	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Pipetovacia pomôcka	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Chladnička, 2 °C až 8 °C	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Jednokanálové pipety s objemom 20 µl	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Jednokanálové pipety s objemom 200 µl	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Jednokanálové pipety s objemom 1 000 µl	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Vírivý mixér	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Zostava odstredivky a rotora pre skúmavky na odber krvi	
Ekvivalent: <ul style="list-style-type: none"> • Chladená odstredivka s výkonom 1600 × g (bez možnosti brzdenia) • Výkyvný rotor na vedierka (s vedierkami) • Vložky do vedierka s minimálnou hĺbkou 76 mm • Vložkové adaptéry s možnosťou použitia skúmaviek na odber krvi s rozmermi 16 mm × 100 mm 	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá

Vybavenie	Dodávateľ
<p>Odporúčané:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Odstredivka Allegra X12R, 1600 g • Odstredivka Allegra, GH-3.8, rotor s vedierkami • Kryty na vedierka do odstredivky Allegra, 2 ks • Zostava adaptéra do odstredivky Allegra, 16 mm, 4 ks 	<p>Beckman Coulter, č. položky 392304 (120 V alebo 230 V)</p> <p>Beckman Coulter, č. položky 369704</p> <p>Beckman Coulter, č. položky 392805</p> <p>Beckman Coulter, č. položky 359150</p>
Zostava odstredivky a rotora pre mikrotitračné doštičky	
<p>Ekvivalent:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Odstredivka s výkonom 5600 × g • Výkyvný rotor na doštičky s nosičmi na doštičky s 96 jamkami, min. hĺbka 76,5 mm. • Multifuge X4 Pro-MD 120 V TX-1000BT • Odstredivka Sorvall Legend XTR 	<p>Všeobecný dodávateľ pre laboratória</p> <p>Thermo Fisher Scientific, katalógové číslo 75016034</p> <p>Thermo Fisher Scientific, katalógové číslo 75004521 (120 V) alebo katalógové číslo 75004520 (230 V)</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Rotor na mikrotitračné doštičky HIGHPlate 6000 • Rotor high plate 6000 <p>Podporný podstavec na mikrotitračné doštičky</p> <ul style="list-style-type: none"> • Odporúčané: <ul style="list-style-type: none"> • Podporný podstavec MicroAmp 96-Well Support Base • Nosič na doštičky PCR s 96 jamkami 	<p>Thermo Fisher Scientific, katalógové číslo 75003606</p> <p>Thermo Scientific VWR, katalógové číslo 97040-244</p> <p>Thermo Fisher Scientific, katalógové číslo 4379590</p> <p>Thermo Fisher Scientific, katalógové číslo AB-0563/1000</p>
<p>Niektorá z nasledujúcich čítačiek mikrotitračných doštičiek alebo ekvivalent (fluorimeter) so softvérom SoftMax Pro v6.2.2 – 7.1.2:</p>	
<ul style="list-style-type: none"> • Gemini XPS • SpectraMax M2, M3, M4 a M5. <ul style="list-style-type: none"> • Na použitie čítačky mikrotitračných doštičiek v rámci pracovného postupu sa vyžaduje purpurová vložka. 	<p>Molecular Devices, č. dielu XPS</p> <p>Molecular Devices, č. dielu M2, M3, M4 a M5</p>

Vybavenie	Dodávateľ
Sériový adaptér s vysokorychlostným rozhraním USB SpectraMax	Molecular Devices, č. dielu 9000-0938
Tepelný cyklovač s nasledujúcimi špecifikáciami: <ul style="list-style-type: none"> Vyhrievané veko Teplotný rozsah 4 °C až 98 °C Presnosť teploty ±2 °C Minimálna rýchlosť nábehu 2 °C/s Kompatibilný s doštičkami PCR Twin.tec s 96 jamkami, plná obruba 	Všeobecný dodávateľ pre laboratória
VeriSeq NIPT Microlab STAR	Hamilton, č. dielu 95475-01 (115 V), č. dielu 95475-02 (230 V) alebo č. dielu 806288 (Hamilton Company Bonaduz)
VeriSeq Onsite Server v2 alebo inovovaná verzia VeriSeq Onsite Server	Illumina, č. dielu 20028403 alebo 20047000 (v2) alebo 20101927 alebo 15076164 alebo 20016240 (inovovaná verzia)
Ak používate systém na sekvenovanie NextSeq 550Dx: <ul style="list-style-type: none"> Súprava reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5, 75 cyklov 	Illumina, č. dielu 20028870

Voliteľné vybavenie, ktoré sa neposkytuje

Vybavenie	Dodávateľ
Systém na odstraňovanie uzáverov Pluggo	LGP Consulting, č. dielu 4600 4450
Fluorescenčná validačná doštička SpectraMax SpectraTest FL1	Molecular Devices, č. dielu 0200-5060
Skúmavkový revolver/rotátor, 15 ml skúmavky, 40 ot./min., 100 – 240 V	Thermo Scientific, katalógové číslo 88881001 (Spojené štáty) alebo katalógové číslo 88881002 (EÚ)

Požadované, ale nedodávané materiály

Spotrebný materiál	Dodávateľ
Vodivé nesterilné filtračné pipetové špičky, 1 000 µl	Hamilton, č. dielu 235905
Vodivé nesterilné filtračné pipetové špičky, 300 µl	Hamilton, č. dielu 235903
Vodivé nesterilné filtračné pipetové špičky, 50 µl	Hamilton, č. dielu 235948

Spotrebný materiál	Dodávateľ
<p>Zásobník s hlbokými jamkami s nasledujúcimi špecifikáciami:</p> <ul style="list-style-type: none"> • SLAS 1–2004, formát mikrotitračných doštičiek s 96 jamkami s pyramídovým alebo kónickým dnom a minimálnym objemom 240 ml. • Polypropylén s preferenciou slabej väzby DNA pre všetky kontaktné povrchy vzoriek. • Vnútorne rozmery (hladina kvapaliny) sú kompatibilné s krokmi automatizovanej aspirácie a dávkovania zariadenia VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Výškové rozmery sú kompatibilné s automatizovanými pohybmi zariadenia VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	<p>Všeobecný dodávateľ pre laboratória</p> <p>Kompatibilné zásobníky:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Corning Axygen, č. produktu RES-SW96-HP-SI • Agilent, č. produktu 201246-100
<p>Nádobka na reagentie s nasledujúcimi špecifikáciami:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Nádobka, ktorú je možné riadne (ale bez nadmernej sily) vložiť do nosiča zariadenia VeriSeq NIPT Microlab STAR, so skoseným dnom a minimálnym objemom 20 ml. • Polypropylén bez obsahu RNázy/DNázy. • Vnútorne rozmery zásobníka (hladina kvapaliny) generujúce hladiny kvapaliny použitím objemov analytických reagentov, ktoré sú kompatibilné s krokmi automatizovanej aspirácie a dávkovania zariadenia VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Výškové rozmery sú kompatibilné s automatizovanými pohybmi zariadenia VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	<p>Kompatibilné nádoby:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Nádobka na reagentie od spoločnosti Illumina, č. dielu 20095418

Spotrebný materiál	Dodávateľ
<p>Doštičky s hlbokými jamkami s nasledujúcimi špecifikáciami:</p> <ul style="list-style-type: none"> • SLAS 1–2004, 3–2004 a 4–2004 – formát mikrotitračných doštičiek s 96 jamkami s pyramídovým alebo kónickým dnom a minimálnym objemom jednej jamky 2 ml. • Priehľadný polypropylén s preferenciou materiálu s nízkou úrovňou viazania DNA pre všetky kontaktné povrchy vzoriek. • Rozmery jamky generujú hladinu kvapaliny, ktorá je kompatibilná s krokmi automatizovanej aspirácie a dávkovania zariadenia VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Obruba doštičky, ktorá umožňuje umiestniť čiarové kódy doštičky do požadovanej polohy (je nevyhnutné dosiahnuť dokonalé priľnutie na rovnom povrchu). • Rám odolný voči torzným silám s kapacitou min. 5600 × g. • Výškové rozmery doštičky sú kompatibilné s automatizovanými pohybmi zariadenia VeriSeq NIPT Microlab STAR 	<p>Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá</p> <p>Kompatibilné doštičky:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, č. dielu 0030505301 • Eppendorf, č. dielu 30502302 • USA Scientific, č. dielu 1896-2000
<p>Doštička s 384 jamkami s nasledujúcimi špecifikáciami:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mikrotitračná doštička s 384 jamkami optimalizovaná na malé objemy s minimálnym objemom jamky 50 µl. • Čierny nepriehľadný polystyrén s funkciou blokovania svetla a nízkou úrovňou viazania DNA pre všetky kontaktné povrchy vzoriek. • Rozmery jamky generujú hladiny kvapaliny, ktoré sú kompatibilné s krokmi automatizovanej aspirácie a dávkovania zariadenia VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Výškové rozmery doštičky sú kompatibilné s automatizovanými pohybmi zariadenia VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Obruba doštičky, ktorá umožňuje umiestniť čiarové kódy doštičky na požadované miesto (musí sa dosiahnuť dokonalé priľnutie na rovnom povrchu). 	<p>Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá</p> <p>Kompatibilné doštičky:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Corning, č. produktu 3820

Spotrebný materiál	Dodávateľ
<p>Doštička s 96 jamkami s nasledujúcimi špecifikáciami:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mikrotitračná doštička s rámom odolným voči torzným silám, ktorý odolá hodnote min. 5600 × g a s 96 priehľadnými jamkami so skoseným dnom, zvýšenými obrubami a minimálnym objemom jamky 150 µl. • Polypropylén bez obsahu RNázy/DNázy s nízkou úrovňou viazania DNA pre všetky kontaktné povrchy vzoriek. • Rozmery jamky generujú hladiny kvapaliny, ktoré sú kompatibilné s krokmi automatizovanej aspirácie a dávkovania zariadenia VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Výškové rozmery doštičky sú kompatibilné s automatizovanými pohybmi zariadenia VeriSeq NIPT Microlab STAR. <p>POZNÁMKA: Kompatibilné plastové nástroje s odlišnými číslami dielu (napríklad kompatibilné doštičky s 96 jamkami od iných výrobcov) nie sú priamo zameniteľné bez špecifickej kalibrácie systému VeriSeq NIPT Microlab STAR pracovníkmi oddelenia servisu a podpory spoločnosti Illumina. Ak chcete zamieňať plastové nástroje, poraďte sa s tímom podpory spoločnosti Illumina.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Obruba doštičky, ktorá umožňuje umiestniť čiarové kódy doštičky na požadované miesto (musí sa dosiahnuť dokonalé prilnutie na rovnom povrchu). • Kompatibilné s tepelnými cyklovačmi na účely denaturácie. 	<p>Všeobecný dodávateľ pre laboratória</p> <p>Kompatibilné doštičky:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, č. dielu 0030129512 • Eppendorf, č. dielu 30129580 • Eppendorf, č. dielu 30129598 • Eppendorf, č. dielu 30129660 • Eppendorf, č. dielu 30129679 • Bio-Rad, č. dielu HSP9601
<p>Niektoré z nasledujúcich tesnení:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Fóliové mikrotiesnenie F • Fóliové tesnenia 	<p>Bio-Rad, katalógové číslo MSF1001 Beckman Coulter, č. položky 538619</p>
<p>Bez bunková DNA BCT CE</p>	<p>Streack, katalógové číslo 218997</p>
<p>Zatlačacie uzávery</p>	<p>Sarstedt, objednávacie číslo 65.802</p>
<p>2 ml skúmavky so skrutkovacím uzáverom</p>	<p>Všeobecný dodávateľ pre laboratória</p>
<p>20 µl filtračné pipetové špičky pre 20 µl pipetor</p>	<p>Všeobecný dodávateľ pre laboratória</p>
<p>200 µl filtračné pipetové špičky pre 200 µl pipetor</p>	<p>Všeobecný dodávateľ pre laboratória</p>
<p>1 000 µl filtračné pipetové špičky pre 1 000 µl pipetor</p>	<p>Všeobecný dodávateľ pre laboratória</p>

Spotrebný materiál	Dodávateľ
Ekvivalent: <ul style="list-style-type: none"> • Sprej na rýchlu dezinfekciu s obsahom alkoholu • Roztok dezinfekčného detergentu Odporúčané: <ul style="list-style-type: none"> • Deionizovaná voda a 70 % etanol 	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá

Voliteľné materiály, ktoré sa nedodávajú

Spotrebný materiál	Dodávateľ
Fosfátom pufrovaný fyziologický roztok Dulbecco (DPBS) pre kontroly bez šablóny (NTC)	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Skúmavka so skrutkovacím uzáverom, 10 ml (iba na kontrolné vzorky)	Sarstedt, objednávacie číslo 60.551
Skúmavka so skrutkovacím uzáverom, 50 ml	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Sérologické pipety s objemom 25 ml	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Sérologické pipety s objemom 10 ml	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá

Odber, preprava a skladovanie vzoriek



UPOZORNENIE

So všetkými vzorkami zaobchádzajte ako s potenciálne infekčnými látkami.

- Do skúmaviek na odber plnej krvi s bezbunkovou DNA od spoločnosti Streck musia byť odobraté vzorky plnej krvi s objemom 7 – 10 ml. Nezmrazujte.
- Prevoz plnej krvi musí spĺňať všetky platné zodpovedajúce právne predpisy pre prevoz etiologických látok. Odporúča sa použiť urýchlené spôsoby zasielania/prevozu.
- Počas prevozu vzorky skladujte pri teplote od 4 °C do 30 °C. Po prijatí vzorky skladujte pri teplote od 2 °C do 8 °C, kým nie sú pripravené na ďalšie spracovanie. Čas medzi odberom krvi a úvodnou izoláciou plazmy nemôže prekročiť 5 dní.
- V prípade, že sa vyžaduje opakovanie testu, je možné vzorky po spracovaní znova zaviečkovať a skladovať pri teplote 4 °C počas ďalších 5 dní (maximálne do 10 dní po odbere krvi).



UPOZORNENIE

Vystavenie vyšším teplotám nad tu uvedené rozsahy môže negatívne ovplyvniť miery zlyhania jednotlivých vzoriek a presnosť analýzy vzorky.

Varovania a preventívne opatrenia

- Tento analytický test obsahuje proteinázu K. K osobným zraneniam môže dôjsť v dôsledku vdýchnutia, požitia, kontaktu s pokožkou a kontaktu s očami. Používajte ho v dobre odvetranej oblasti, noste ochranný odev, zabráňte vdýchnutiu prachu a zlikvidujte všetky nádoby a nepoužitý obsah podľa príslušných štátnych bezpečnostných predpisov.
- Tento analytický test obsahuje guanidínium chlorid. K osobným zraneniam môže dôjsť v dôsledku vdýchnutia, požitia, kontaktu s pokožkou a kontaktu s očami. Používajte ho v dobre odvetranej oblasti, noste ochranný odev a zlikvidujte všetky nádoby a nepoužitý obsah podľa príslušných štátnych bezpečnostných predpisov platných vo vašej oblasti.
- Tento analytický test obsahuje 2-propanol, ktorý je horľavý. Skladujte ho v miestach vzdialených od zdroja tepla a otvoreného ohňa. K osobným zraneniam môže dôjsť v dôsledku vdýchnutia, požitia, kontaktu s pokožkou a kontaktu s očami. Používajte ho v dobre odvetranej oblasti, noste ochranný odev a zlikvidujte všetky nádoby a nepoužitý obsah podľa príslušných štátnych bezpečnostných predpisov platných vo vašej oblasti.
- Tento analytický test obsahuje korozívny a výbušný dimetylsulfoxid. K osobným zraneniam môže dôjsť v dôsledku vdýchnutia, požitia, kontaktu s pokožkou a kontaktu s očami. Používajte ho v dobre odvetranej oblasti, noste ochranný odev a zlikvidujte všetky nádoby a nepoužitý obsah podľa príslušných štátnych bezpečnostných predpisov platných vo vašej oblasti.
- Ak chcete zabrániť vytváraniu škodlivých plynov, nezhadzujte odpad, ktorý vzniká pri extrakcii cfDNA (obsahuje guanidínium chlorid) s odpadom, ktorý obsahuje bielidlo (chlórnan sodný).
- So všetkými vzorkami zaobchádzajte ako s potenciálne infekčnými látkami.
- Aplikujte bežné laboratórne bezpečnostné opatrenia. Pipetovanie nevykonávajte ústami. Nejedzte, nepite ani nefajčite v oblastiach určených na prácu. Pri manipulácii so vzorkami a reagensiami na analýzy noste jednorazové rukavice a laboratórny plášť. Po manipulácii so vzorkami a reagensiami na analýzy si dôkladne umyte ruky.
- Nepoužívajte žiadne súčasti analytického testu po uplynutí dátumu expirácie uvedenom na štítku analytického testu. Dbajte na to, aby nedošlo k zámene komponentov analytického testu z odlišných šarží analytického testu. Šarže analytického testu sú označené na štítku balenia analytického testu. Reagencie alebo komponenty analytického testu skladujte pri stanovenej teplote.
- Pred spustením protokolu sa uistite, že všetky výpary chlórnanu sodného sú úplne rozptýlené, aby sa zabránilo degradácii vzorky alebo činidla.
- Nedodržovanie uvádzaných postupov môže viesť k chybným výsledkom alebo významnému zníženiu kvality vzoriek.
- Ihneď nahláste akékoľvek závažné udalosti spojené s týmto výrobkom spoločnosti Illumina a príslušným zodpovedným orgánom v členskom štáte, v ktorom sa nachádzajú používateľ aj pacient.
- Ďalšie informácie o ochrane životného prostredia, zdravia a bezpečnosti hľadajte na kartách bezpečnostných údajov (SDS) na stránke support.illumina.com/sds.html.

Poznámky k procedúre

Dbajte na to, aby nedošlo ku kontaminácii

- Použite nové pipetové špičky a nové spotrebné laboratórne vybavenie.
- Použitie pipetových špičiek odolných voči aerosólu znižuje riziko prenosu a krížovej kontaminácie medzi vzorkami.
- Vzhľadom na riziko kontaminácie precízne skontrolujte, či obsah jamiek úplne zostáva v jamkách. Obsah sa nesmie rozliať. Po každom kroku vírenia vykonajte odstredenie.
- Pri manipulácii s krvou a krvnými derivátmi dodržiavajte zodpovedajúce predpisy správnej laboratórnej praxe a hygienických opatrení.
- Pri príprave laboratória nepoužívajte spreje s aerosólom bielidla. Kontaminácia zvyškami bielidla môže spôsobiť zlyhanie analytického testu.
- Pri odpečatení doštičiek dajte pozor, aby ste doštičku položili na pevný plochý povrch. Doštičku pevne uchopte. Pomaly odstráňte tesnenie a venujte pozornosť tomu, aby tesnenie neprišlo do kontaktu s vystavenými jamkami. Nedotýkajte sa vystavených jamiek ani neporušte ich obsah. Vzájomná kontaminácia medzi jamkami môže viesť k nesprávnym výsledkom.

Čistenie plošiny zariadenia VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Pred použitím skontrolujte čistotu plošiny. Minimálne raz týždenne vykonávajte údržbu podľa týchto uvedených pokynov na čistenie.
- Vyberte všetky nosiče, ktoré sa nedajú vyložiť, a vyčistite ich dezinfekčným sprejom na báze alkoholu určeným na rýchle čistenie, deionizovanou vodou a 70 % etanolom a nechajte ich vyschnúť. V prípade ťažkého znečistenia ich následne ponorte do roztoku dezinfekčného detergentu, opláchnite ich dezinfekčným činidlom na báze alkoholu a nechajte ich vyschnúť.
- Otvorte predný kryt a plošinu utrite handričkou napustenou deionizovanou vodou a 70 % etanolom. Obzvlášť bočné bloky je potrebné skontrolovať, či sú čisté.
- Odoberte rozvádzač BVS (základný systém podtlaku) a vyčistite rozvádzač, tesnenie a interiérové časti systému BVS použitím handričky. Etanol nenanášajte na tesnenie, môže to spôsobiť krehkosť materiálu.
- Vyprázdňte odpadové pipetové špičky použité hlavicoú CO-RE 96-head a samostatnou nezávislou pipetovacou pomôckou.
- Vyberte z kontajnera na odpadové pipetové špičky doštičku na pipetové špičky vysunuté z nezávislej pipetovacej pomôcky a vyčistite ju: jej povrch priamo posprejajte deionizovanou vodou a 70 % etanolom a utrite ho. Na rám natiahnite nové plastové vrečko a znova ho pripojte. Očistenú doštičku na vysunuté pipetové špičky vráťte späť na miesto.

- Deionizovanú vodu a 70 % etanol nasprejajte priamo na povrch odpadového kontajnera a žľabu hlavice CORE 96-head a do čista ich poutierajte.
 - Ak je náročné odstrániť nahromadené znečistenie z odpadových pipetových špičiek, otierajte ho s handričkou namočenou do vody bez obsahu DNázy/RNázy, kým sa ho nepodarí odstrániť. Handričku vhodným spôsobom zlikvidujte. Pokračujte v sterilizácii použitím dezinfekčného činidla na báze alkoholu.
- Navlhčite handričku nezanechávajúcu vlákna alebo bavlnený tampón 70 % etanolom. Poutierajte okienko laserového skenera na čítačke čiarových kódov. Pomocou tej istej handričky alebo tampónu poriadne očistite každú jamku na adaptéri doštičky CPAC. Ak používate handričku, pritlačte ju do každej jamky na adaptéri pomocou zadnej časti pera, aby sa vnútro jamky poriadne očistilo.
- Očistite samostatné nezávislé pipetovacie pomôcky:
 - Na samostatných nezávislých pipetovacích pomôckach očistite puzdro na vysúvanie pipetovej špičky (vonkajšia časť pipetovacích pomôcok) pomocou handričky nezanechávajúcej vlákna namočenej do deionizovanej vody a 70 % etanolu. (Pozri *Referenčnú príručku pre zariadenie Hamilton Microlab STAR, č. 15070074.*)
 - Očistite zastavovací disk a O-krúžky pipetovacej hlavy (vonkajšia časť pipetovacích pomôcok) pomocou handričky nezanechávajúcej vlákna namočenej do deionizovanej vody a 70 % etanolu.
- Očistite hlavicu CORE 96-head:
 - Pomocou tej istej handričky namočenej do deionizovanej vody a 70 % etanolu očistite kryt hlavice 96-head a spodnú časť zastavovacích diskov.
 - Použitím tej istej handričky alebo odtrhnutého kúska látky namočeného do deionizovanej vody a 70 % etanolu očistite (podobne ako zubnou niťou) strany pipetovacích kanálikov hlavice 96-head, aby sa vyčistili aj O-krúžky. Tento postup zopakujte pre každý pipetovací kanálik na hlavici 96-head.
- Predný a bočný kryt posprejajte deionizovanou vodou a 70 % etanolom a dosucha utrite.
- Prúžok na ochranu mechanizmu automatického nakladania očistite handričkou namočenou do deionizovanej vody a 70 % etanolu a poutierajte bez toho, aby ste pri tom vyvíjali tlak.
- Keď sú plošina a jej súčasti úplne suché, vložte nosiče.

POZNÁMKA Nesprávne čistenie a údržba zariadenia ML STAR môžu spôsobiť krížovú kontamináciu a nedostatočnú presnosť analýzy.

Kontrola kvality

Materiál kontrolných vzoriek so známymi údajmi o presnosti je možné vyhodnotiť na detegovanie rozdielov v spracovaní a technických postupoch v laboratóriu.

Spustenie kontrolnej vzorky alebo kontrolnej vzorky bez šablóny zníži celkový počet neznámych materských vzoriek, ktoré je možné spracovať pri každej príprave vzorky.

Neprekračujte počet dvoch vzoriek NTC na dávku obsahujúcu 24 alebo 48 vzoriek alebo štyri vzorky NTC na dávku obsahujúcu 96 vzoriek.

Návod na použitie

Tipy a techniky

Ak sa v protokole neurčí bod bezpečného zastavenia, ihneď prejdite na ďalší krok.

Označovanie doštičiek čiarovými kódmi

- Čiarové kódy doštičiek s plnou obrubou začínajú písmenami PL.
- Čiarové kódy doštičiek s hlbokými jamkami začínajú písmenami DW.
- Čiarové kódy prilepte na doštičky s plnou obrubou a hlbokými jamkami z boku vedľa stĺpca 12.
- Vložte doštičky s čiarovými kódmi smerujúcimi doprava, aby bolo možné vykonať automatické skenovanie.

Utesnenie a odkrytie platničky

- Extrémnu pozornosť venujte tomu, aby nedošlo ku krížovej kontaminácii – na spodnej strane tesnenia nesmie byť žiadna viditeľná tekutina.
 - Dbajte na to, aby odkrytá spodná strana tesnenia neprišla do kontaktu s odkrytými jamkami.
 - Dbajte na to, aby ste sa nedotkli odkrytých jamiek.
- Platničku s 96 jamkami vždy utesnite pred vykonaním ďalších krokov protokolu:
 - kroky centrifúgy;
 - kroky tepelného cyklovania.
- Pri zapečatení doštičky použite fóliové tesnenie. Položte ho na doštičku a zapečatíte. Tlak musí byť aplikovaný na celú doštičku a tesnenie musí okolo každej samostatnej jamky priliehať napevno.
- Pred odpečatením doštičky vykonajte nasledovné:
 - Krátko odstredujte doštičku s 96 jamkami rýchlosťou 1 000 × g 20 sekúnd.
 - Platničku položte na rovný povrch a pomaly odstráňte tesnenie.


VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Pred použitím vykonajte podľa pokynov výrobcu kroky požadovanej údržby a zdokumentujte ich.
- Počas automatizovaných procesov zariadenie ML STAR sledujte. Sledujte, či sa v rozhraní softvéru VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 nezobrazujú upozornenia a pokyny pre operátora.
- Počas procesu ponechajte predný kryt na svojom mieste.
- Počas procesu nemajú byť na plošine prítomné žiadne položky.
- Ak sa počas riešenia chyby zobrazí tlačidlo s možnosťou **Exclude** (Vylúčiť), za žiadnych okolností túto možnosť nevyberte. V prípade, ak metóda nemôže pokračovať po udalosti riešenia chyby alebo pri riešení chyby máte iba obmedzené možnosti, cyklus zrušte.

- Počas krokov, v ktorých sa na doštičku aplikuje podtlak, manuálne pomôžte pri vytváraní tesnenia medzi doštičkou a rozvádzačom podtlaku, ak vás na to VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 vyzve.
- Umožnite systému automaticky sa zbaviť pipetových špičiek z adaptéra. Pipetové špičky neodstraňujte manuálne, ak vás na to softvér nevyzve.
- Spotrebované reagensy a použitý spotrebný materiál odstráňte, keď vás na to vyzve Workflow Manager.
- Každý deň vyprázdňte nádoby s odpadovým materiálom, ktorý vzniká pri vytváraní podtlaku. Prvá nádoba by nikdy nemala byť naplnená na viac ako ½. Pretečenie nádoby s odpadovým materiálom, ktorý vzniká pri vytváraní podtlaku, môže poškodiť podtlakovú pumpu a znížiť podtlak použitý v systéme.
- Pre dávky obsahujúce 24, 48 a 96 vzoriek naplňte plný stojan samostatne spočítaných 8-kanálikových pipetových špičiek, aby sa mohla metóda spustiť.

Spracovanie vzoriek

Postup

1. Nasledujúce kroky vykonajte pre každú alikvotnú časť:
 - a. Vzorky označené čiarovým kódom odstreďujte pri otáčkach 1600 × g počas 10 minút pri teplote 4 °C s vypnutou možnosťou rýchleho zastavenia (brzdou).
 - b. Po úplnom zastavení odstredivky vyberte skúmavky so vzorkami.
Do 15 minút od odstredenia spustíte izoláciu plazmy. V prípade, ak po odstredení uplynie 15-minútový interval, musí sa odstredenie vykonať znova.
 2. Každú skúmavku skontrolujte z hľadiska vhodnosti vzorky overením nasledujúcich požiadaviek:
 - Obsahuje očakávaný objem vzorky.
 - Po odstredení je viditeľné oddelenie červených krviniek a plazmy vo vzorke.
 - Úroveň plazmy je minimálne 1,5 ml nad žltkastou oddeľujúcou líniou.
 - Vzorka nie je výrazne hemolyzovaná (t. j. plazma nemá výrazne červené sfarbenie).
 - Vzorka nie je lipemická (t. j. plazma nie je bielo zakalená ani nemá mliečny nepriezračný vzhľad).
 - Vzorka neobsahuje žiadne zrazeniny.
-  **UPOZORNENIE**
- Nesprávne skladované či upravované vzorky môžu byť nestabilné. Ak sa v pracovnom postupe spracujú nevyhovujúce vzorky, môžu počas extrakcie zaniest doštičku na viazanie a spôsobiť, že vzorka pretečie do susediacich jamiek.
3. Odviečkujte skúmavky a vložte ich do nosičov skúmaviek. Vložte všetky vzorky a kontrolné vzorky plazmy pre danú dávku.

**UPOZORNENIE**

V prípade riešenia novej chyby, ak je oznámená s možnosťou Exclude (Vylúčiť), túto možnosť nevyberajte. V prípade, ak metóda nemôže pokračovať po udalosti riešenia chyby a pri riešení chyby máte iba obmedzené možnosti, cyklus zrušte.

Izolácia plazmy

Príprava

1. Označte jednu doštičku s hlbokými jamkami nápisom Intermediate Plasma (Intermediálna plazma) a nalepte na ňu čiarový kód.
2. Označte jednu doštičku s hlbokými jamkami nápisom Final Plasma (Finálna plazma) a nalepte na ňu čiarový kód.
3. Pre dávky obsahujúce 24, 48 a 96 vzoriek naplňte plný stojan samostatne spočítaných pipetových špičiek s kanálmi, aby sa mohla metóda spustiť.

**UPOZORNENIE**

Skontrolujte, či sa pre doštičky na intermediálnu a finálnu plazmu použila doštička správneho typu. Použitie zásobníka s hlbokými jamkami namiesto doštičky s hlbokými jamkami vedie k fúzii vzoriek a môže to spôsobiť nesprávne výsledky.

Postup

1. Otvorte spúšťač AppLauncher a vyberte možnosť **VeriSeq NIPT Method**.
2. Zadajte jedinečné ID dávky, meno používateľa a vyberte možnosť **OK**.
ID dávky môže obsahovať ≤ 26 znakov. Môžete používať čísla, písmená, znaky podčiarknutia (_) alebo pomlčky (-). Príklad: 2025-10-16_Batch3.
V ID dávky sa nerozlišujú malé a veľké písmená. ID dávky s rovnakými písmenami s rozdielnou veľkosťou nie sú považované za jedinečné.
Názvy dávok musia byť jedinečné a nesmú sa líšiť iba vo veľkosti písmen. Napríklad názvy dávok Batch01 a batch01 nie sú jedinečné. To isté platí pre pomenovanie ID vzorky.
3. Vyberte možnosť **New Batch** (Nová dávka).
4. Po inicializácii vyberte možnosť **OK** a spustí sa izolácia plazmy.
5. Vyberte veľkosť dávky a potom vyberte možnosť **OK**.
6. Vyberte počet prvkov NTC (no template controls, kontrolné vzorky bez šablóny) a potom vyberte možnosť **OK**.
Drážky s NTC sú vždy vybraté ako posledné. Napríklad ak cyklus s 24 vzorkami obsahuje dve kontrolné vzorky NTC, nachádzajú sa na pozícii 23 a 24.

7. Vykonajte jeden z týchto krokov:

- Ak chcete nahráť existujúci hárok so vzorkami, vyberte hárok so vzorkami súvisiaci s dávkou a potom možnosť **OK**.
- Ak chcete pokračovať bez výberu hárka so vzorkami, vyberte možnosť **No Sample Sheet** (Žiaden hárok so vzorkami).

Ďalšie informácie o vytváraní hárka so vzorkami nájdete v *Príručke k softvéru VeriSeq NIPT Solution v2* (č. dokumentu 1000000067940).

POZNÁMKA Typ vzorky – samostatný plod alebo dvojčatá – sa musí pre každú vzorku presne zaznamenať, aby sa zabezpečila vhodná analýza údajov. Ak vyberiete možnosť **No Sample Sheet** (Žiaden hárok so vzorkami), skontrolujte, či boli v obslužných nástrojoch aplikácie Workflow Manager nastavené predvolené hodnoty vzoriek. Ďalšie informácie nájdete v *Príručke k softvéru VeriSeq NIPT Solution v2* (č. dokumentu 1000000067940).

- Potvrďte, že sú všetky čiarové kódy pripevnené a potom vložte vzorky, pipetové špičky a doštičky (s čiarovým kódom smerujúcim doprava) do nosiča.
- Po každej výzve na vloženie vyberte možnosť **OK**.

Veľkosť dávky so vzorkami	Typ nosiča	Pruh	Položka	Pozícia miesta
24, 48, 96	Pipetová špička	7 – 12	1 000 µl pipetové špičky	5
			1 000 µl pipetové špičky (iba pri dávke s 96 vzorkami)	4, 5
	Skúmavka	15	Pripravené skúmavky so vzorkami odobratej krvi 1 – 24 (pre všetky veľkosti dávok)	1 – 24
	Skúmavka	16	Pripravené skúmavky so vzorkami odobratej krvi 25 – 48 (veľkosť dávky iba 48 a 96 vzoriek)	25 – 48
	Skúmavka	17	Pripravené skúmavky so vzorkami odobratej krvi 49 – 72 (veľkosť dávky iba 96 vzoriek)	49 – 72
	Skúmavka	18	Pripravené skúmavky so vzorkami odobratej krvi 73 – 96 (veľkosť dávky iba 96 vzoriek)	73 – 96
	Multiflex	19 – 24	Prázdna doštička s hlbokými jamkami, finálna plazma, s čiarovým kódom	4
	Multiflex	19 – 24	Prázdna doštička s hlbokými jamkami, Intermediálna plazma, s čiarovým kódom	5
	Reagencia	47	[Voliteľné] Fosfátom pufovaný fyziologický roztok Dulbecco (DPBS, Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) pre kontrolu bez šablóny (NTC, no template control)	5

10. Overte, či boli nosiče, laboratórne pomôcky a reagentie správne vložené.
11. Na obrazovke Pre-Spin Deck Verification (Overenie plošiny pred odstredeníím) vyberte možnosť **OK**.
12. Sledujte automatizované procesy na zariadení ML STAR.
13. Keď Workflow Manager zobrazí upozornenie, overte, či sa na vkladacej plošine zariadenia ML STAR nenachádzajú žiadne prekážky, aby bolo možné zo zariadenia ML STAR vyložiť nosiče.
14. Na vyloženie plošiny vyberte možnosť **Unload** (Vyložiť).
15. Odstráňte doštičku s hlbokými jamkami, s označením Intermediate Plasma (Intermediálna plazma) nasledovne.
 - a. Preskúmajte, či sa v každej jamke na doštičke nachádza rovnaký objem (žiadne chyby pipiet). Očakávaný objem je 1 000 µl.
 - b. Zaznamenajte akékoľvek nekonzistencie po dokončení postupu izolácie plazmy.
 - c. Doštičku zapečatíte, vložte tak, aby sa zachovala vyváženosť a odstreďujte pri otáčkach 5600 × g po dobu 10 minút s vypnutou možnosťou rýchleho zastavenia (brzdou) alebo s vybratým najnižším nastavením.
16. Ak chcete pokračovať na finálny krok Plasma Preparation (Príprava plazmy) vyberte možnosť **Yes** (Áno).
17. Odstráňte tesnenie doštičky a doštičku znova vložte do nosiča.

Veľkosť dávky so vzorkami	Typ nosiča	Pruh	Položka	Pozícia miesta
24, 48, 96	Multiflex	19 – 24	Doštička s hlbokými jamkami na intermediálnu plazmu	5

18. Začiarknite políčko **Intermediate Plasma plate has been spun** (Doštička s intermediálnou plazmou bola odstredená) a potom vyberte možnosť **OK**.
19. Sledujte automatizované procesy na zariadení ML STAR.
20. Keď Workflow Manager zobrazí upozornenie, overte, či sa na vkladacej plošine zariadenia ML STAR nenachádzajú žiadne prekážky, aby bolo možné zo zariadenia ML STAR vyložiť nosiče.
21. Na vyloženie plošiny vyberte možnosť **Unload** (Vyložiť).
22. Keď Workflow Manager zobrazí upozornenie, vyprázdňte nosiče aj plošinu.
23. Odstráňte doštičku s hlbokými jamkami na finálnu plazmu.
24. Preskúmajte, či na doštičke nedošlo k týmto chybám:
 - Nekonzistentný objem v jamkách. Očakávaný objem je 900 µl.
 - Viditeľné bunkové pelety.
 - Nadmerná hemolýza.

Ak spozorujete abnormálne viditeľné bunkové pelety alebo nadmernú hemolýzu, zrušte platnosť danej vzorky na konci metódy izolácie plazmy alebo použite nástroj Batch Manager. Ďalšie informácie o nástroji Batch Manager nájdete v *Príručke k softvéru VeriSeq NIPT Solution v2* (č. dokumentu 1000000067940).
25. Po zobrazení výzvy nástrojom Workflow Manager vyberte možnosť **OK**.

26. K jamkám, v ktorých došlo ku chybe, zadajte poznámky a vyberte možnosť **OK**.

27. Vykonaajte jeden z týchto krokov.

- Ak chcete pokračovať v extrakcii cfDNA, vyberte možnosť **Yes** (Áno).
- Na zastavenie vyberte možnosť **Exit** (Skončiť).

BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Ak zastavujete, doštičku s konečnou plazmou zapečatíte a skladujete ju v prostredí s teplotou 2 °C až 8 °C po dobu max. 7 dní.

Extrahovaná cfDNA

Príprava

1. Vizuálne preskúmajte balenie s príslušenstvom a na extrakciu a overte, či neuplynul dátum spotreby.
2. Pripravte si nasledujúce reagenty: Vaničky zásobníka a zásobníky s hlbokými jamkami označte názvom reagentov.

Reagencia	Skladovanie	Pokyny
Doštička s hlbokými jamkami na finálnu plazmu	2 °C až 8 °C	Ak už bola skladovaná, ponechajte ju pri izbovej teplote 30 minút. Odstreďujte počas 20 sekúnd pri 1 000 × g. Pred použitím doštičku s hlbokými jamkami na finálnu plazmu odpečatíte.

3. Pomaly pridávajte 3,75 ml pufru s proteinázou do každej ampulky na reagentiu s proteinázou K.
 - Pripravte 3 ampulky na 24 a 48 vzoriek.
 - Pripravte 4 ampulky na 96 vzoriek.
4. Zaviečkujte ampulky s proteinázou K a premiešavajte vírením, kým znova nevznikne suspenzia.



UPOZORNENIE

Zabráňte kontaminácii gumenej zátky. Nanesenie iných substancií na gumenú zátku môže kontaminovať budúce vzorky.

5. Združte pripravenú proteinázu K zo všetkých ampuliek do nádoby na reagentiu a označte ju ako Proteináza K.
6. Pridajte 100 ml 100 % EtOH do každej fľaštičky s reagentiou pufru na premývanie II.
 - Pripravte 1 fľaštičku na 24 a 48 vzoriek.
 - Pripravte 2 fľaštičky na 96 vzoriek.
7. Prevráťte fľaštičky s pufrom na premývanie Wash Buffer II tak, aby sa ich obsah premiešal.
8. Označte začiarkavacie políčka na fľaštičkách s pufrom na premývanie Wash Buffer II.

9. Označte 1 novú doštičku s plnou obrubou nápisom Intermediate (Intermediálna) a nalepte na ňu čiarový kód určený pre doštičky.
10. Označte 1 novú doštičku s plnou obrubou nápisom cfDNA Elution (Elúcia cfDNA) a nalepte na ňu čiarový kód určený pre doštičky.
11. Označte 1 doštičku s hlbokými jamkami nápisom Extraction Intermediate (Intermediálna extrakcia) a nalepte na ňu čiarový kód určený pre doštičky s hlbokými jamkami.
12. Na doštičku určenú na viazanie DNA nalepte čiarový kód určený pre doštičky.
13. Na nepoužité doštičky s jamkami pre dávky obsahujúce 24 a 48 vzoriek aplikujte fóliové tesnenie.
14. Pripravte čistiaci roztok obsahujúci 70 % EtOH (70 % EtOH, 30 % vody bez obsahu DNázy/RNázy).
15. Nasledovným spôsobom pripravte podtlakový systém.
 - a. Odstráňte rozvádzač podtlaku a očistite ho použitím 70 % EtOH. EtOH nenanášajte na tesnenie, môže to spôsobiť krehkosť materiálu.
 - b. Vyprázdňte fľašu s odpadovým materiálom, ktorý vzniká pri vytváraní podtlaku.
 - c. Overte, či je podtlakový systém zariadenia ML STAR zapnutý.

Postup

1. Výberom možnosti **OK** spustíte extrakciu cfDNA.
2. Ak nie je aplikácia **VeriSeq NIPT Method** otvorená:
 - a. Otvorte spúšťač AppLauncher a vyberte možnosť **VeriSeq NIPT Method**.
 - b. Zadaťte ID dávky, meno používateľa a vyberte možnosť **OK**.
3. Vložte pipetové špičky do držiakov špičiek nasledovným spôsobom a vyberte možnosť **OK**.



UPOZORNENIE

Pred spustením metódy pre dávky obsahujúce 24, 48 a 96 vzoriek pridajte plný stojan 8-kanálových pipetových špičiek.

Veľkosť dávky so vzorkami	Typ nosiča	Pruh	Položka	Pozícia miesta
24	Pipetová špička	1 – 6	1 000 µl pipetové špičky	1
		7 – 12	300 µl pipetové špičky	1
48	Pipetová špička	1 – 6	1 000 µl pipetové špičky	1, 2
		7 – 12	300 µl pipetové špičky	1
96	Pipetová špička	1 – 6	1 000 µl pipetové špičky	1, 2, 3, 4
		7 – 12	300 µl pipetové špičky	1

4. Vložte spočítané pipetové špičky do držiakov pipiet nasledovným spôsobom.

Veľkosť dávky so vzorkami	Typ nosiča	Pruh	Položka	Pozícia miesta
24, 48, 96	Pipetová špička	49 – 54	1 000 µl pipetové špičky	1
			300 µl pipetové špičky	2
			50 µl pipetové špičky	3

- Zadajte miesto prvej a poslednej pipetovej špičky pre každý zo stojanov so špičkami a vyberte možnosť **OK**.
- Naskenujte čiarové kódy balenia na extrakciu Extraction Box.
- Zadajte meno používateľa alebo iniciály osoby pripravujúcej reagenziu a vyberte možnosť **OK**.
- Naskenujte čiarové kódy balenia s príslušenstvom Accessory Box.
- Zadajte meno používateľa alebo iniciály osoby pripravujúcej reagenziu a vyberte možnosť **OK**.
- Potvrďte prilepenie čiarových kódov.
- Ak je to nevyhnutné, odpečatíte doštičku s hlbokými jamkami na finálnu plazmu.
- Vložte doštičky (tak, aby čiarový kód smeroval doprava) do nosiča doštičiek nasledovným spôsobom a vyberte možnosť **OK**.

Veľkosť dávky so vzorkami	Typ nosiča	Pruh	Položka	Pozícia miesta
24, 48, 96	Multiflex	19 – 24	Nová doštička s plnou obrubou, s označením Intermediate (Intermediálna), s čiarovým kódom	1
			Nová doštička s plnou obrubou, Elúcia cfDNA, s čiarovým kódom	2
			Nová doštička s plnou obrubou, s označením Extraction Intermediate (Intermediálna extrakcia), s čiarovým kódom	4
			Doštička s hlbokými jamkami na finálnu plazmu, s čiarovým kódom	5

- Potvrďte, že doštička na viazanie DNA je označená čiarovým kódom, a potom vyberte možnosť **OK**.
- Pre čiastkové dávky na doštičke použite orezané tesnenie na doštičky, ktoré umiestnite nad nepoužité jamky (stĺpce 4 – 12 pre dávky obsahujúce 24 vzoriek a stĺpce 7 – 12 pre dávky obsahujúce 48 vzoriek).
- Vložte doštičku na viazanie DNA do rozvádzača podtlaku s čiarovým kódom smerujúcim doprava.

16. Pred umiestnením doštičky na viazanie do rozvádzača BVS vizuálne skontrolujte, či sa v jamkách nenachádza žiadna prekážka.
Mohlo by to ovplyvniť tok reagencie pri aplikácii podtlaku.
17. Ak používate dávky s 24 alebo 48 vzorkami, pokryte nepoužívané jamky a utesnite fóliovým tesnením. Vyberte začiarkavacie políčko **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (Sú stĺpce na doštičke na viazanie DNA zapečatené?) a potom možnosť **OK**.
18. Vložte nádoby na reagencie do nosiča reagensí nasledovným postupom a vyberte možnosť **OK**.

Veľkosť dávky so vzorkami	Typ nosiča	Pruh	Položka	Pozícia miesta
24, 48	Reagencia	47	16 ml pufru na elúciu	1
			11 ml proteínázy K	2
96	Reagencia	47	16 ml pufru na elúciu	1
			15 ml proteínázy K	2

19. Preneste určené reagencie do zásobníkov s hlbokými jamkami a potom vložte zásobníky do nosičov s hlbokými jamkami nasledovným spôsobom.
20. Zvoľte možnosť **OK**.

Veľkosť dávky so vzorkami	Typ nosiča	Pruh	Položka	Pozícia miesta
24, 48	Hlboké jamky	39 – 44	125 ml pufru na premývanie Wash Buffer II	1
			125 ml pufru na premývanie Wash Buffer I	2
			60 ml 100 % EtOH	3
			100 ml pufru na lýzu Lysis Buffer	4
			60 ml vody bez obsahu RNázy/DNázy	5
96	Hlboké jamky	39 – 44	200 ml pufru na premývanie Wash Buffer II	1
			125 ml pufru na premývanie Wash Buffer I	2
			100 ml 100 % EtOH	3
			100 ml pufru na lýzu Lysis Buffer	4
			V100 ml vody bez obsahu RNázy/DNázy	5

21. Počkajte, kým sa dokončí automatická kontrola objemu reagentie.
22. Potvrďte, že fľaša s odpadovým materiálom, ktorý vzniká pri vytváraní podtlaku, je prázdna (odporúča sa pri polovičnej naplnenosti) a vyberte možnosť **OK**.
23. Potvrďte umiestnenie všetkých nosičov, laboratórnych pomôcok a reagentí a potom vyberte možnosť **OK** na obrazovke Extraction Deck Verification (Overenie plošiny na extrakciu).
24. Počas automatizovaných procesov zariadenie ML STAR sledujte.

**UPOZORNENIE**

Pretečenia vzoriek, ktoré systém nedokázal detegovať, musíte manuálne označiť ako neplatné ešte pred kontamináciou okolitých jamiek.

25. Po poslednom kroku aplikácie podtlaku vyberte doštičku na viazanie DNA a vyčistite spodnú plochu použitím 70 % EtOH.
26. Utesnite všetky nepokryté jamky na doštičke na viazanie DNA a potom doštičku na viazanie DNA umiestnite na prázdnu doštičku s hlbokými jamkami na finálnu plazmu.
27. Odstreďujte zostavu doštičky na viazanie DNA a doštičky na finálnu plazmu pri otáčkach 5600 × g počas 10 minút so zapnutou možnosťou rýchleho zastavenia (brzdou).
28. Zvoľte možnosť **OK**.
29. Počas centrifugovania doštičky na viazanie DNA dokončíte čistenie zariadenia na podtlak:
 - a. Vyberte rozvádzač podtlaku a potom vyberte možnosť **OK**.
 - b. Počkajte, kým sa automatické odstránenie odpadových látok dokončí.
 - c. Vyčistite rozvádzač podtlaku aj vnútro podtlakového systému použitím 70 % EtOH a potom rozvádzač podtlaku vymeňte.
 - d. Vyberte políčko **Manifold is on Vacuum** (Rozvádzač aplikuje podtlak), čím sa spustí presun doštičky na elúciu na rozvádzač vákua, a potom vyberte možnosť **OK**.
30. Po centrifugovaní odpečatíte jamky obsahujúce vzorky na doštičke na viazanie DNA.
31. Doštičku na viazanie DNA umiestnite na hornú časť doštičky na elúciu cfDNA, ktorá je umiestnená na rozvádzači podtlaku.
32. Vložte doštičku na viazanie DNA s čiarovým kódom smerujúcim doprava a potom vyberte možnosť **OK**.
33. Počas automatizovaných procesov zariadenie ML STAR sledujte.
34. Po kroku inkubácie vyberte začiarkavacie políčko **Plates are assembled as indicated** (Doštičky sú zostavené podľa požiadaviek). Potvrďte, že sa zostava doštičky na viazanie DNA/doštičky na elúciu cfDNA nachádza na podpornom podstavci (ak sa to vyžaduje na odstredenie).
35. Nepokryté jamky zapečatíte na doštičke na viazanie DNA.
36. Odstreďujte pri otáčkach 5600 × g po dobu 2 minút so zapnutou možnosťou rýchleho zastavenia (brzdou) a potom vyberte možnosť **OK**.
37. Vizualne preskúmajte doštičku na elúciu cfDNA, či sa v každej jamke nachádza rovnaký objem. Očakávaný objem je približne 55 µl.
38. Doštičku na elúciu cfDNA zapečatíte a zachovajte na prípravu knižnice.

39. Keď Workflow Manager zobrazí upozornenie, overte, či sa na vkladacej plošine zariadenia ML STAR nenachádzajú žiadne prekážky, aby bolo možné zo zariadenia ML STAR vyložiť nosiče.
40. Na vyloženie plošiny vyberte možnosť **Unload** (Vyložiť).
41. Vyložte všetky nosiče a vyčistite plošinu zariadenia ML STAR. Potom vyberte možnosť **OK**.
42. K ovplyvneným jamkám zadajte poznámky a vyberte možnosť **OK**.
43. Vykonaťte jeden z týchto krokov:
 - Ak chcete pokračovať v príprave knižníc, vyberte možnosť **Yes** (Áno).
 - Na zastavenie vyberte možnosť **Exit** (Skončiť).

BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Ak zastavujete, platničku cfDNA Elution zapečatíte a skladujete ju v prostredí s teplotou -25 °C až -15 °C max. 7 dní.

Príprava knižníc

Príprava

1. Vizuálne preskúmajte balenie s príslušenstvom (Accessory box) a na prípravu knižnice (Library Prep) a overte, či neuplynul dátum spotreby.
2. Pripravte si nasledujúce reagenty. Zásobné skúmavky a zásobníky s hlbokými jamkami označte názvami reagentov.

Reagencia	Skladovanie	Pokyny
Zmes A-Tailing	-25 °C až -15 °C	Rozmrazujte pri izbovej teplote. Vírením premiešajte a potom krátko odstred'te.
Doštička na elúciu cfDNA	-25 °C až -15 °C	Ak bola doštička skladovaná, skontrolujte, či nebola skladovaná viac ako 7 dní a potom ju rozmrazte pri izbovej teplote. Premiešajte vírením pri otáčkach 1 500 ot./min 1 minútu. Odstred'ujte počas 20 sekúnd pri 1 000 × g.
Zmes na opravu konca	-25 °C až -15 °C	Rozmrazujte pri izbovej teplote. Vírením premiešajte.
Hybridizačný pufer	-25 °C až -15 °C	Rozmrazujte pri izbovej teplote. Vírením premiešajte. Po použití vráťte na miesto skladovania.
Ligačná zmes	-25 °C až -15 °C	Rozmrazujte pri izbovej teplote. Vírením premiešajte a potom krátko odstred'te.
Doštička s adaptérmi NIPT DNA	-25 °C až -15 °C	Rozmrazujte pri izbovej teplote. Vírením premiešajte. Odstred'ujte počas 20 sekúnd pri 1 000 × g.
Pufer na resuspenziu	2 °C až 8 °C	Vírením premiešajte. Po použití vráťte na miesto skladovania.
Gulôčky na purifikáciu vzoriek	2 °C až 8 °C	Ponechajte v prostredí s izbovou teplotou na 30 minút. Pred každým použitím silno premiešajte vírením. Premiešavajte vírením alebo preklápaním, kým nie sú všetky gulôčky rozptýlené v suspenzii a kým nie je zmes homogénna.

**UPOZORNENIE**

Pri odstraňovaní utesnenia z doštičky s adaptérmi NIPT DNA postupujte veľmi opatrne, aby nedošlo ku krížovej kontaminácii aerosólom medzi jamkami. Môže to spôsobiť nesprávne výsledky.

3. Ak bola doštička na elúciu cfDNA uskladnená zmrazená, pripravte ju nasledujúcim spôsobom.
 - a. Rozmrazujte pri izbovej teplote.
 - b. Premiešajte vírením pri otáčkach 1 500 ot./min 1 minútu.
 - c. Odstred'ujte počas 20 sekúnd pri otáčkach 1 000 × g.
4. Označte jednu novú doštičku s plnou obrubou nápisom Libraries (Knižnice) a nalepte na ňu čiarový kód určený pre doštičku.
5. Zo 100-percentného EtOH pripravte 80 % EtOH. Skombinujte 40 ml 100 % EtOH a 10 ml vody bez obsahu DNázy/RNázy. Prevrátením premiešajte.
6. Skontrolujte, či je zapnutá funkcia kontroly teploty v zariadení ML STAR.

Enzýmy na dilúciu

1. Kombinácia zmesi A-Tailing Mix a pufru na opakovanú suspenziu (RSB) v skúmavke so skrutkovacím uzáverom. Vírením premiešajte a potom krátko odstred'ite.

Veľkosť dávky so vzorkami	A-Tailing Mix (µl)	Pufer na opakovanú suspenziu (RSB)
24, 48	900	1200
96	1800	2400

2. Kombinácia zmesi na ligáciu a pufru na opakovanú suspenziu (RSB) v skúmavke so skrutkovacím uzáverom. Vírením premiešajte a potom krátko odstred'ite.

Veľkosť dávky so vzorkami	Zmes na ligáciu (µl)	Pufer na opakovanú suspenziu (RSB)
24, 48	230	1713
96	440	3278

Postup

1. Výberom možnosti **OK** spustíte prípravu knižnice. Ak ešte nie je aplikácia **VeriSeq NIPT Method** otvorená:
 - a. Otvorte aplikáciu AppLauncher a vyberte možnosť **VeriSeq NIPT Method**.
 - b. Zadaťte ID dávky, meno používateľa a vyberte možnosť **OK**.
2. Potvrďte, že nasledujúci spotrebný materiál je pripravený tak, ako to udáva obrazovka Reagent Preparation (Príprava reagensie):
 - Zmes A-Tailing Mix, zmes na ligáciu a 80 % EtOH
 - Gulôčky na purifikáciu vzorky, zmes na opravu konca a doštička adaptéra NIPT DNA
3. Vyberte začiarovacie políčka a potom vyberte možnosť **OK**.

4. Naskenujte čiarové kódy balenia na prípravu knižnice (Library Prep).
5. Zadaťte meno používateľa alebo iniciály osoby pripravujúcej reagentiu a vyberte možnosť **OK**.
6. Naskenujte čiarové kódy balenia s príslušenstvom Accessory Box.
7. Zadaťte meno používateľa alebo iniciály osoby pripravujúcej reagentiu a vyberte možnosť **OK**.
8. Vložte pipetové špičky do držiakov špičiek uvedeným postupom a vyberte možnosť **OK**.

Veľkosť dávky so vzorkami	Typ nosiča	Pruh	Položka	Pozícia miesta
24	Pipetová špička	1 – 6	50 µl pipetové špičky	1
		7 – 12	300 µl pipetové špičky	1, 2
48	Pipetová špička	1 – 6	50 µl pipetové špičky	1, 2
		7 – 12	300 µl pipetové špičky	1, 2, 3, 4
96	Pipetová špička	1 – 6	50 µl pipetové špičky	1, 2, 3, 4
		7 – 12	300 µl pipetové špičky	1, 2, 3, 4, 5

9. Ak ste po extrakcii cfDNA protokol zastavili, vložte spočítané pipetové špičky do nosičov špičiek nasledovným postupom.

Veľkosť dávky so vzorkami	Typ nosiča	Pruh	Položka	Pozícia miesta
24, 48, 96	Pipetová špička	49 – 54	1 000 µl pipetové špičky	1
			300 µl pipetové špičky	2
			50 µl pipetové špičky	3

10. Zadaťte miesto prvej pipetovej špičky pre každý zo stojanov so špičkami a vyberte možnosť **OK**.
11. Potvrďte, že sú čiarové kódy pripevnené, vložte doštičky (tak, aby čiarový kód smeroval doprava) do nosiča platničiek uvedeným postupom a vyberte možnosť **OK**.

Veľkosť dávky so vzorkami	Typ nosiča	Pruh	Položka	Pozícia miesta
24, 48, 96	Multiflex	19 – 24	Doštička na elúciu cfDNA označená čiarovým kódom	1
			Doštička adaptéra NIPT DNA označená čiarovým kódom	2
			Nová doštička s plnou obrubou a 96 jamkami, s knižnicami, označená čiarovým kódom	3
			Nové doštičky s plnou obrubou a 96 jamkami	4, 5

12. Nasledovným postupom vložte nosič s hlbokými jamkami a vyberte možnosť **OK**.

Veľkosť dávky so vzorkami	Typ nosiča	Pruh	Položka	Pozícia miesta
24, 48, 96	S hlbokými jamkami	39 – 44	50 ml 80 % EtOH v zásobníku s hlbokými jamkami	1
			Nové doštičky s plnou obrubou a 96 jamkami	2, 3, 4, 5

13. Vložte nádobky na reagentie do nosiča na reagentie nasledovným postupom a vyberte možnosť **OK**.

Veľkosť dávky so vzorkami	Typ nosiča	Pruh	Položka	Pozícia miesta
24, 48, 96	Reagentia	47	Zmes na opravu konca, 2,5 ml	1
			Pripravená zmes A-Tailing Mix (celkový objem)	2
			Pripravená zmes na ligáciu (celkový objem)	3
			Gulôčky na purifikáciu vzoriek, 10 ml	4
			Hybridizačný pufer, 12 ml	5

14. Nastavte pre 12 ml pufru na hybridizáciu (HT1) v zásobníku pripomienku ohľadom združovania (pooling).
15. Skontrolujte, či sú nosiče, laboratórne pomôcky a reagentie vložené podľa pokynov a na obrazovke Library Deck Verification (Overenie plošiny pre knižnicu) vyberte možnosť **OK**.
16. Počkajte, kým sa dokončí automatická kontrola objemu reagentií.
17. Počas automatizovaných procesov zariadenie ML STAR sledujte.
18. Keď Workflow Manager zobrazí upozornenie, overte, či sa na vkladacej plošine zariadenia ML STAR nenachádzajú žiadne prekážky, aby bolo možné zo zariadenia ML STAR vyložiť nosiče.
19. Na vyloženie plošiny vyberte možnosť **Unload** (Vyložiť).
20. Preskúmajte, či sa v každej jamke na doštičke s knižnicami nachádza rovnaký objem.



UPOZORNENIE

V prípade, ak objemy v jamkách nie sú konzistentné, automatická kontrola kvality vzoriek môže zlyhať.

21. V prípade skladovania doštičku s knižnicami zapečatíte a zachovajte.
22. Vyložte nosiče, vyčistite plošinu a vyberte možnosť **OK**.
23. K ovplyvneným jamkám zadajte poznámky a vyberte možnosť **OK**.
24. Vykonajte jeden z týchto krokov:
 - Ak chcete prejsť na krok Quantify Libraries (Kvantifikácia knižníc), vyberte možnosť **Yes** (Áno).
 - Ak chcete proces zastaviť, vyberte možnosť **Exit** (Skončiť).

BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Ak zastavujete proces, zapečatíte doštičku s knižnicami, aby ste ju mohli uskladniť. Doštička s knižnicami je stabilná maximálne 7 dní od dátumu jej prípravy, ak sa skladuje pri teplote od -25 °C do -15 °C.

Kvantifikácia knižníc**Príprava**

1. Pripravte si nasledujúce reagenty:

Reagencia	Skladovanie	Pokyny
Reagencia na kvantifikáciu DNA	2 °C až 8 °C	Chráňte pred svetlom. Rozmrazujte pri izbovej teplote 30 – 150 minút. (Odporúča sa reagentie odstrániť na začiatku postupu Príprava knižníc.) Vírením premiešajte a potom krátko odstred'te.
Kvantifikačný štandard pre DNA	2 °C až 8 °C	Vírením premiešajte a potom krátko odstred'te.
Pufer na resuspenziu	2 °C až 8 °C	Vírením premiešajte.

2. Ak bola doštička s knižnicami uskladnená zmrazená, pripravte ju nasledujúcim spôsobom.
 - a. Skontrolujte, či nebola doštička skladovaná viac ako 7 dní a potom ju rozmrazte pri izbovej teplote.
 - b. Vírením premiešajte.
 - c. Odstred'ujte pri otáčkach 1 000 × g 1 minútu.
3. Fluorometer zapnite 10 minút pred jeho použitím.
4. Na novú doštičku s 384 jamkami nalepte čiarový kód.
5. Na novú doštičku s plnou obrubou nalepte čiarový kód.

Postup

1. Výberom možnosti **OK** spustíte kvantifikáciu.
2. Ak ešte nie je aplikácia VeriSeq NIPT Method otvorená:
 - a. Otvorte aplikáciu AppLauncher a vyberte možnosť **VeriSeq NIPT Method**.
 - b. Zadaťte ID dávky, meno používateľa a vyberte možnosť **OK**.
3. Naskenujte čiarové kódy balenia s príslušenstvom Accessory Box.
4. Zadaťte meno používateľa alebo iniciály osoby pripravujúcej reagentiu a vyberte možnosť **OK**.

5. Vložte pipetové špičky do držača špičiek uvedeným postupom a vyberte možnosť **OK**.

Veľkosť dávky so vzorkami	Typ nosiča	Pruh	Položka	Pozícia miesta
24, 48	Pipetová špička	1 – 6	Stojan s 300 µl pipetovými špičkami	1
			Stojan s 50 µl pipetovými špičkami	2
96	Pipetová špička	1 – 6	Stojan s 300 µl pipetovými špičkami	1
			Stojan s 50 µl pipetovými špičkami	2, 3

6. Potvrďte prilepenie čiarových kódov.
 7. Ak je to potrebné, doštičku s knižnicami odpečatťe.
 8. Vložte doštičky (tak, aby čiarový kód smeroval doprava) do nosiča Multiflex uvedeným postupom a vyberte možnosť **OK**.

Veľkosť dávky so vzorkami	Typ nosiča	Pruh	Položka	Pozícia miesta
24, 48, 96	Multiflex	19 – 24	Nové doštičky s plnou obrubou označené čiarovým kódom	1
			Nová doštička s 384 jamkami označená čiarovou obrubou	2
			Doštička s knižnicami označená čiarovým kódom	3
			Nové doštičky s plnou obrubou a 96 jamkami	4, 5

9. Vložte nádoby na reagenty bez viečok do nosiča na skúmavky uvedeným postupom a potom vyberte možnosť **OK**.

Veľkosť dávky so vzorkami	Typ nosiča	Pruh	Položka	Pozícia miesta
24, 48, 96	Skúmavka	46	Kvantifikačný štandard pre DNA	1
			Reagencia na kvantifikáciu DNA	2

10. Vložte nádobky na reagenty do nosiča na reagenty nasledovným postupom a vyberte možnosť **OK**.

Veľkosť dávky so vzorkami	Typ nosiča	Pruh	Položka	Pozícia miesta
24, 48, 96	Reagencia	47	Nová nádobka na reagenty (prázdna)	1
			Pufer na resuspenziu, 16 ml	2

11. Ak ste po príprave knižnice protokol zastavili, vložte spočítané pipetové špičky do nosičov špičiek nasledovným postupom.

Veľkosť dávky so vzorkami	Typ nosiča	Pruh	Položka	Pozícia miesta
24, 48, 96	Pipetová špička	49 – 54	1 000 µl pipetové špičky	1
			300 µl pipetové špičky	2
			50 µl pipetové špičky	3

12. Zadať miesto prvej a poslednej pipetovej špičky pre každý zo stojanov so špičkami a vyberte možnosť **OK**.
13. Skontrolujte, či sú nosiče, laboratórne pomôcky a reagenty vložené podľa pokynov a na obrazovke Quant Deck Verification (Overenie plošiny na kvantifikáciu) vyberte možnosť **OK**.
14. Počkajte, kým sa dokončí automatická kontrola objemu reagentov.
15. Počas automatizovaných procesov zariadenie ML STAR sledujte.
16. Keď Workflow Manager zobrazí upozornenie, overte, či sa na vkladacej plošine zariadenia ML STAR nenachádzajú žiadne prekážky, aby bolo možné zo zariadenia ML STAR vyložiť nosiče.
17. Na vyloženie plošiny vyberte možnosť **Unload** (Vyložiť).
18. Vyložte doštičku s knižnicami.
- Preskúmajte, či sa v každej jamke na doštičke nachádza rovnaký objem.
 - Zapečatíte doštičku s knižnicami a skladujte ju pri izbovej teplote, kým sa nedokončí analýza fluorometrických údajov.
19. Vyložte zostávajúce doštičky s 96 jamkami a skontrolujte, či sa v každej jamke nachádza konzistentný objem.
Závažné rozdiely v objemoch môžu indikovať chybu v krokoch pipetovania.
20. Vyložte doštičku s 384 jamkami a v príslušných jamkách overte prítomnosť tekutiny.
21. Doštičku zapečatíte fóliovým tesnením.
22. Odstred'ujte počas 20 sekúnd pri 1 000 × g.
23. Inkubujte pri izbovej teplote 10 minút bez prístupu svetla.
24. Vyložte všetky nosiče.
25. Očistite plošinu zariadenia ML STAR a vyberte možnosť **OK**.

**UPOZORNENIE**

Kým nezískate potrebné údaje, nelikvidujte reagenty potrebné na kvantifikáciu. Ak by ste chceli kvantifikáciu zopakovať, budete dané reagenty potrebovať.

26. Po inkubácii odstráňte fóliové tesnenie a doštičku s 384 jamkami vložte do čítačky mikrotitračných doštičiek. Skontrolujte, či sa používa fialová doštička s adaptéromi (Číslo dielu: 0310-4336) od spoločnosti Molecular Devices, alebo ekvivalentná doštička, ak to používaný prístroj umožňuje.
 - Pri vkladaní musí byť označenie A1 v ľavom hornom rohu.
27. Šablónu VeriSeq NIPT vyberte dvakrát, aby sa otvorila v softvéri SoftMax Pro.
28. Na karte Home (Domov) vyberte možnosť **New Experiment** (Nový experiment).
29. Vyberte možnosť **Read** (Čítať).
30. Nasledovným spôsobom údaje exportujte vo formáte XML.
 - a. Pravým tlačidlom vyberte možnosť **Plate** (Doštička) a potom možnosť **Rename** (Premenovať).
 - b. Naskenujte čiarový kód doštičky na kvantifikáciu a potom vyberte možnosť **OK**.
 - c. V ľavom hornom rohu obrazovky vyberte ikonu doštičky a potom vyberte v ponuke možnosť **Export** (Exportovať).
 - d. Začiarknite políčko **Expt name** (Názov exportu), nastavte možnosť dátumu doštičky na Raw (Nespracovaný), nastavte formát výstupu na XML a potom vyberte možnosť **OK**.
 - e. Nastavte cestu a názov pre výstupný súbor a vyberte možnosť **Save** (Uložiť).Počítač Hamilton musí mať možnosť prístupu na uvedené miesto. V názve súboru ani v ceste nepoužívajte medzery.

Analýza

1. V zariadení ML STAR na obrazovke Scanner Information (Informácie o skeneri) zadajte ID fluorometra.
2. Pridajte komentáre týkajúce sa cyklu fluorometra a potom vyberte možnosť **OK**.
3. Navigujte na súbor *.xml kvantifikácie, ktorý obsahuje fluorometrické údaje, a potom vyberte možnosť **OK**.
4. Skontrolujte krivku štandardných hodnôt a výsledky analýzy koncentrácie vzorky a potom vyberte možnosť **OK**.
5. Ak musíte znova skenovať doštičku, vyberte možnosť **Rescan** (Skenovať znova).

Vzorky sú citlivé na svetlo a menia sa v čase. Ak je to možné, vykonajte opakované skenovanie čo najrýchlejšie.
6. K ovplyvneným jamkám zadajte poznámky a vyberte možnosť **OK**.

7. Vyhodnoťte výsledky a pokračujte nasledujúcimi krokmi.
 - Ak výsledok splní zadané podmienky, pokračujte na krok [Združovanie \(pool\) knižníc na strane 40](#). Zadané podmienky sú uvedené v metrikách QC (kontrola kvality) a v tabuľke uvádzajúcej hraničné hodnoty v *Príručke k softvéru VeriSeq NIPT Solution v2* (č. dokumentu 1000000067940).
 - Ak výsledok nezodpovedá zadaným podmienkam, systém danú metódu zruší. Zopakujte proces kvantifikácie tak, že začnete s krokom [Príprava na strane 36](#).
8. Vykonajte jeden z týchto krokov:
 - Ak chcete pokračovať na [Združovanie \(pool\) knižníc na strane 40](#), vyberte možnosť **Yes** (Áno).
 - Ak chcete proces zastaviť, vyberte možnosť **Exit** (Skončiť).

BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Ak zastavujete proces, zapečatíte doštičku s knižnicami, aby ste ju mohli uskladniť. Doštička s knižnicami je stabilná maximálne 7 dní nepretržitého skladovania pri teplote od -25 °C do -15 °C.

Združovanie (pool) knižníc

Príprava

1. Pripravte si nasledujúce reagenty:

Reagencia	Skladovanie	Pokyny
Hybridizačný pufer	-25 °C až -15 °C	Rozmrazujte pri izbovej teplote. Vírením premiešajte. Po použití vráťte na miesto skladovania.

2. Ak bola doštička s knižnicami uskladnená zmrazená, pripravte ju nasledujúcim spôsobom.
 - a. Skontrolujte, či nebola doštička skladovaná viac ako 7 dní a potom ju rozmrazte pri izbovej teplote.
 - b. Premiešajte vírením pri otáčkach 1 500 ot./min 1 minútu.
 - c. Odstreďujte počas 20 sekúnd pri 1 000 × g.
 - d. Pipetou premiešajte.
3. Prázdnu skúmavku na združovanie označte nápisom Pool A. V prípade 96 vzoriek druhú skúmavku na združovanie označte ako Pool B.
4. Nasledujúci program denaturácie uložte v tepelnom cyklovači s vyhrievaným vekom.
 - a. Vyberte možnosť predhriatia veka a nastavte teplotu na 102 °C.
 - b. Nastavte reakčný objem na 50 µl.
 - c. Rýchlosť nábehu nastavte na maximálnu hodnotu (≥ 2 °C za sekundu).
 - d. Inkubujte pri teplote 96 °C 10 minút a potom pri teplote 4 °C 5 sekúnd.
 - e. Uchovávajte pri teplote 4 °C.

Postup

1. Položte doštičku s knižnicami na vopred naprogramovaný tepelný cyklovač a spustíte program denaturácie. Doštičku s knižnicami nedenaturujte skôr, ako sa pri kvantifikácii potvrdí, že boli splnené metriky kontroly kvality, lebo je možné, že budete chcieť spustiť opakovanú kvantifikáciu.
2. Odstred'ujte doštičku s knižnicami rýchlosťou 1 000 × g 20 sekúnd.
3. Výberom možnosti **OK** spustíte združovanie (pool) knižníc.
4. Ak nie je metóda VeriSeq NIPT Method otvorená:
 - a. Otvorte aplikáciu AppLauncher a vyberte možnosť **VeriSeq NIPT Method**.
 - b. Zadaťte ID dávky, meno používateľa a vyberte možnosť **OK**.
5. Vyberte koncentráciu poolu a potom vyberte možnosť **OK**.
Hustota cieľového klastra je 220 – 260 K/mm².

POZNÁMKA Koncentrácie a objemy pri združovaní (pooling) bude možno potrebné pri dávkach obsahujúcich 24 vzoriek zvýšiť, aby sa zachovali tie isté hustoty klastrov, ako pri dávkach obsahujúcich 48/96 vzoriek.

6. Keď vás Workflow Manager vyzve, vykonajte jeden z týchto krokov:
 - Ak chcete nahráť hárok so vzorkami, vyberte hárok so vzorkami súvisiaci s dávkou a potom možnosť **Load** (Načítať).
 - Ak chcete použiť predvolené systémové hodnoty pre zostávajúce typy vzoriek, vykazovanie pohlavia alebo typ skríningu, vyberte možnosť **Use Default** (Použiť predvolené) pre každé nastavenie. Ďalšie informácie o vytváraní hárka so vzorkami nájdete v *Príručke k softvéru VeriSeq NIPT Solution v2* (č. dokumentu 1000000067940).
7. Výberom možnosti **Start** (Spustiť) sa spustí časovač denaturácie doštičky.
8. Vložte pipetové špičky do držiakov pipiet uvedeným postupom.

Veľkosť dávky so vzorkami	Typ nosiča	Pruh	Položka	Pozícia miesta
24, 48, 96	Pipetová špička	7 – 12	50 µl filtrovacie pipetové špičky	1

9. Vložte doštičky s denaturovanou knižnicou (tak, aby čiarový kód smeroval doprava) do nosiča Multiflex uvedeným postupom a vyberte možnosť **OK**.

Veľkosť dávky so vzorkami	Typ nosiča	Pruh	Položka	Pozícia miesta
24, 48, 96	Multiflex	19 – 24	Doštička s denaturovanou knižnicou (označená čiarovým kódom)	1

10. Nasledovným postupom vložte skúmavky do nosiča skúmaviek a vyberte možnosť **OK**.

Veľkosť dávky so vzorkami	Typ nosiča	Pruh	Položka	Pozícia miesta
24, 48	Skúmavka	46	Nová 2 ml skúmavka, Pool A	1
96	Skúmavka	46	Nová 2 ml skúmavka, Pool A	1
			Nová 2 ml skúmavka, Pool B	2

11. Vložte nádobky na reagentie do nosiča na reagentie nasledovným postupom a vyberte možnosť **OK**.

Veľkosť dávky so vzorkami	Typ nosiča	Pruh	Položka	Pozícia miesta
24, 48, 96	Reagencia	47	3 ml hybridizačného pufru	1

12. Vložte pipetové špičky do nosičov špičiek uvedeným postupom.

Veľkosť dávky so vzorkami	Typ nosiča	Pruh	Položka	Pozícia miesta
24, 48, 96	Pipetová špička	49 – 54	1 000 µl filtrovacie pipetové špičky	1
			300 µl filtrovacie pipetové špičky	2
			50 µl filtrovacie pipetové špičky	3

13. Zadať miesto prvej a poslednej pipetovej špičky pre každý zo stojanov so špičkami a vyberte možnosť **OK**.

14. Overte, či boli nosiče, laboratórne pomôcky a reagentie vložené podľa uvedeného postupu.

15. Na obrazovke Pooling Deck Verification (Overenie plošiny pred združovaním) vyberte možnosť **OK**.

16. Počas automatizovaných procesov zariadenie ML STAR sledujte.

17. K ovplyvneným jamkám zadajte poznámky a vyberte možnosť **OK**.

18. Keď Workflow Manager zobrazí upozornenie, overte, či sa na vkladacej plošine zariadenia ML STAR nenachádzajú žiadne prekážky, aby bolo možné zo zariadenia ML STAR vyložiť nosiče.

19. Na vyloženie plošiny vyberte možnosť **Unload** (Vyložiť).

20. Vyložte nosič skúmaviek.

21. Každú skúmavku na združovanie zaviečkujte, premiešajte vírením a následne odstred'te.

22. Zvoľte možnosť **OK**.

23. Po združovaní (pooling) hneď, ako je to možné, vykonajte sekvenovanie knižníc. Doštičku s knižnicami utesnite a skladujte maximálne 7 dní pri teplote -25 °C až -15 °C , aby bolo možné združovanie zopakovať.

BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Pri zastavení zaviečkujte skúmavky s poolmi a uchovávajte pri teplote od -25 °C do -15 °C maximálne 7 dní.

Príprava združených (pooled) knižníc na sekvenovanie

Príprava

1. Pripravte si nasledujúce reagencie:

Reagencia	Skladovanie	Pokyny
Skúmavky na združovanie (pool)	-25 °C až -15 °C	Po predchádzajúcom skladovaní nechajte roztopiť pri izbovej teplote. Krátko premiešajte vírením. Krátko odstredzte.

2. Systém sekvenovania novej generácie pripravte dokončením týchto polí v module Local Run Manager VeriSeq NIPT:
 - a. Run Name (Názov cyklu)
 - b. [Voliteľné] Run Description (Opis cyklu)
 - c. Pool Barcode (Čiarový kód poolu)



UPOZORNENIE

Čiarový kód poolu zadaný do modulu Local Run Manager sa musí zhodovať s čiarovým kódom zadaným do aplikácie Workflow Manager. Nesprávne konfigurácie cyklu sa zamietnu analytickým softvérom a bude sa vyžadovať opakované sekvenovanie.

Ďalšie informácie o používaní modulu Local Run Manager VeriSeq NIPT nájdete v *Príručke k softvéru VeriSeq NIPT Solution v2* (č. dokumentu 1000000067940).

Postup

1. Nasledovné objemy skombinujte v kazete na reagentie a pipetovaním ich zmiešajte.
 - Hybridizačný pufer (900 µl)
 - 450 µl – Pool A (450 µl)
2. Pokračujte v sekvenovaní pomocou referenčnej príručky dodanej so zariadením na sekvenovanie novej generácie. Ak používate prístroj NextSeq 550Dx, prečítajte si *Referenčnú príručku k prístroju NextSeq 550Dx* (č. dokumentu 100000009513) (alebo si pozrite zodpovedajúci príbalový leták uvedený na stránke podpory spoločnosti Illumina www.support.illumina.com).
3. Po zobrazení výzvy potvrdte správnosť konfigurácie daného cyklu.
4. Ak jej to potrebné, tento postup zopakujte pre pool B.
 - Na dosiahnutie požadovaného rozsahu hustoty cieľového klastra je možné opakovane združiť doštičku knižnice pomocou inej koncentrácie združovania (pooling) v zariadení Hamilton. Pri opakovanom združovaní sa zruší platnosť pôvodného poolu.
 - Prípadne je možné upraviť pomer poolu k HT1 (450 µl + 900 µl) na dosiahnutie požadovaného rozsahu hustoty cieľového klastra.

Sekvenovanie novej generácie

Test VeriSeq NIPT Solution v2 je možné použiť pri sekvenovaní novej generácie za týchto podmienok:

- Možnosť čítaní z oboch koncov v počte 2 x 36
- Kompatibilita s indexovacími adaptérmi súpravy na prípravu vzoriek VeriSeq NIPT Sample Prep Kit
- Dvojkanálová chémia
- Automatické vytváranie súborov BCL (*.bcl) (nespracované údaje sekvenovacieho prístroja)
- 400 mil. čítaní z oboch koncov na jeden cyklus
- Kompatibilita so softvérom VeriSeq NIPT Assay Software v2

Systém NextSeq 550Dx je kompatibilný s testom VeriSeq NIPT Solution v2

Analýza údajov sekvenovania

Po dokončení sekvenovania sa údaje získané pri sekvenovaní automaticky odošlú do softvéru VeriSeq NIPT Assay Software v2 na analýzu a vytvorenie správy. Správa obsahuje klasifikáciu každej vzorky v dávke rovnako ako aj hodnotenie všetkých metrik hodnotenia kvality cyklu. Proces analýzy od dokončenia sekvenovania až po finálne výsledky zaberie v prípade dávky so 48 vzorkami približne 4 hodiny. Podrobné informácie o analýze údajov a výstupnom súbore nájdete v *Príručke k softvéru VeriSeq NIPT Solution v2* (č. dokumentu 1000000067940).

Interpretácia výsledkov

Algoritmus testu VeriSeq NIPT Solution v2 používa sofistikovaný štatistický model, v ktorom sa kombinuje niekoľko typov informácií získaných z kolekcie fragmentov knižnice sekvenovaných z oboch koncov. Tento model sa používa na detegovanie oblastí genómu, ktoré sú v knižnici každej vzorky nedostatočne alebo nadmerne zastúpené. Čo je dôležité, tento model objasňuje, či je nedostatočné alebo nadmerné zastúpenie konzistentné s udalosťou aneuploidie v genóme plodu na úrovni fetálnej frakcie odhadovanej pre danú knižnicu.

V prípade všetkých chromozómov sú údaje sekvenovania z oboch koncov zarovnané s referenčným genómom (HG19). Jedinečné a neduplikované zarovnané čítania sú zoskupené do skupín veľkosti 100 kb. Zodpovedajúce počty skupín sú upravené, aby zodpovedali GC skresleniu, a podľa predtým stanoveného genómového pokrytia špecifického pre danú oblasť. Použitím týchto normalizovaných počtov skupín sa odvodí štatistické skóre pre každý autozóm porovnaním oblastí pokrytia, ktoré môžu obsahovať aneuploidiu s ostatnými autozómami.

Pomer logaritmickej pravdepodobnosti (LLR) sa pre každú vzorku vypočíta použitím skóre založenom na pokrytí a odhadovanej fetálnej frakcie. LLR predstavuje pravdepodobnosť, s ktorou bude vzorka obsahovať anomáliu, pri danom pozorovanom pokrytí a fetálnej frakcii v porovnaní s pravdepodobnosťou vzorky bez anomálie v tom istom pozorovanom pokrytí. Pri výpočte tohto pomeru sa berie do úvahy aj odhadovaná neistota vo fetálnej frakcii. Pre následné výpočty sa použije prirodzený logaritmus daného pomeru. Softvér daného analytického testu pri stanovení aneuploidie vyhodnotí LLR pre každý cieľový chromozóm a každú vzorku.

Počas vytvárania dávky musíte definovať typ vzorky (samostatný plod alebo dvojča), typ skríningu (základný alebo celogenómový) a požadované vykázanie pohlavných chromozómov (Yes (Áno), No (Nie) a SCA) pre každú vzorku. Tieto informácie spolu určujú výsledok, ktorý sa vykáže pre každú vzorku.

Pre všetky typy vzoriek typ skríningu určuje, ktoré autozomálne anomálie sa vykážu. Pri základnom skríningu sa vykazujú iba chromozomálne udalosti zahŕňajúce chromozómy 13, 18 a 21. Pri skríningu celého genómu sa pre akýkoľvek autozóm vykážu delécie a duplikácie celých chromozómov alebo ich častí. Dĺžka najmenej vykazovateľnej delécie alebo duplikácie je 7 Mb.

U vzoriek zo samostatných plodov môžete vykázanie pohlavných chromozómov vypnúť. Môžete tiež nakonfigurovať vykázanie aneuploidií v prípade pohlavných chromozómov buď s vykázaním pohlavia v prípade euploidných vzoriek, alebo bez neho.

Ak je u dvojčiat vykázovanie pohlavných chromozómov nastavené na možnosť Yes (Áno), výsledok je obmedzený na vykázanie prítomnosti alebo neprítomnosti chromozómu Y v knižnici. Aneuploidia pohlavných chromozómov sa u dvojčiat nedá vykázať.

POZNÁMKA Ak majú všetky vzorky v dávke to isté vykázané pohlavie, používateľ bude upozornený prostredníctvom e-mailu alebo zobrazením chyby v používateľskom rozhraní na možnosť výskytu prímеси alebo kontaminácie vzoriek. Platnosť dávky sa zruší a nevygeneruje sa žiadna správa. (platí pre softvér serveru VeriSeq NIPT Solution v2 vo verzii v2.2 a vyššej)

Výsledok ANOMALY DETECTED (DETEGOVALA SA ANOMÁLIA) naznačuje pozitívny výsledok skríningu vzoriek na jednu alebo niekoľko anomálií v súlade s vybratým typom skríningu a možnosťou vykázania pohlavných chromozómov. Po detegovaní anomálie správa poskytne opis anomálie v cytogenetickom zápise.

Softvér VeriSeq NIPT Assay Software v2 používa štatistiku generovanú počas sekvenovania na vytvorenie odhadu fetálnej frakcie (FFE) pre každú vzorku. FFE predstavuje odhadovanú časť cfDNA vo fetálnej frakcii, ktorá je izolovaná použitím analytického testu a vykázaná ako zaokrúhlená percentuálna hodnota pre každú vzorku. Priemerná smerodajná odchýlka tohto odhadu pre všetky vzorky je 1,3 %. FFE sa nemá použiť samostatne na vylúčenie vzoriek pri vykazovaní výsledkov.

Na vytvorenie reprezentačných stanovení chromozómov používa test VeriSeq NIPT Assay Software v2 metriku iFACT (Fetal Aneuploidy Confidence Test, test stanovenia pravdepodobnosti výskytu aneuploidie plodu). Je to dynamická metrika prahovej hodnoty, ktorá indikuje, či systém vygeneroval dostatočné množstvo pokrytí sekvenovaním, pričom udáva odhad fetálnej frakcie pre každú vzorku. Negatívne stanovenia sa vykazujú iba v prípade, ak vzorka splní prahovú hodnotu iFACT. V prípade, ak vzorka nespĺňa danú prahovú hodnotu, v hodnotení kvality sa zobrazí výsledok FAILED iFACT (Zlyhanie testu iFACT) a systém nevygeneruje výsledok.

Okrem metriky iFACT berie test VeriSeq NIPT Assay Software v2 počas analýzy do úvahy niekoľko ďalších metrik hodnotenia kvality. K ďalším metrikám patrí hodnotenie uniformity pokrytia, pričom sa použijú referenčné oblasti genómu, a distribúcia dĺžok fragmentov cfDNA. Pri hodnotení kvality sa zobrazí buď príznak hodnotenia kvality (QA flag) alebo výsledok QA failure (pri zlyhaní) pre akúkoľvek metriku mimo akceptovateľného rozsahu. V prípade zlyhania kontroly kvality systém pre danú vzorku nevygeneruje výsledok. Ak pre vzorku zlyhá kontrola kvality, je možné vzorku znova spracovať za predpokladu, že sa v skúmavke s odobratou krvou nachádza dostatočný objem plazmy.

Test VeriSeq NIPT Solution v2 generuje údaje, ktoré sa použijú vo finálnej správe. Nevytvára samotnú finálnu správu pre pacienta. Za spracovanie a obsah finálnej správy, ktorá bude doručená kontaktnému lekárovi, nesú zodpovednosť zákazníci. Spoločnosť Illumina nenesie zodpovednosť za presnosť interpretácie výsledkov vo finálnej správe pre zákazníkov.



UPOZORNENIE

Skontrolujte odhady fetálnych frakcií pre všetky vzorky. Ak sú odhady fetálnych frakcií podobné pre všetky vzorky v rámci cyklu, je pravdepodobné, že došlo k fúzii, ktorá ovplyvnila výsledky. Požiadajte o pomoc oddelenie technickej podpory spoločnosti Illumina.

Charakteristiky účinnosti

Nasledujúce údaje opísané v častiach venovaných klinickému výkonu a analytickému výkonu boli generované použitím protokolov a materiálov obsiahnutých v Návode na použitie, pričom na prvom mieste bola uvedená plazma. Všetky údaje sekvenovania pre túto časť boli generované systémom sekvenovania NextSeq 500/550 alebo NextSeq 550Dx s nasledujúcimi konfiguráciami:

	NextSeq 500/550	NextSeq 550Dx
Softvér v prístroji	Riadiaci softvér NextSeq 4.0	Operačný softvér NextSeq 1.3
Verzia súpravy reagencií	Súprava reagencií NextSeq 500/550 High Output v2.5 (75 cyklov)	Súprava reagencií NextSeq 550Dx High Output v2.5 (75 cyklov)
Metóda sekvenovania	Cyklus sekvenovania 2 x 36 z oboch koncov v režime vysokého výkonu	Cyklus sekvenovania 2 x 36 z oboch koncov v režime vysokého výkonu

Klinická štúdia

Presnosť testu VeriSeq NIPT Solution v2 bola preukázaná vyhodnotením vzoriek plazmy odobranej tehotným ženám so samostatným plodom a s dvojčatami. Vzorky sa získali z plazmatickej banky obsahujúcej vzorky bez možnosti identifikácie, ktoré boli predtým spracované zo vzoriek periférnej plnej krvi. Do štúdie sa zahrnulo viac ako 45 000 vzoriek. Tieto vzorky boli predtým vyhodnotené prenatalným skríningom na možný obsah aneuploidíí, čiastočných delécií alebo duplikácií s minimálnou veľkosťou 7 Mb u plodu. Všetky vzorky z tehotenstiev s výskytom anomálie a podmnožina ďalších vzoriek z tehotenstiev bez výskytu anomálie boli vyhodnotené ako vhodné na testovanie, ak boli dostupné ich klinické výsledky a splnili sa kritériá platné pre vzorku. Množina na testovaciu analýzu obsahovala spolu 2 335 vzoriek. Z tejto množiny pochádzalo 2 328 vzoriek z tehotenstiev s jedným plodom a 7 vzoriek z tehotenstiev s dvojčatami.

Z týchto vzoriek v prípade 28 (1,2 %, 28/2335) zlyhala kontrola kvality analýzy pri prvom testovaní počas analýzy hotových údajov sekvenovania:

- 27 zlyhaní iFACT (jedno XO, 26 bez anomálie)
- Jedno zlyhanie spôsobené údajmi mimo očakávaného rozsahu

Charakteristiky demografie a tehotenstva

Údaje o veku matky, gestačnom veku a trimesteri tehotenstva uvádza v [Tabuľka 7](#) pre vzorky zo skríningu celého genómu vrátane vzoriek so známym mozaicizmom. Väčšina testovaných vzoriek (98 %) reprezentovala prvý trimester tehotenstva.

Demografické údaje boli vyhodnotené v kohortách základného aj celogenómového skríningu a nevykazovali žiadne štatistické rozdiely. Charakteristiky demografie a tehotenstva boli podobné bez ohľadu na to, či bol známy mozaicizmus zahrnutý alebo vylúčený.

Tabuľka 7 Charakteristiky demografie a tehotenstva

Súhrnná štatistika	Celý genóm (vrátane známeho mozaicizmu)
Počet vzoriek	2307*
Vek matky – v rokoch	
Priemer	35,08
Smerodajná odchýlka	4,04
Medián	34,95
25. percentil, 75. percentil	32,31; 37,79
Minimum, maximum	20,22; 53,02
Gestačný vek pri odbere krvi – v týždňoch	
Priemer	10,93
Smerodajná odchýlka	1,20
Medián	10,57
25. percentil, 75. percentil	10,29; 11,14
Minimum, maximum	10,00; 27,86
Trimester tehotenstva – n (%)	
< prvý (< 14 týždňov)	2 252 (98 %)
Druhý	54 (2 %)
Tretí (≥ 27 týždňov)	1 (0 %)

* Finálne odovzdané vzorky obsahovali 7 dvojčiat.

Klinická účinnosť

Výsledky, ktoré dodal test VeriSeq NIPT Solution v2, boli porovnané s výsledkami zodpovedajúcimi klinickému referenčnému štandardu. Pre všetky skúšané vzorky sa získali klinické referenčné štandardné výsledky (pravdivý klinický výsledok) v súvislosti so stavom chromozomálnej aneuploidie plodu a čiastočných delécií a duplikácií v rozsahu 7 Mb alebo väčšom. Klinické referenčné štandardné výsledky pre vzorky, ktoré boli zahrnuté do tejto štúdie, záviseli od výsledkov analýzy chromozómov alebo fyzického vyšetrenia novorodenca použitím negatívneho skríningu NIPT založeného na NGS. Vyškolený personál štúdie vykonal klasifikáciu údajov klinického referenčného štandardu v súvislosti s dokumentom Medical Coding, ktorý dodal zadávateľ štúdie.

Metódy analýzy chromozómov zahŕňali určovanie karyotypu, fluorescenčnú in situ hybridizáciu (FISH) alebo komparatívny mikrottest genómovej hybridizácie chromozómov (CMA). Analýza chromozómov bola vykonaná použitím periférnej krvi alebo slín novorodencov alebo dojčiat, vzoriek POC (tkanivá potratených plodov), amniocytov, choriových klkov, placentárnych tkanív alebo postnatálnej pupočníkovej krvi.

Mozaicizmus je definovaný ako výskyt dvoch a viacerých bunkových línií s rozdielnym zložením chromozómov u jedinca. Bunkové línie pochádzajú z tej istej zygoty. Typ a úroveň mozaicizmu sa líšia a závisia od načasovania udalostí spôsobujúcich mozaicizmus počas embryogenézy a vývoja plodu. V prenatalnej diagnostike sa vyskytujú rôzne typy mozaicizmu v závislosti od distribúcie abnormálnych a normálnych bunkových línií v cytotrofoblaste, mezenchýme alebo plode.¹⁰ Hoci je možné mozaicizmus nájsť pri akejkoľvek chromozomálnej anomálii, výskyt mozaicizmu je v prípade zriedkavých trizómií vyšší ako v prípade trizómií 21., 18. a 13. chromozómu (T21, T18 a T13).¹¹ Pri vyhodnocovaní presnosti testu sa prípady mozaicizmu zahrnuli do celogenómovej analýzy, keďže je cieľom tohto skrínungu v súvislosti s týmto analytickým testom detekcia zriedkavých autozomálnych aneuploidii (RAA).

Základná presnosť skrínungu

Pri základnom skrínungu anomálie zahŕňajú trizómie T21, T18 a T13. Do analýzy sa zahrnuli vzorky od samostatných plodov aj dvojčiat v celkovom počte 2 243. Všetkých sedem tehotenstiev s dvojčatami sa správne detegovalo ako T21 a neboli vykázané v nasledujúcej tabuľke.

Tabuľka 8 Citlivosť a špecificita testu VeriSeq NIPT Solution v2 pri detegovaní trizómií 21, 18, & 13 pri základnom skrínungu tehotenstiev s jedným plodom (s vylúčením známeho mozaicizmu)

	T21	T18	T13
Citlivosť	> 99,9 % (130/130)	> 99,9 % (41/41)	> 99,9 % (26/26)
Obojstranný 95 % IS	97,1 %, 100 %	91,4 %, 100 %	87,1 %, 100 %
Špecificita	99,90 % (1982/1984)	99,90 % (1995/1997)	99,90 % (2000/2002)
Obojstranný 95 % IS	99,63 %, 99,97 %	99,64 %, 99,97 %	99,64 %, 99,97 %

Ako zobrazuje [Tabuľka 8](#), presnosť analytického testu sa pri základnom skrínungu vypočíta tak, že sa vylúči podmnožina 64 vzoriek s aneuploidiami RAA, čiastočnými deléciami alebo duplikáciami na autozómoch alebo známym mozaicizmom. Týchto 64 vzoriek zahŕňalo 8 vzoriek s mozaicizmom T21 a tri T18. Päť z týchto 11 vzoriek bolo identifikovaných ako vzorky s prítomnou anomáliou detegovanou analytickým testom VeriSeq NIPT Assay Software v2.

Presnosť skrínungu celého genómu

Pri skrínungu celého genómu akákoľvek anomália zahŕňa trizómie, monozómie, čiastočné delécie a duplikácie s veľkosťou 7 Mb alebo viac. Vzorky skrínungu celého genómu obsahovali 36 vzoriek so známym mozaicizmom.

Celkovo sa testovalo 2 307 vzoriek od jedného plodu a dvojčiat. Všetkých sedem tehotenstiev s dvojčatami bolo správne detegovaných na prítomnosť anomálie 21. chromozómu a nie sú vykázané v nasledujúcich tabuľkách.

Presnosť skrínungu celého genómu pre akúkoľvek anomáliu

Tabuľka 9 Citlivosť a špecificita testu VeriSeq NIPT Solution v2 pri detegovaní akejkoľvek anomálie pri skrínungu celého genómu (vrátane známeho mozaicizmu)

	Citlivosť	Špecificita
Odhad v % (n/N)	95,5 % (318/333)	99,34 % (1954/1967)
Obojstranný 95 % IS	92,7 %, 97,3 %	98,87 %, 99,61 %

Presnosť skrínungu celého genómu na zriedkavú aneuploidiu autozómov

Tabuľka 10 Citlivosť a špecificita testu VeriSeq NIPT Solution v2 na zriedkavú aneuploidiu autozómov (RAA) pri skrínungu celého genómu (vrátane známeho mozaicizmu)

	Citlivosť	Špecificita
Odhad v % (n/N)	96,4 % (27/28)	99,80 % (2001/2005)
Obojstranný 95 % IS	82,3 %, 99,4 %	99,49 %, 99,92 %

Presnosť skrínungu celého genómu na čiastočné delécie a duplikácie

Tabuľka 11 Citlivosť a špecificita testu VeriSeq NIPT Solution v2 na čiastočné delécie a duplikácie vo veľkosti 7 Mb a viac pri skrínungu celého genómu (vrátane známeho mozaicizmu)

	Citlivosť	Špecificita
Odhad v % (n/N)	74,1 % (20/27)	99,80 % (2000/2004)
Obojstranný 95 % IS	55,3 %, 86,8 %	99,49 %, 99,92 %

Rozdiely v presnosti medzi základným skrínungom a skrínungom celého genómu

Metodológia určovania skóre v prípade bežných trizómií a aneuploidií pohlavných chromozómov je pri bežnom aj celogenómovom skrínungu rovnaká. Algoritmus sa pri základnom skrínungu použije iba na trizómie T21, T18 a T13. Pri tejto metodológii sa však na vyhodnotenie všetkých trizómií a aneuploidií RAA aj čiastočných duplikácií a delécií použije celogenómový skrínung.

Medzi základným a celogenómovým skrínungom sa spomínajú dva rozdiely v presnosti pri vykazovaní. Prvým rozdielom je to, že pri skrínungu celého genómu sa vzorky so známym mozaicizmom pri bežných trizómiách aj pri aneuploidiách RAA, čiastočných deléciách aj duplikáciách zahrnujú do metrík určujúcich presnosť. Druhým rozdielom je fakt, že pri skrínungu celého genómu je možné prednostne vykázať detekciu čiastočnej duplikácie alebo delécie pred vykázaním celej trizómie. Okrem vykázaní čiastočnej duplikácie alebo delécie je možné overiť prítomnosť celej trizómie v skóre LLR, ktoré je súčasťou doplnkovej správy.

Zahrnutie mozaicizmu do skríningu celého genómu

Mozaicizmus sa v tomto analytickom teste uvádza ako obmedzenie. Ak je prítomný mozaicizmus, signál anomálie plodu je redukovaný, detegovanie môže byť komplikovanejšie, čo môže ovplyvniť celkovú špecifitu analytického testu. Keďže je však mozaicizmus dôležitejším výsledkom v rámci rozšíreného obsahu, vzorky s mozaicizmom sa zahrnuli do skríningu celého genómu.

Z 64 vzoriek, ktoré boli zahrnuté do skríningu celého genómu, avšak nie do základného skríningu, sa v prípade 36 vzoriek zistila prítomnosť mozaicizmu podľa klinického referenčného štandardu. Z týchto 36 vzoriek 23 stanovení bolo v súlade s klinickým referenčným štandardom.

Detegovanie čiastočnej delécie alebo duplikácie verzus aneuploidie celého chromozómu

Test VeriSeq NIPT Solution v2 ponúka možnosti pre základný skríning aj skríning celého genómu. Výsledky typu ANOMALY DETECTED (DETEGOVALA SA ANOMÁLIA) pri základnom skríningu, sa vykazujú iba v prípade, ak sa detegovala aneuploidia celého chromozómu 21, 18 alebo 13 a ak boli splnené všetky podmienky kontroly kvality. Pri skríningu celého genómu systém deteguje aneuploidiu pri všetkých udalostiach vyskytujúcich sa pri autozómoch, čiastočných deléciách a duplikáciách vo veľkosti minimálne 7 Mb.

Pri skríningu celého genómu v prípade, ak sa pri udalosti týkajúcej sa celého chromozómu ako aj udalosti CNV v rámci toho istého chromozómu prekročí prahová hodnota LLR, systém priradí pri vykazovaní prednosť čiastočnej delécii alebo duplikácii pred stanovením udalosti týkajúcej sa celého chromozómu, ak veľkosť čiastočnej delécie alebo duplikácie pokrýva približne 75 % alebo menej z chromozómu, na ktorom bola udalosť detegovaná. V prípade, ak oblasť čiastočnej delécie alebo duplikácie pokrýva viac ako 75 % veľkosti celého chromozómu, udalosť sa vykáže ako kompletná trizómia alebo monozómia celého chromozómu, ak sa zároveň prekročí prahová hodnota LLR pre celý chromozóm. Vzhľadom na to značne rozsiahle delécie alebo duplikácie, ktoré pokrývajú 75 % veľkosti chromozómu a menej, môžu indikovať aneuploidiu celého chromozómu.

Pre všetky vzorky skóre LLR pre klasifikáciu celého chromozómu nájdete v doplnkovej správe. Skóre LLR je potrebné skontrolovať s ohľadom na špecifickú hraničnú hodnotu, ktorú uvádza Obrázok 2: [95 % pravdepodobnosti detekcie pre priemerné oblasti podľa veľkosti pre test VeriSeq NIPT Solution v2 na strane 62](#) ešte pred interpretáciou výsledku. Napríklad stanovenie variácie v počte kópií v prípade, ak skóre LLR na úrovni chromozómu prekročí hraničnú hodnotu, ešte viac podporuje interpretáciu výsledku konzistentného s aneuploidiou celého chromozómu. Príklad uvádza [Tabuľka 12](#).

V klinickej štúdii sa vyskytli dve tehotenstvá s jedným plodom so značne rozsiahlymi duplikáciami (jedna na 21. chromozóme a jedna na 18. chromozóme), ktoré pokrývali menej ako 75 % relatívnej veľkosti chromozómu ([Tabuľka 12](#)). Obe udalosti sa vykázali ako čiastočné duplikácie a nie ako úplná trizómia daného chromozómu. Skóre LLR pre uvedené udalosti bolo nad hraničnou hodnotou, čo bolo v súlade s výsledkom celochromozómovej anomálie. Pri stanovovaní čiastočnej duplikácie alebo celej trizómie sa pre pacienta ponúka po zistení pozitívneho výsledku neinvazívneho prenatalného testovania (NIPT) aj potvrdzujúci test vykonaný v rámci prenatalnej diagnostiky.

Tabuľka 12 Príklady udalostí rozsiahlych duplikácií identifikovaných pri skríningu celého genómu

	Pravdivý klinický výsledok	Systémový výsledok pre celý genóm	Veľkosť anomálie (v Mb)	% chromozómu	Skóre LLR
Vzorka č. 1	Trizómia 21 u samostatného plodu	Čiastočná duplikácia na ch. 21	22,50	48,9	19,43
Vzorka č. 2	Trizómia 18 u samostatného plodu	Čiastočná duplikácia na ch. 18	47,00	60,2	12,99

Prečítajte si *Príručku k softvéru VeriSeq NIPT Solution v2* (č. dokumentu 1000000067940), kde nájdete ďalšie informácie o metrikách kontroly kvality, ktoré sa používajú na vykazovanie výsledkov aneuploidie.

Pohlavné chromozómy

Výsledky testu VeriSeq NIPT Solution v2 pre pohlavné chromozómy sa porovnali s výsledkami klinického referenčného štandardu a sú zhrnuté v nasledujúcej tabuľke. Percentuálna konkordancia sa vypočítala pre každý pohlavný chromozóm v rámci každého výsledného klinického referenčného štandardu. Percentuálna konkordancia sa vypočítala tak, že sa vydělil počet vzoriek, v prípade ktorých bolo stanovenie pohlavných chromozómov testom VeriSeq NIPT Solution v2 v súlade s klasifikáciou klinického referenčného štandardu, celkovým počtom vzoriek s tou istou klasifikáciou klinického referenčného štandardu.

Tabuľka 13 Percentuálna konkordancia pre klasifikáciu pohlavia plodu*

Klasifikácia pohlavia plodu	Karyotyp	Fenotyp získaný z fyzického vyšetrenia novorodenca		Cytogenetické výsledky							
		Ženský	Mužský	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY	Iný**	Chýba
Žiadna detegovaná anomália	XX	997	0	21	0	2	0	0	0	0	0
Žiadna detegovaná anomália	XY	0	966	0	15	0	0	0	0	0	1
Detegovala sa anomália	XO	0	0	0	0	19	0	0	1	0	0
Detegovala sa anomália	XXX	0	0	0	0	0	17	0	0	1	0
Detegovala sa anomália	XXY	0	0	0	0	0	0	23	0	1	0
Detegovala sa anomália	XYY	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0

Klasifikácia pohlavia plodu		Fenotyp získaný z fyzického vyšetrenia novorodenca		Cytogenetické výsledky							
		Ženský	Mužský	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY	Iný**	Chýba
Detegované	Karyotyp										
Celkom		997	966	21	15	21	17	23	12	2	1
Percento konkordancie		100	100	100	100	90,5	100	100	91,7	Nepoužíva sa	Nepoužíva sa

* V prípade piatich tehotenstiev s dvojčatami sa správne klasifikovala prítomnosť chromozómu Y. V prípade dvoch tehotenstiev sa správne klasifikovala neprítomnosť chromozómu Y.

** Ďalšie cytogenetické výsledky boli XXXXX a XYY.

Pozitívna prediktívna hodnota a negatívna prediktívna hodnota testu VeriSeq NIPT Solution v2

Pozitívna prediktívna hodnota (PPV) a negatívna prediktívna hodnota (NPV) testu poskytujú informácie ohľadom možnosti testu poskytovať informované klinické rozhodnutia na základe citlivosti, špecifity testu a pravdepodobnosti (pretest), že sa u plodu vyskytuje trizómia (prevalencia). Pretože PPV a NPV závisia od prevalencie a prevalencia týchto aneuploidí sa môže líšiť v prípade rôznych populácií subjektov, PPV a NPV boli vypočítané pre rozsah vierohodných hodnôt prevalencie, ktoré boli založené na hodnotách citlivosti a špecifity získaných pri základnom skríningu (bez známeho mozaicizmu) počas klinickej štúdie overenia presnosti.

[Tabuľka 17](#) je založená na skríningu celého genómu (so známym mozaicizmom).

Tabuľka 14 Prevalencia trizómie 21, PPV a NPV pri základnom skríningu (s vylúčením známeho mozaicizmu)

Prevalencia (%)	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

Tabuľka 15 Prevalencia trizómie 18, PPV a NPV pri základnom skríningu (s vylúčením známeho mozaicizmu)

Prevalencia (%)	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

Tabuľka 16 Prevalencia trizómie 13, PPV a NPV pri základnom skríningu (s vylúčením známeho mozaicizmu)

Prevalencia (%)	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

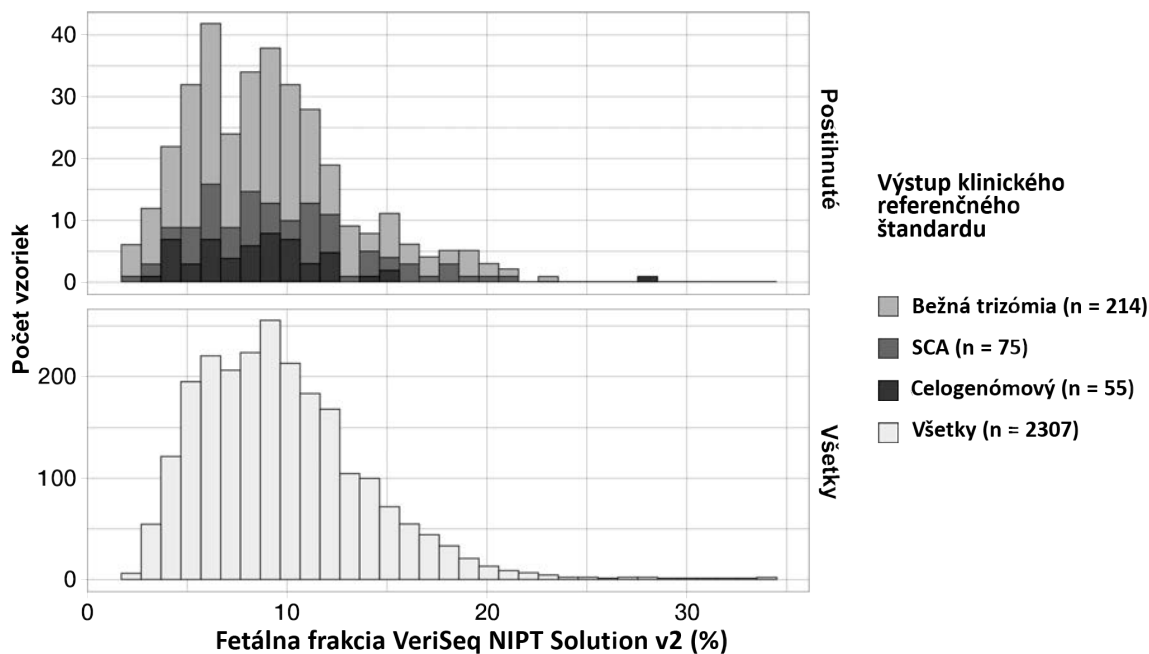
Tabuľka 17 Prevalencia akejkoľvek anomálie, PPV a NPV pri skríningu celého genómu (so zahrnutím známeho mozaicizmu)

Prevalencia (%)	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

Distribúcia fetálnej frakcie

Odhad distribúcie fetálnej frakcie (FF) v teste VeriSeq NIPT Solution v2 získané zo skríningu celého genómu s prítomným mozaicizmom zobrazuje [Obrázok 1](#) v kategórii výsledku pre klinický referenčný štandard.

Obrázok 1 Distribúcia fetálnej frakcie



5 vzoriek vykazovalo anomálie v rôznych kategóriách.

Bežná trizómia zahŕňa vzorky s trizómiou 21, 18 a 13.

Celogenómový skrining zahŕňa vzorky s RAA alebo čiastočnými deléciami alebo duplikáciami.

Odhady FF spadajú do rozsahu od 2 % do 34 % celkovo s mediánom 9 % a medzikvartilovým rozpätím (IQ) od 6 % do 12 %. Odhad FF pre bežné trizómie a udalosti detegované pri skríningu celého genómu je 8 % a pre aneuploidie SCA je 9 %. Rozsah odhadov FF bol konzistentný pre všetky výsledky. Neexistuje žiaden zjavný posun v distribúcii FF pri bežných trizómiách, aneuploidiach SCA, udalostiach detegovaných pri skríningu celého genómu alebo všetkých vzorkách pri analýze celého genómu.

Presnosť testu v prípade tehotenstiev s dvojčatami

Odhad presnosti pri detegovaní trizómie 13., 18. a 21. chromozómu a chromozómu Y u dvojčiat

Vzhľadom na nízku prevalenciu trizómie 13., 18. a 21. chromozómu u dvojčiat bol pre túto klinickú štúdiu k dispozícii iba malý počet vzoriek dvojčiat s touto anomáliou. Pri odhadovaní presnosti testu VeriSeq NIPT Solution v2 vykonávaného na vzorkách tehotenstiev s dvojčatami sa použili modely simulácie populácií tehotenstiev s dvojčatami na počítači (tzv. *in silico*) založené na pozorovaniach získaných z klinických vzoriek. Výsledky tejto simulácie boli konzistentné so zamýšľanou populáciou. Distribúcia fetálnej frakcie sa určila použitím približne 4 500 vzoriek od dvojčiat a porovnála s distribúciou získanou približne zo 120 000 vzoriek samostatných plodov. Distribúcia fetálnej frakcie podmienená stavom aneuploidie sa určila použitím domnelých stanovení v prípade samostatných plodov (1 044 prípadov trizómie 21, 307 prípadov trizómie 18 a 192 prípadov trizómie 13). Kombinácia týchto dvoch distribúcií umožnila interferencie pri detegovaní aneuploidie u dvojčiat.

Na odhad citlivosti sa simulovali množiny dizygotných a monozygotných dvojčiat a vypočítal sa vážený priemer predstavujúci ich prevalenciu v zamýšľanej populácii (2 dizygotné: 1 monozygotné). Na získanie špecifity sa simulovali množiny dvojčiat bez anomálie.

Frakcia každej simulovanej vzorky, v ktorej bola prítomná trizómia (napríklad frakcia s anomáliou) sa vypočítala odlišne pre každú kategóriu vzoriek:

- v prípade monozygotných dvojčiat sa frakcia s anomáliou v každej vzorke nastavila na 1,0, lebo v tejto situácii trizómia ovplyvňuje obe dvojčatá,
- u dizygotných dvojčiat sa predpokladalo, že bude anomália prítomná iba u jedného z dvojčiat (anomália prítomná u oboch dizygotných dvojčiat je extrémne vzácna). Hodnoty frakcie s anomáliou boli simulované použitím známej distribúcie pomerov fetálnej frakcie, ako bolo určené použitím klinických vzoriek dvojčiat rôzneho pohlavia. Použil sa konzervatívny prístup, lebo sa predpokladalo, že dvojča s anomáliou už malo najnižšiu fetálnu frakciu z oboch dvojčiat. Pre fetálne frakcie, ktoré sú v priemere nižšie v prípade tehotenstiev s trizómiou 13 a 18 sa použil korekčný faktor.
- u dvojčiat bez prítomnej anomálie sa pre frakciu s anomáliou v každej vzorke nastavila hodnota nula.

U dvojčiat s výskytom buď trizómie 18, alebo 13 sa fetálna frakcia zodpovedajúca frakcii vzorky s anomáliou zredukovala. Redukcia bola priamo úmerná priemernej redukcii fetálnej frakcie vysledovanej v klinických údajoch v prípade samostatných plodov s trizómiou 18 alebo 13 v porovnaní s euploidnými samostatnými plodmi.

Obe frakcie – celková fetálna frakcia a frakcia s anomáliou v každej simulovanej vzorke – sa následne použili na výpočet skóre aneuploidie pomocou štandardného algoritmu testu VeriSeq NIPT Solution v2. Citlivosť sa vypočítala určením, ako často skóre aneuploidie pre simulované dvojčatá s anomáliou prekročilo zodpovedajúcu hraničnú hodnotu pre aneuploidiu. Podľa toho sa vypočítala špecifita určením, ako často bolo skóre aneuploidie u simulovaných dvojčiek bez anomálie nižšie ako zodpovedajúca hraničná hodnota aneuploidie ([Tabuľka 18](#)). 95 % intervaly spoľahlivosti (IS) sa odhadli na základe počtu reálnych klinických vzoriek od dvojčiat v pôvodnom dátovom súbore, ktoré boli klasifikované ako vzorky, v ktorých je relevantná trizómia prítomná alebo neprítomná.

Pri odhadovaní citlivosti v prípade chromozómu Y vo vzorkách dvojčiat sa simulovali množiny vzoriek dvojčiat XY/XY a XX/XY. Vypočítal sa vážený priemer reprezentujúci ich prevalenciu v zamýšľanej populácii (1 XY/XY: 1 XX/XY). Pri odhadovaní špecifity v prípade chromozómu Y vo vzorkách dvojčiat sa simulovali množiny vzoriek dvojčiat XX/XX. Hodnoty celkovej fetálnej frakcie boli simulované vzhľadom na známu distribúciu fetálnej frakcie v klinických vzorkách od dvojčiat.

Pre dvojčatá XY/XY a XX/XY sa odhadlo zodpovedajúce skóre pre chromozóm Y použitím známeho vzťahu medzi fetálnou frakciou a skóre pre chromozóm Y vo vzorkách samostatných plodov, ktoré boli klasifikované ako mužského pohlavia. Iba pre dvojčatá XX/XY boli hodnoty fetálnej frakcie (t. j. mužského pohlavia) s anomáliou simulované použitím známej distribúcie pomerov fetálnej frakcie, ktoré sa zistili u dvojčiat z toho istého tehotenstva, ako bolo určené použitím klinických vzoriek dvojčiat rôzneho pohlavia. Použil sa konzervatívny prístup, pomocou ktorého bola vybratá frakcia s anomáliou tak, aby to zodpovedalo menšej frakcii z oboch dvojčiat. Pre každú simulovanú vzorku XX/XY sa skóre pre chromozóm Y vynásobilo frakciou s anomáliou.

U dvojčiat XX/XX sa použilo skóre pre chromozóm Y, ktoré bolo sledované v klinických vzorkách samostatných plodov klasifikovaných ako ženského pohlavia. Skóre pre chromozóm Y a celková fetálna frakcia sa následne použili na klasifikáciu každej simulovanej vzorky, buď ako „chromozóm Y je prítomný“ alebo „chromozóm Y chýba“ použitím štandardného algoritmu testu VeriSeq NIPT Solution v2.

Citlivosť sa vypočítala určením, ako často boli simulované dvojčičky XY/XY alebo XX/XY správne klasifikované ako dvojčatá s prítomným chromozómom Y. Špecifita sa vypočítala určením, ako často boli simulované dvojčičky XX/XX správne klasifikované ako dvojčatá s chýbajúcim chromozómom Y. 95 % intervaly spoľahlivosti (IS) sa odhadli na základe počtu reálnych klinických vzoriek od dvojčiat v pôvodnom dátovom súbore, ktoré boli klasifikované ako buď tie s prítomným chromozómom Y, alebo chýbajúcim chromozómom Y.

Tabuľka 18 Odhady trizómie 21., 18. a 13. chromozómu v simulovanej populácii tehotenstiev s dvojčatami

	Trizómia 21	Trizómia 18	Trizómia 13	Prítomnosť chromozómu Y
Citlivosť	96,4 %	95,7 %	93,6 %	> 99,9 %
Obojstranný 95 % IS	(86,4 %, 98,9 %)	(68,3 %, 99,4 %)	(64,1 %, 98,9 %)	(99,9 %, > 99,9 %)
Špecifita	99,9 %	> 99,9 %	> 99,9 %	> 99,9 %
Obojstranný 95 % IS	(99,8 %, > 99,9 %)	(99,9 %, > 99,9 %)	(99,9 %, > 99,9 %)	(99,7 %, > 99,9 %)

Tabuľka 18 obsahuje bodové odhady a odhadované 95 % intervaly spoľahlivosti (IS) pre citlivosť a špecifitu testu VeriSeq NIPT Solution v2 pri detegovaní trizómie 21., 18. a 13. chromozómu a prítomnosti chromozómu Y v simulovanej populácii tehotenstiev s dvojčatami, ktorá je konzistentná so zamýšľanou populáciou. Intervaly spoľahlivosti boli odhadované na základe počtu klinických vzoriek od dvojčiat, ktoré splnili podmienky kontroly kvality a boli klasifikované ako tie, v ktorých je relevantná trizómia prítomná alebo neprítomná. Pri výpočte citlivosti sa predpokladá, že dve tretiny tehotenstiev s dvojčatami s prítomnou anomáliou sú dizygotné s jedným plodom s anomáliou, a jedna tretina tehotenstiev s dvojčatami s prítomnou anomáliou sú monozygotné tehotenstvá, v prípade ktorých sa anomália vyskytuje u oboch dvojčiat.

Odhady, ktoré zobrazuje Tabuľka 18 sa týkajú iba tehotenstiev s dvojčatami. Vzhľadom na rovnakú nižšiu prevalenciu sú údaje získané z mnohopočetných tehotenstiev (tri a viac plodov) nedostatočné na vytvorenie vhodného štatistického modelu, ktorým by sa dala odhadnúť presnosť detegovania aneuploidie.

Presnosť analýzy

Presnosť

Na vyhodnotenie a kvantifikáciu presnosti analytického testu sa zopakovala analýza údajov pomocou softvéru zbierajúceho údaje na analýzu testu VeriSeq NIPT Solution v2 z dvoch predchádzajúcich štúdií využívajúcich test VeriSeq NIPT Solution:

- Štúdiá reprodukovateľnosti na viacerých pracoviskách, ktorá pozostávala z troch cyklov spustených tromi operátormi na troch pracoviskách pomocou jednej šarže reagentie pre celkovo deväť cyklov.
- Štúdiá na overenie presnosti výsledkov v rámci jediného laboratória, ktorá pozostávala z 12 cyklov na jedinom pracovisku použitím dvoch prístrojov ML STAR, dvoch nástrojových systémov na sekvenovanie a troch šarží sekvenovacích reagentií.

Cieľom štúdie na overenie presnosti bola kvantifikácia presnosti analytického testu pri detegovaní trizómie 21 (T21) a chromozómu Y a odhad variability pri použití rôznych prístrojov, súprav na prípravu knižnice a šarží sekvenovacích reagentií. Reprodukovateľnosť vzhľadom na podmienky, ktorá nie je opísaná vyššie, sa nehodnotila ako súčasť štúdií.

Pool T21 s 5 % fetálnou frakciou sa vytvoril kombináciou cfDNA extrahovanej z plazmy tehotnej ženy (s plodom s postihnutím T21) a cfDNA extrahovanej z plazmy ženy, ktorá nebola tehotná. Vytvoril sa aj pool cfDNA od tehotnej ženy s plodom mužského pohlavia (XY) s fetálnou frakciou 10 %. Súčasťou panela vzoriek v každej štúdií pre každý cyklus boli 4 replikáty poolu so vzorkou s anomáliou T21 a fetálnou frakciou 5 % a 20 replikátov poolu cfDNA od tehotnej ženy s plodom mužského pohlavia (XY) s fetálnou frakciou 10 %. Testovanie sa vykonávalo počas 10 dní a pre kombináciu dvoch štúdií sa celkovo spustilo 21 cyklov.

Na hodnotenie založené na reprezentatívnosti klinických podmienok a komplexite detekcie anomálie sa vybrala trizómia T21 a prítomnosť chromozómu Y. Chromozóm 21, ktorý je najmenším ľudským autozómom, má priamy vplyv na citlivosť detegovania T21 najmä pri nízkych hodnotách fetálnej frakcie, napríklad tých, ktoré sa použili v tejto štúdií. Chromozóm Y, ktorý je prítomný v plazme matky, pochádza výhradne z plodu, a preto sa v danom analytickom teste jednoduchšie deteguje.

Sledovaný priemer a smerodajné odchýlky v skóre LLR pre 21. chromozóm a normalizované chromozomálne hodnoty (NCV) pre chromozóm Y ukazujú, že smerodajná odchýlka (SD) replikátu bola najčastejším zdrojom variability. Odchýlky medzi pracoviskami, nástrojmi a šaržami reagentií boli zdrojom výraznej variability, ako dokladujú rozdiely medzi hodnotami Celkovej SD a SD replikátu, ktoré zobrazujú [Tabuľka 19](#) a [Tabuľka 20](#).

Tabuľka 19 Súhrn zisťovania smerodajných odchýlok (SD) výsledku sekvenovania pri testovaní reprodukovateľnosti na viacerých pracoviskách

Výsledok	N	Priemer	SD replikátu	Celková SD reprodukovateľnosti*
Skóre LLR pre 21. chromozóm	36	34,43	11,36	11,36
NCV pre chromozóm Y	180	190,56	7,96	10,20

* Výsledok zahŕňa variabilitu následkom rozdielneho pracoviska, operátora, cyklu, dňa a replikátu.

Tabuľka 20 Súhrn zisťovania presnosti výsledku pri sekvenovaní v jednom laboratóriu

Výsledok	N	Priemer	SD replikátu	Celková SD v jednom laboratóriu*
Skóre LLR pre 21. chromozóm	48	36,01	9,07	10,25
NCV pre chromozóm Y	240	198,68	7,63	7,82

* Výsledok zahŕňa variabilitu následkom rozdielneho sekvenovacieho prístroja, šarže reagentie, operátora, cyklu, dňa a replikátu.

Na porovnanie presnosti sekvenovania pri teste VeriSeq NIPT Solution v2 (celková smerodajná odchýlka) sa vykonala ďalšia štúdia, pričom sa použil prietokový článok verzie 2.0 a verzie 2.5. V štúdiu sa použili dva typy prietokových článkov (v2.0 a v2.5), tri šarže sekvenovacích súprav, štyri prístrojové systémy a dva cykly sekvenovania na kombináciu, čo vo výsledku znamenalo 48 cyklov na jediné pracovisko. Jeden sekvenovací pool bol pripravený z doštičiek s cfDNA, ktoré boli pripravené manuálne. Súčasťou panela vzoriek boli 4 replikáty poolu so vzorkou s anomáliou T21 a fetálnou frakciou 5 % a 20 replikátov poolu cfDNA od tehotnej ženy s plodom mužského pohlavia (XY) s fetálnou frakciou 10 %. Výsledky tejto štúdie, ktoré uvádza [Tabuľka 21](#) a podporujú predpoklad, že presnosť sekvenovania je rovnaká v prípade použitia prietokového článku v2.0 aj v2.5.

Tabuľka 21 Súhrn výsledkov overovania presnosti pri použití prietokového článku v2.0 verus v2.5

Výsledok	Počet pozorovaní na verziu	Celková SD pre v2.0*	Celková SD pre v2.5*	Štatistický výsledok**
Skóre LLR pre 21. chromozóm	96	9,56	8,44	Štatistický ekvivalent (p-hodnota = 0,25)
NCV pre chromozóm Y	480	7,74	7,38	Štatistický ekvivalent (p-hodnota = 0,38)

* Výsledok zahŕňa variabilitu následkom rozdielneho sekvenovacieho prístroja, šarže reagentie, cyklu, dňa a replikátu.

** Založené na F-teste pre vyváženost' odchýlok (smerodajné odchýlky na druhú, teda rozptyly)

Krížová kontaminácia

Krížová kontaminácia sa vyhodnotila počas pracovného postupu prípravy vzoriek na test VeriSeq NIPT Solution. Pooly plazmy odobratej od žien, ktoré neboli tehotné (XX), a dospelých mužov (XY) boli testované metódou nanosenia v šachovnici na doštičku s 96 jamkami na 4 doštičkách. Pre vzorky od mužov aj žien na doštičke platil počet N = 48 na jednu doštičku, s celkovým počtom 192 vzoriek od žien a 192 vzoriek od mužov. U žiadnej zo vzoriek od žien sa nepreukázalo pokrytie chromozómom Y, čo znamenalo o štatisticky vyššiu hodnotu ako odhadované pozadie. Tento výsledok indikuje, že nedošlo ku kontaminácii mužskými vzorkami v rámci tej istej doštičky. V teste VeriSeq NIPT Solution sa nezistila detegovateľná krížová kontaminácia.

Potenciálne interferujúce látky

Vplyv potenciálne interferujúcich látok sa hodnotil testom VeriSeq NIPT Solution posúdením presnosti analytického testu v prítomnosti interferujúcich látok.

Albumín, bilirubín, hemoglobín a triglyceridy (endogénne) boli naočkované do poolov plazmy od tehotných žien so plodom ženského pohlavia (XX) bez prítomných anomálií. Pre každú testovanú látku sa testovali dve koncentrácie (n = 16 pre každú). Nebola zistená žiadna interferencia ovplyvňujúca presnosť analytického testu.

Tabuľka 22 Potenciálne interferujúce látky (endogénne)

Testovaná látka	Nízka testovaná koncentrácia (mg/ml)	Vysoká testovaná koncentrácia (mg/ml)
Albumín	35	50
Bilirubín	0,01	0,15
Hemoglobín	100	200
Triglyceridy	1,5	5

Prírodné sa vyskytujúca tehotenská genómová DNA (gDNA) v plazme môže tiež potenciálne vplývať na presnosť analytického testu, lebo sa tiež môže extrahovať spolu s cfDNA plodu. Úrovne genómovej DNA pri 1,6, 3,3 a 4,9 ng na vzorku (zodpovedá to 1, 2 a 3 smerodajným odchýlkam nad priemernou očakávanou koncentráciou gDNA po 7 dňoch skladovania plnej krvi¹²) sa pridali do cfDNA extrahovanej z tehotenskej plazmy odobratej tehotným ženám s plodom ženského pohlavia (XX) bez prítomnosti anomálií. Vzorky boli následne testované použitím testu VeriSeq NIPT Solution (n = 16 pre každú koncentráciu). V prípade zvýšených hladín gDNA sa nepozorovala žiadna interferencia ovplyvňujúca presnosť analytického testu.

Testovalo sa dvadsať zložiek liečiv (exogénnych), ktoré by mohli potenciálne interferovať s testom a ktoré sú bežne predpisované počas tehotenstva, podľa EP7-A2 (Testovanie interferencie v klinickej chémii, schválené usmernenia, druhá edícia). 20 potenciálne interferujúcich látok sa skombinovalo do štyroch poolov, boli naočkované do tehotenskej plazmy odobratej tehotným ženám s plodom ženského pohlavia (XX) bez prítomnosti anomálií a boli otestované testom VeriSeq NIPT Solution (N = 16 pre každý pool). V prípade prítomnosti týchto exogénnych látok sa nepozorovala žiadna interferencia ovplyvňujúca presnosť analytického testu.

Tabuľka 23 Potenciálne interferujúce látky (exogénne)

Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 4
Acetaminofén	Difenhydramín	Albuterol	Cetirizín
Acetylcysteín	Erytromycín	Bupropión	Dextrometorfán
Bisoprolol	Guaifenesín	Kofeín	Kyselina L-askorbová
Citalopram	Heparín	Sertralín	Metoprolol
Desloratadín	Lidokaín	Fluorid sodný	Nadolol

Detekčný limit

Detekčný limit (LOD) je definovaný ako úroveň fetálnej frakcie, ktorá zodpovedá 95 % pravdepodobnosti detegovania hľadanej podmienky, napríklad trizómia T21. Na vyhodnotenie limitu LOD testu VeriSeq NIPT Solution v2 pre rôzne bežné podmienky, sa vykonali štúdie a štatistické analýzy.

Pravdepodobnosť detegovania hľadanej podmienky vo vzorke s anomáliou spracovanej testom VeriSeq NIPT Solution v2 primárne závisí od troch faktorov:

- fetálna frakcia,
- hĺbka sekvenovania,
- veľkosť a komplexnosť genómovej oblasti záujmu.

Ak predpokladáme, že hĺbka sekvenovania je konštantná, hľadaná aberácia sa jednoduchšie deteguje vo vzorke s vyšším percentuálnym obsahom fetálnej frakcie ako vo vzorke s nízkym percentuálnym obsahom fetálnej frakcie. Ak naopak predpokladáme, že je konštantná fetálna frakcia, hľadaná aberácia sa jednoduchšie deteguje vo vzorke s vyššou hĺbkou sekvenovania ako vo vzorke s nižšou hĺbkou sekvenovania. A napokon, aberácie v menších alebo zložitejších oblastiach genómu sa detegujú ťažšie ako aberácie vo väčších alebo menej zložitých oblastiach genómu, ak predpokladáme, že fetálna frakcia a hĺbka sekvenovania je konštantná.

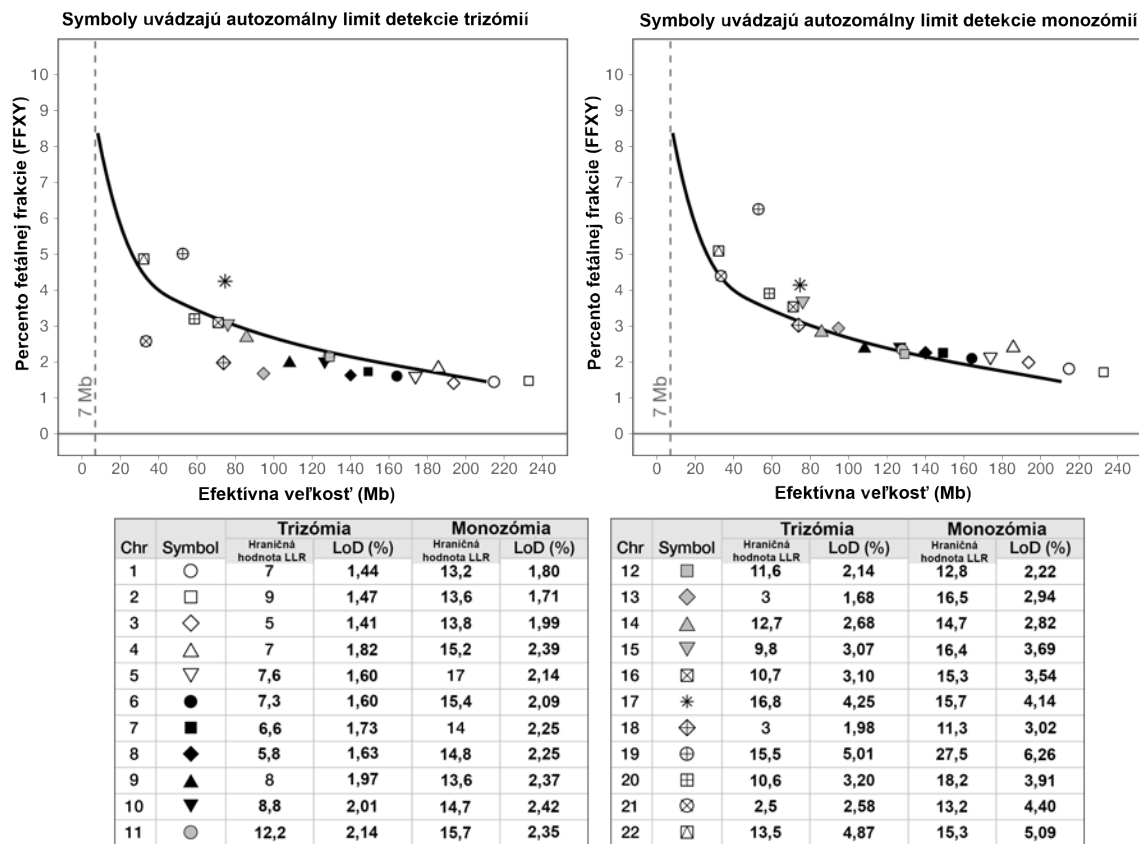
Na určenie limitu LOD pri detegovaní trizómie T21 boli analyzované vzorky pozostávajúce zo zmesi združených vzoriek obsahujúcich T21 a združených vzoriek bez anomálie. Zmiešali sa dva typy analytu v titračných sériách, aby sa vytvorila množina siedmich úrovní fetálnej frakcie (0, 2, 3, 4, 5, 6 a 10 %). Každú úroveň predstavovalo celkom 10 replikátov.

Na ďalšie zvýšenie rozlíšenia mriežky fetálnej frakcie pri analýze LOD sa údaje z tejto štúdie doplnili údajmi zriedenými in silico. Vplyv experimentálneho riedenia a titrácie bol simulovaný riadeným zmiešaním údajov sekvenovania. Údaje o titracii in silico pokrývali množinu 14 úrovní fetálnej frakcie (1,25, 1,50, 1,75, 2,00, 2,25, 2,50, 2,75, 3,00, 3,25, 3,50, 3,75, 4,00, 4,25 a 4,50 %) s 32 replikátmi pre každú úroveň. Na výsledné údaje sa použila analýza využívajúca model probit, aby sa určil limit LOD pre trizómiu T21.

Nezávisle sa vyvinul štatistický model používajúci fetálnu frakciu, hĺbku sekvenovania a veľkosť/komplexnosť genómu na predpovedanie pravdepodobnosti detegovania akejkoľvek aberácie v akejkoľvek vzorke. Tento model bol zostavený z údajov zodpovedajúcich množine 1 405 vzoriek XY. Limit LOD pre trizómiu T21, ktorý predpovedal tento model, bol stanovený, že je v súlade s odhadom založeným na metóde probit opísanej vyššie. Tento štatistický model sa použil na odhad hodnôt LOD pre aneuploidie na všetkých autozómoch a pre čiastočné delécie a duplikácie.

Obrázok 2 zobrazuje 95 % pravdepodobnosť detegovania pre priemerné oblasti usporiadané podľa veľkosti a autozomálneho limitu detegovania pre všetky trizómie a monozómie. Hraničná hodnota CNV LLR – 15,1.

Obrázok 2 95 % pravdepodobnosti detekcie pre priemerné oblasti podľa veľkosti pre test VeriSeq NIPT Solution v2



Riešenie problémov

Riešenie problémov s testom VeriSeq NIPT Solution v2

Režim, ktorý zlyhal	Možný výsledok	Interpretácia	Odporúčaná akcia	Komentáre
Nedostatočné množstvo dodanej plazmy	Zlyhanie kontroly kvality vzorky	Nedostatočný objem plazmy.	Znova odoberte.	Na základe vizuálnej kontroly objemu plazmy.
Zlyhanie skúmavky s krvou	Krv nie je delená na vrstvy	Vzorka nebola odstredená.	Zabezpečte spustenie odstredivky a to, aby bola vzorka odstredená správnymi otáčkami. Znova odoberte vzorku.	
		Nevhodné skladovanie alebo prevoz vzorky (hemolýza vzorky).	Znova odoberte vzorku.	Zmrazené vzorky sa neoddelia. Nevhodné podmienky pri prevoze alebo skladovaní môžu spôsobiť hemolýzu vzorky.

Režim, ktorý zlyhal	Možný výsledok	Interpretácia	Odporúčaná akcia	Komentáre
Vyzrážanie alebo pomalý tok vzorky	Kontaminácia plazmy	Jednotlivé vzorky môžu zaniest doštičku určenú na viazanie, ak je vzorka plazmy výrazne kontaminovaná.	Preskúmajte vzorku. Ak je zostávajúca plazma v skúmavke červená alebo mliečna, zrušte spracovanie vzorky a požiadajte o nové odobratie. Ak vzorka vyzerá v poriadku, znova ju otestujte.	
	Pretečenie vzorky	Nedostatočná vizuálna kontrola vhodnosti vzoriek v každej zo skúmaviek.	Zrušte platnosť akýchkoľvek vzoriek v blízkych jamkách, ktoré boli zasiahnuté pretečením.	Môže to znamenať, že pred spracovaním boli vzorky nesprávne prevážané alebo skladované. Nevhodné vzorky vylúčte zo spracovania.
	Chyba hardvéru	Nedostatočný príjem materiálu počas extrakcie.	Znova otestujte vzorku. Ak v mieste jamky s inými vzorkami problém pretrváva, obráťte sa na oddelenie technickej podpory spoločnosti Illumina.	

Režim, ktorý zlyhal	Možný výsledok	Interpretácia	Odporúčaná akcia	Komentáre
Zlyhanie kontroly kvality pri analýze konkrétnej vzorky	Zlyhanie kontroly kvality sekvenovania	Možné príčiny sú nasledovné: <ul style="list-style-type: none"> • nedostatočné množstvo genetického materiálu, • nesprávny prenos počas manipulácie so vzorkou, • zlyhanie sekvenovacej reagentie. 	Skontrolujte anotáciu k vzorke. Skontrolujte, či nedošlo k podobnému výsledku pri predchádzajúcich vzorkách umiestnených paralelne na doštičke. Znova otestujte vzorku.	Naznačuje, že buď bolo dodané nedostatočné množstvo vzorky, alebo došlo k nesprávnemu prenosu v zariadení ML STAR. Nedostatočné množstvo genetického materiálu môže byť spôsobené nedostatočným obsahom bezbunkovej DNA v plazme alebo DNA pochádzajúcej z bunky, čo spôsobilo, že je vzorka na sekvenovanie príliš zriedená.
	Nízke FF alebo počet nevyklúčených oblastí (NES)	Vygenerovalo sa nedostatočné množstvo údajov na presné vykazovanie.	Znova vykonajte test z plazmy.	

Režim, ktorý zlyhal	Možný výsledok	Interpretácia	Odporúčaná akcia	Komentáre
Zlyhanie kontroly kvality kvantifikácie	Zlyhal cyklus kvantifikácie. Stredná hodnota dávky údajov je pod minimálnou hodnotou	Nedostatočná výťažnosť pri procese.	Zopakujte kvantifikáciu. Ak opakovanie zlyhá, obráťte sa na oddelenie technickej podpory spoločnosti Illumina.	Metriky štandardnej krivky, ktoré nespĺnili podmienky kvality, indikujú buď výskyt problémov s prípravou knižnice (napríklad použitie etanolu v kvalite, ktorá nezodpovedá laboratórnym požiadavkám), alebo problémov s procesom kvantifikácie.
	Zlyhal cyklus kvantifikácie	Zlyhanie štandardnej krivky	Zopakujte kvantifikáciu. Ak opakovanie zlyhá, obráťte sa na oddelenie technickej podpory spoločnosti Illumina.	
Zlyhanie združovania (pooling)	Nepodarilo sa dokončiť združovanie vzoriek	Pri analýze združovania nebolo možné vypočítať správne objemy poolu.	Znova vyhodnoťte koncentráciu cieľového poolu. Znova spustite analýzu združovania (pooling).	

Riešenie problémov so zariadením VeriSeq NIPT Microlab STAR

Krok postupu	Chybový kód	Dialógové okno s chybou	Opis	Používateľské riešenie
Vytvorenie dávky	EM0044	Zadané ID dávky obsahuje chybné znaky.	VeriSeq NIPT Solution v2 akceptuje iba čísla, písmená, znaky podčiarknutia a pomlčky vo všetkých dátových poliach.	Dávku premenujte názvom bez špeciálnych znakov.
Vytvorenie dávky	EM0051	Počet znakov v ID dávky prekročil 36.	Pri teste VeriSeq NIPT Solution v2 je dĺžka názvu dávky obmedzená na 36 znakov a menej.	Premenujte dávku názvom, ktorý obsahuje menej ako 36 znakov.
Vytvorenie dávky	EM0076	Nedá sa pripojiť k serveru VeriSeq Onsite Server v2	VeriSeq Onsite Server v2 neodpovedá na žiadosti o údaje, ktoré mu odosiela aplikácia Workflow Manager.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Overte pripojenie zariadenia ML STAR k sieti. 2. Overte zapnutie servera VeriSeq Onsite Server v2. 3. Overte, či sa zariadenie ML STAR dokáže pripojiť k serveru VeriSeq Onsite Server v2 (cez žiadosť typu ping). 4. Ak sa vám použitím predchádzajúcich krokov nepodarí problém vyriešiť, obráťte sa na oddelenie technickej podpory spoločnosti Illumina.
Vytvorenie dávky	EM0118	Táto dávka zlyhala a nedá sa ďalej spracovávať.	Špecifikovaná dávka už zlyhala a nedá sa ďalej spracovávať.	Záznam o dávke na serveri VeriSeq Onsite Server v2 indikuje, že vybratá dávka zlyhala. Nie je povolené akékoľvek jej ďalšie spracovanie. Použitím požadovaných vzoriek vytvorte inú dávku.

Krok postupu	Chybový kód	Dialógové okno s chybou	Opis	Používateľské riešenie
Vytvorenie dávky	Nepoužíva sa	U tejto dávky sa už dokončilo jej spracovanie. Chcete vykonať opakované združenie?	Určená dávka bola spracovaná použitím združovania. Jediný povolený spôsob spracovania je opakované združenie.	Opakované združenie vykonajte nasledovne. <ul style="list-style-type: none"> • Vyberte možnosť Re-Pool (Združiť znova). • Pred opakovaným združením metódu prerušte a skontrolujte správnosť názvu dávky.
Izolácia plazmy	WP0087	Načítali sa zdvojené čiarové kódy vzoriek.	Do systému sa načítali vzorky s identickými čiarovými kódmi.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pri identifikácii duplikovaných vzoriek postupujte podľa pokynov aplikácie Workflow Manager. 2. Odoberte duplikáty, označte ich nanovo alebo ich nahradte. 3. Znova vložte vzorky.
Izolácia plazmy	EP0102	Vzorky špecifikované v hárku Sample Sheet (Hárok vzoriek) neboli vložené.	Vzorky uvedené v hárku vzoriek neboli súčasťou načítaných čiarových kódov.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pri identifikácii chýbajúcich vzoriek postupujte podľa pokynov aplikácie Workflow Manager. 2. Vykonajte jednu z nasledujúcich možností: <ul style="list-style-type: none"> • Pridajte do dávky chýbajúce vzorky a vzorky vložte znova. • Prerušte metódu, upravte podľa potreby hárok vzoriek. Metódu reštartujte.
Vloženie doštičky	Nepoužíva sa	Chyba masky čiarového kódu Venus	Workflow Manager vynúti priradenie doštičky k dávke pomocou masiek čiarových kódov Venus.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Overte umiestnenie doštičky a potvrdte, že rozloženie doštičky je správne. 2. Skontrolujte, či bola vložená správna doštička pre určenú dávku.

Krok postupu	Chybový kód	Dialógové okno s chybou	Opis	Používateľské riešenie
Extrakcia cfDNA	WE0150	Tlak v podtlakovej komore je príliš nízky.	Workflow Manager nebude pokračovať, ak je detegovaná úroveň tlaku v podtlakovej hadičke < 400 Torrov.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Skontrolujte, či nie je podtlaková hadička zalomená alebo sa na nej nenachádzajú iné obštrukcie. 2. Otvorte svorky na uvoľnenie odpadovej hadičky, umožnite uvoľnenie tlaku a uvoľňovacie svorky hadičky znova uzatvorte. 3. Skontrolujte, či sú ovládač podtlaku a pumpa zapnuté. 4. Skontrolujte fľašu s odpadovým materiálom, ktorý vzniká pri vytváraní podtlaku. Ak je odpadová fľaša naplnená do viac ako polovice, vyprázdňte ju. 5. Ak problém naďalej pretrváva, obráťte sa na oddelenie technickej podpory spoločnosti Illumina.
Extrakcia cfDNA	WE0153	Tlak v podtlakovej komore je príliš vysoký.	Ak je nameraný tlak podtlaku príliš vysoký ešte pred spustením kontroly tlaku, systém pravdepodobne nefunguje správne.	Na zadnej strane ovládača skontrolujte, či sú všetky pripojenia a hadičky podtlaku pevne zaistené.

Krok postupu	Chybový kód	Dialógové okno s chybou	Opis	Používateľské riešenie
Extrakcia cfDNA	WE0996	Tesnenie podtlaku je nedostatočné.	Pred pokračovaním v činnosti sa musí vyriešiť zlyhanie utesnenia.	<p>Overte vyriešenie zlyhania utesnenia a potom vyberte možnosť OK.</p> <ol style="list-style-type: none"> Doštička na viazanie musí byť zarovnaná a v priamom kontakte s rozvádzačom podtlaku. Rukou chránenou rukavicou pevne pritlačte na doštičku na viazanie. Načúvajte zvuku prívodu podtlaku a sledujte tok vody cez doštičku na viazanie. V aplikácii Workflow Manager otvorte zobrazenie sledovania. Keď aktuálna nameraná hodnota tlaku dosiahne aspoň o 50 jednotiek menej, ako tlak okolitého prostredia, vyberte možnosť OK a pokračujte v procese extrakcie cfDNA. Ak sa vo vyhradenom čase nepodarí dosiahnuť požadovanú nameranú hodnotu tlaku, vyberte možnosť OK a pokračujte vo vkladaní prvého lyzátu. Po rozptýlení lyzátu na doštičke na viazanie danú metódu prerušite. Doštičku na viazanie znova usadte a pevne na ňu pritlačte. Ak natečenie lyzátu na doštičku zlyhá, obráťte sa na oddelenie technickej podpory spoločnosti Illumina.

Krok postupu	Chybový kód	Dialógové okno s chybou	Opis	Používateľské riešenie
Extrakcia cfDNA	WM0219	Ak je možnosť podtlaku zapnutá, pumpu uvoľnite manuálne.	Podtlak môže ostať zapnutý po prerušení metódy počas extrakcie.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Na ovládači podtlaku stlačte tlačidlo Power (Napájanie), čím vypnete vytváranie podtlaku. 2. Počkajte 10 sekúnd a znova stlačte tlačidlo Power (Napájanie), čím zapnete vytváranie podtlaku.
Extrakcia cfDNA	EE0477	Pri posúvaní doštičky sa vyskytla chyba. (Chyba iSWAP)	Ak dôjde k chybe iSWAP (spadnutie doštičky, zlyhanie jej zodvihnutia a pod.), systém vás vyzve na dokončenie posunu doštičky manuálne.	<p>Overte, či je možné obnovenie stavu doštičky (žiadnen materiál sa nevyliat).</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ak obnovenie doštičky nie je možné, zrušte cyklus. • Ak je možné doštičku obnoviť, postupujte podľa zobrazených pokynov a prenos doštičky dokončite manuálne.
Extrakcia cfDNA	EE0519	Naskenovaný čiarový kód nie je zhodný s čiarovým kódom doštičky na viazanie v zázname.	Vložená doštička na viazanie nie je v súlade s čiarovým kódom odstránenej doštičky.	Zabezpečte, aby bola vkladaná doštička zhodná so zaznamenaným čiarovým kódom (tento kód nájdete v denníku záznamov).

Krok postupu	Chybový kód	Dialógové okno s chybou	Opis	Používateľské riešenie
API	EA0372	Nepodarilo sa pripojiť k údajovému serveru.	Server VeriSeq Onsite Server v2 neodpovedá na žiadosti o údaje z aplikácie Workflow Manager.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Zabezpečte pripojenie zariadenia ML STAR k sieti. 2. Overte, či je server VeriSeq Onsite Server v2 zapnutý. 3. Skontrolujte, či sa zariadenie ML STAR môže pripojiť k serveru VeriSeq Onsite Server v2 (použitím žiadosti typu ping).
	EA0774	Chyba pripojenia. Pripojenie k serveru API sa nepodarilo overiť.	Server VeriSeq Onsite Server v2 prestal odpovedať na žiadosti o údaje z aplikácie Workflow Manager.	<p>Uistite sa, že:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Zabezpečte pripojenie zariadenia ML STAR k sieti. 2. Skontrolujte, či sa zariadenie ML STAR môže pripojiť k serveru VeriSeq Onsite Server v2 (použitím žiadosti typu ping). 3. Overte, či je server VeriSeq Onsite Server v2 zapnutý.
	EA0780	403: Neplatná žiadosť. Aktuálna transakcia nie je platná.	Odoslané údaje sú v rozpore s logikou pracovného postupu v systéme.	Preskúmajte podrobnosti o chybe, aby ste sa dozvedeli viac. Bežné príčiny zahŕňajú zadané parametre, ktoré sú príliš dlhé alebo obsahujú nepovolené znaky.

Literatúra

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 – 734.
8. Gregg AR, Skotko BG, Benkendorf JL, et al. Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med.* 2016: doi:10.1038/gim.2016.97.
9. Dondorp W, de Wert G, Bombard Y, et al. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy and beyond: challenges of responsible innovation in prenatal screening. *Eur J Hum Genet.* 2015 Nov;23(11):1438-50.
10. Grati, et al. "Fetoplacental mosaicism: potential implications for false-positive and false-negative noninvasive prenatal screening results." *Genetics in Medicine* 16 (2014): 620 – 624.
11. Wellesley, et al. "Rare chromosome abnormalities, prevalence and prenatal diagnosis rates from population-based congenital anomaly registers in Europe." *European Journal of Human Genetics* 20 (2012): 521 – 526.
12. Norton S, Lechner J, Williams T, Fernando M et al. A Stabilizing Reagent Prevents Cell-free DNA Contamination by Cellular DNA in Plasma During Blood Sample Storage and Shipping as Determined by Digital PCR. *Clin. I Biochem.* 2013;46: 1561 – 1565. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2013.06.002.
13. Bianchi D W, et al. "Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing." *Obstet Gynecol* 119 (2012): 890 – 901.
14. Ehrich M, et al. "Genome-wide cfDNA screening: clinical laboratory experience with the first 10,000 cases." *Genet Med* 19 (2017): 1332 – 1337.

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

História revízií

Dokument	Dátum	Opis zmeny
Dokument č. 1000000078751 v09	apríl 2024	<p>Odstránené</p> <ul style="list-style-type: none"> Nadbytočná časť, č. 20030577. Maximálna kapacita skúmavky požadovaná pre skúmavku na odber krvi určenú na odstredenie. <p>Pridané</p> <ul style="list-style-type: none"> Nová časť, č. 20101927 pre server VeriSeq Onsite Server v2. Jednotka určujúca rozmer pre skúmavky na odber krvi s objemom 10 ml. Objasnenie kompatibilných verzií softvéru SoftMax Pro. Objasňujúca poznámka, ktorá upozorňuje na to, že na zabezpečenie vymeniteľnosti v zariadení VeriSeq NIPT Microlab STAR je možné používať iba kompatibilné plastové vybavenie. Poznámka s varovaním ohľadom kontaminácie vzorky prímiesou v časti Interpretácia výsledkov. Upozornenie o tom, že sa nemajú mraziť vzorky plnej krvi odobraté do skúmavky na odber plnej krvi s bezbunkovou DNA od spoločnosti Streck. Upozornenie na to, aby sa zabránilo vystaveniu vzoriek vyšším teplotám. Objasnenie obmedzení analýzy a podmienok opakovateľnosti. Objasnenie prahovej hodnoty CNV LLR na obrázku č. 2 v časti Detekčný limit. <p>Aktualizované</p> <ul style="list-style-type: none"> Odkaz na nádobku na reagentie od spoločnosti Illumina, ktorá je kompatibilná k nádobke spoločnosti Roche, a pridanie nového čísla dielu. Katalóg Thermo Fisher Multifuge X4 Pro-MD, č. dielu 75016034. Upozornenie na to, že nekonzistentné objemy v jamkách môžu spôsobiť, že vzorky nespĺnia podmienky kontroly kvality. Odkaz na príbalové letáky k prístrojom
Dokument č. 1000000078751 v08	august 2022	<p>Aktualizácia čísla dielu pracovného postupu</p> <p>Odstránil sa pokyn pipetovania s cieľom zmiešania, ak bola doštička s knižnicou zmrazená.</p>

Dokument	Dátum	Opis zmeny
Dokument č. 1000000078751 v07	máj 2022	<p>Rozdelenie obmedzení postupu vo výkaze k testu VeriSeq NIPT Solution v2 a zahrnutie prvých dvoch odrážok. Ponechanie textu v novej hlavičke s názvom Obmedzenia analýzy.</p> <p>Odstránené</p> <ul style="list-style-type: none"> Názov VeriSeq zo všetkých označení reagencií. Nalepenie čiarového kódu na platničku adaptéra VeriSeq NIPT v časti o príprave knižníc. <p>Pridané</p> <ul style="list-style-type: none"> Slovo „certifikovaná“ k opisu použitia vody bez obsahu DNázy/RNázy. Jedna z nasledujúcich čítačiek mikrotitračných doštičiek, alebo ekvivalentná a SpectraMax M2, M3, M4, M5 a poznámka. Do časti o zariadení VeriSeq NIPT Microlab STAR sa pridalo vysvetlenie, čo robiť pri udalosti riešenia chyby. Poznámka o vizuálnej kontrole jamiek. Pokyny pre dávky s 24 a 48 vzorkami do jednotlivých častí protokolu. Kroky opisujúce, kedy použiť fialovú doštičku s adaptérmi alebo ekvivalentnú. Veta, ktorá hovorí, že do demografických údajov a charakteristík tehotenstva sa majú pridať výsledky z prvého trimestra tehotenstva. Odrážka pridaná k špecifikáciám doštičky s hlbokými jamkami, ktorou sa zahŕňa podmienka rámu odolného voči torzným silám. <p>Aktualizované</p> <ul style="list-style-type: none"> Podmienka, ktorá hovorí o jedinečnosti názvov dávok kvôli presnosti ich použitia a je priložený aj príklad. Symboly a formátovanie poznámok, upozornení a varovaní. Výsledky pododrážok pre test. Guanidínium tiokyanát sa zmenil na guanidínium chlorid. CVS sa zmenil na BVS (Basic Vacuum System, základný systém podtlaku) Upozornenie na použitie celogenómového skrínungu a skóre LLR. Špecifikácie: Špecifikácie nádobky na reagencie, doštičky s hlbokými jamkami, doštičky s 384 jamkami, doštičky s 96 jamkami

Dokument	Dátum	Opis zmeny
Dokument č. 1000000078751 v06	august 2021	Aktualizovala sa adresa autorizovaného zástupcu v EÚ.
Dokument č. 1000000078751 v05	december 2020	<p>Aktualizované princípy pre postup, varovania a preventívne opatrenia a časti venované označeniam produktov s dodatočným objasnením na splnenie regulačných požiadaviek. Drobné aktualizácie obsahu v protokole, aby bol v súlade s aktuálnym štýlom spoločnosti Illumina a organizáciou.</p> <p>Opravil sa opis 21. chromozómu ako „druhého najmenšieho ľudského autozómu“ na „najmenšieho ľudského autozómu“ v časti Presnosť analýzy.</p> <p>Pridali sa upozornenia na riešenie nesprávneho používania zásobníkov a na riziká fúzie vzoriek do častí Izolácia plazmy a Interpretácia výsledkov.</p> <p>Pridali sa nové čísla dielov serverov a softvéru pre vydanie nového modelu servera a aktualizovali sa čísla dielov softvéru.</p> <p>Pridali sa upozornenia na protokol a riešenie problémov, aby sa vyriešili pretečenia vzoriek a podarilo sa tejto chybe predchádzať.</p> <p>Aktualizovali sa aktívne látky v štandarde kvantifikácie DNA do opisu balenia s príslušenstvom, aby boli v súlade s kartou bezpečnostných údajov.</p> <p>Aktualizovali sa konvencie pre pomenovávanie modulu Local Run Manager VeriSeq NIPT, aby sa zabezpečila konzistencia s inou dokumentáciou.</p> <p>Pridala sa história revízií.</p>
Dokument č. 1000000078751 v04	október 2020	Drobné opravy.
Dokument č. 1000000078751 v03	september 2020	Aktualizoval sa zoznam materiálu, aby sa zahrnuli aktuálne špecifikácie laboratórnych pomôcok spolu s uvedením známych kompatibilných verzií.

Dokument	Dátum	Opis zmeny
Dokument č. 1000000078751 v02	február 2020	Aktualizovala sa prezentácia informácií o klinickom výkone, aby boli lepšie pokryté rozdiely medzi typmi základného skrínungu a skrínungu celého genómu. Pridali sa nové rozdiely v presnosti medzi základným skrínungom a skrínungom celého genómu. Odstránili sa rozporuplné informácie o voliteľnosti doplnkovej správy do časti Zásady postupu. Aktualizoval sa spôsob pomenovania softvéru VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 v celom dokumente, aby sa dosiahla štylistická konzistencia. Aktualizovalo sa označenie adres spoločnosti Illumina v Austrálii a v Holandsku, aby obsahovali najnovšie zmeny.
Dokument č. 1000000078751 v01	august 2019	Odstránil sa zdvojený krok v časti Extrakcia cfDNA, ktorý spôsobila chyba softvéru pri publikovaní.
Dokument č. 1000000078751 v00	máj 2019	Úvodné vydanie.

Patenty a ochranné známky

Tento dokument a jeho obsah sú vlastníctvom spoločnosti Illumina, Inc. a jej pridružených spoločností (ďalej len „Illumina“) a sú určené výlučne na zmluvné použitie u zákazníka v súvislosti s používaním výrobku (výrobkov) opísaného (opísaných) v tomto dokumente a na žiadny iný účel. Tento dokument ani jeho obsah sa nesmú používať ani šíriť na žiadny iný účel a/alebo inak poskytovať, zverejňovať alebo reprodukovať akýmkoľvek spôsobom bez predchádzajúceho písomného súhlasu spoločnosti Illumina. Spoločnosť Illumina týmto dokumentom neposkytuje žiadnu licenciu na základe patentu, ochrannej známky, autorských práv alebo práv podľa zvykového práva, či podobných práv tretích strán.

Pokyny v tomto dokumente musia byť prísne a výslovne dodržiavané kvalifikovaným a riadne vyškoleným personálom, aby sa zabezpečilo správne a bezpečné používanie tu opísaného výrobku (výrobkov). Pred použitím takéhoto výrobku (výrobkov) je nutné prečítať si celý obsah tohto dokumentu s porozumením.

NEPREČÍTANIE VŠETKÝCH POKYNOV TU OBSIAHNUTÝCH A ICH VÝSLOVNÉ NEDODRŽANIE MÔŽE MAŤ ZA NÁSLEDOK POŠKODENIE VÝROBKU (VÝROBKOV), ZRANENIE OSOBY VRÁTANE POUŽÍVATEĽOV ALEBO INÝCH OSÔB, POŠKODENIE ĎALŠIEHO MAJETKU A ZRUŠENIE PLATNOSTI ZÁRUKY VZŤAHUJÚCEJ SA NA VÝROBKOV (VÝROBKOVY).

SPOLOČNOSŤ ILLUMINA NEPREBERÁ ŽIADNU ZODPOVEDNOSŤ VYPLYVAJÚCU Z NESPRÁVNEHO POUŽITIA TU OPÍSANÝCH PRODUKTOV (VRÁTANE DIELOV ALEBO SOFTVÉRU).

© 2024 Illumina, Inc. Všetky práva vyhradené.

Všetky ochranné známky sú vlastníctvom spoločnosti Illumina, Inc. alebo príslušných vlastníkov. Informácie o konkrétnych ochranných známkach nájdete na stránke www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktné informácie



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 USA
+1 800 809 ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (okrem Severnej Ameriky)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Austrálsky zadávateľ
Illumina Australia Pty Ltd
Nursing Association Building
Level 3, 535 Elizabeth Street
Melbourne, VIC 3000
Austrália

Označenie produktu

Úplné informácie o symboloch, ktoré sa môžu nachádzať na obale a označení produktu, nájdete vo vysvetlivkách symbolov súpravy na stránke support.illumina.com na karte *Documentation* (Dokumentácia).

Súhrn parametrov bezpečnosti a výkonu (SSP, Summary of Safety and Performance) sa nachádza na stránke <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> po spustení Európskej databázy zdravotníckych pomôcok (Eudamed). Je prepojený so základným identifikátorom UDI-DI (0081627002NIPTRP).