

# Informativni pregled za VeriSeq NIPT Solution v2

ZA IN VITRO DIJAGNOSTIKU

## Namjena

VeriSeq NIPT Solution v2 je *in vitro* dijagnostički test namijenjen za upotrebu kao test za probir, odnosno prepoznavanje genetskih anomalija kod fetusa na razini genoma iz uzoraka periferne pune krvi trudnih žena u najmanje 10. gestacijskom tjednu. VeriSeq NIPT Solution v2 koristi sekvenciranje cijelog genoma za prepoznavanje djelomičnih dupliciranja i delecija za sve autosome i statusa aneuploidije za sve kromosome. Test nudi mogućnost da se ispita aneuploidija spolnih kromosoma (SCA). Taj se proizvod ne smije koristiti kao isključiv temelj za dijagnozu ili druge odluke o upravljanju trudnoćom.

VeriSeq NIPT Solution v2 obuhvaća sljedeće: VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 za VeriSeq NIPT Microlab STAR, komplete VeriSeq NIPT Sample Prep Kit i VeriSeq Onsite Server v2 sa softverom VeriSeq NIPT Assay Software v2. VeriSeq NIPT Solution v2 namijenjen je za upotrebu s instrumentom za sekvenciranje nove generacije.

## Sažetak i objašnjenje analize

Fetalne abnormalnosti kromosoma, posebno aneuploidija što je abnormalan broj kromosoma, čest su slučaj reproduktivnog neuspjeha, urođenih anomalija, zaostajanja u razvoju i mentalnih poteškoća. Aneuploidija pogađa oko 1 u 300 poroda živorođenčadi, a puno je veća učestalost povezana sa spontanim pobačajima i rođenjem mrtvorođenčadi.<sup>1,2</sup> Donedavno su postojale dvije vrste prenatalnih testova za takve poremećaje: dijagnostičko testiranje ili probir. Dijagnostičko testiranje obuhvaća invazivne postupke kao što su amniocenteza ili biopsija korionskih resica. Te metode testiranja smatraju se zlatnim standardom za prepoznavanje fetalne aneuploidije. No, oni su povezani s rizikom od gubitka trudnoće između 0,11 % i 0,22 %.<sup>3</sup> Uobičajeni probiri s većim brojem markera ne nose opasnost od gubitka trudnoće jer su neinvazivni, ali su i manje pouzdani od dijagnostičkih testova. Njihova uspješnost prepoznavanja za trisomiju 21 varira između 69 i 96 %, ovisno o određenom probiru, dobi majke i gestacijskoj dobi prilikom testiranja.<sup>4</sup> Što je još važnije, oni imaju oko 5 % lažno pozitivnih prepoznavanja, što može povući za sobom invazivno dijagnostičko testiranje radi potvrde, a, time i rizik od gubitka trudnoće uzrokovanog postupkom.<sup>4</sup> I ultrazvučnim se pregledima mogu otkriti anomalije kromosoma, ali uz još manju pouzdanost nego prethodno navedene metode.

Fetalna aneuploidija za kromosome 21, 18, 13, X i Y može se prepoznati uz visoku razinu točnosti neinvazivnim prenatalnim testiranjem (noninvasive prenatal testing, NIPT) pomoću sekvenciranja cijelog genoma DNA bez stanica (cfDNA) dobivene iz plazme majke u gestacijskoj dobi od 10 tjedana ili većoj. Nedavna metaanaliza više kliničkih ispitivanja pokazala je da su ponderirane razine prepoznavanja na skupovima i specifičnosti za trisomiju 21 i trisomiju 18 kod jednoplodnih trudnoća sljedeće: trisomija 21 99,7 % i 99,96 % te trisomija 18 97,9 % i 99,96 %.<sup>5</sup> Jedno je ispitivanje pokazalo da upotreba NIPT-a kao primarnog probira za sve trudnoće može dovesti do 89-postotnog smanjenja broja potvrđenih invazivnih postupaka.<sup>6</sup>

Imajući u vidu znatno smanjenje lažno pozitivnih rezultata NIPT-a u usporedbi s uobičajenim probirom po više markera, brojne profesionalne medicinske organizacije izdale su priopćenja kojima podržavaju nekoliko indikacija za upotrebu NIPT-a.

Točnije, Međunarodno društvo za prenatalnu dijagnozu (International Society for Prenatal Diagnosis), Američki koledž opstetričara i ginekologa (American College of Obstetricians and Gynecologists, ACOG) / Društvo za majčinsku fetalnu medicinu (Society for Maternal Fetal Medicine, SMFM), Američki koledž medicinske genetike i genomike (American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG) i Europsko društvo humane genetike (European Society of Human Genetics) / Američko društvo humane genetike (American Society of Human Genetics) podržavaju NIPT za sve trudnice.<sup>7,8,9</sup> Preporučuju se savjetovanje prije testiranja, informirani pristanak i dijagnostičko testiranje radi potvrđivanja pozitivnih rezultata cfDNA probira.<sup>4</sup>

VeriSeq NIPT Solution v2 neinvazivni je in vitro dijagnostički (IVD) test koji koristi sekvenciranje fragmenata cfDNA na razini cijelog genoma dobivenog iz uzoraka majčinske periferne pune krvi uzete od trudnica gestacijske dobi najmanje 10 tjedana. Taj test nudi dvije vrste probira: osnovni i na razini genoma. Osnovni probir nudi informacije o stanju aneuploidije samo za kromosome 21, 18, 13, X i Y. Probiri na razini genoma prepoznaju djelomična dupliranja i delecije za sve autosome i stanje aneuploidije za sve kromosome. Obje vrste probira nude mogućnost izvješćivanja o aneuploidiji spolnih kromosoma (sex chromosome aneuploidy, SCA) s otkrivanjem spola fetusa ili bez njega. Mogućnost izvješćivanja za SCA može se isključiti. Ako je mogućnost izvješćivanja za SCA isključena, ne otkriva se ni spol fetusa. Da biste saznali više o mogućnostima izvješćivanja o spolu, pogledajte *Vodič za softver VeriSeq NIPT Solution v2 (broj dokumenta: 100000067940)*.

## Načela postupka

VeriSeq NIPT Solution v2 automatizirano je rješenje za NIPT testiranje u laboratoriju koje se sastoji od automatizirane pripreme uzoraka i analize podataka dobivenih sekvenciranjem. Kompleti za pripremu uzoraka uz VeriSeq NIPT specijalizirani su reagensi za jednokratnu upotrebu koji se koriste s platformom VeriSeq NIPT Microlab STAR za pripremu serija od 24, 48 ili 96 uzoraka za sekvenciranje nove generacije. Specijalizirani softver VeriSeq NIPT Assay Software v2 analizira podatke o cijelom genomu s uparenim krajevima te se generira izvješće koje sadrži kvantitativne rezultate.

Tijek rada sastoji se od sljedećih postupaka: prikupljanja uzoraka, izolacije plazme, izdvajanja cfDNA, pripreme biblioteke, kvantifikacije biblioteke, stvaranja skupova za biblioteku te sekvenciranja i analize, koji su ovdje detaljnije opisani:

- ▶ **Prikupljanje uzoraka** – uzima se 7 – 10 ml majčinske periferne pune krvi u epruvete Streck cell-free DNA Blood Collection Tube (BCT) koje sprječavaju lizu stanica i genomsku kontaminaciju uz stabilizaciju pune krvi.
- ▶ **Izolacija plazme** – unutar 5 dana od prikupljanja plazma se izolira iz majčinske periferne pune krvi pomoću standardnih tehnika centrifuge. VeriSeq NIPT Microlab STAR aspirira i raspoređuje plazmu na pločicu s 96 dubokih jažica radi daljnje obrade. U slučaju potrebe za ponovnim testiranjem, uzorke je moguće nakon obrade ponovno zatvoriti i pohraniti na 4 °C dodatnih 5 dana (ukupno najviše 10 dana nakon uzimanja krvi).



### OPREZ

Premašivanje prethodno spomenutog vremena skladištenja može negativno utjecati na broj neuspjelih analiza pojedinačnih uzoraka.

- ▶ **Izdvajanje cfDNA** – pročišćavanje cfDNA od plazme postiže se adsorpcijom na pločici za povezivanje, pranjem pločice za povezivanje radi uklanjanja kontaminanata i ispiranjem.
- ▶ **Priprema biblioteke** – pročišćeni fragmenti cfDNA prolaze kroz postupak popravka krajeva kako bi se 5' i 3' prevjesi pretvorili u „tupe“ krajeve. Zatim se krajevima 3' dodaje dioksiadenozin nukleotid radi stvaranja prevjesa od jedne baze. Indeksirani adapteri koji sadrže prevjes od jedne baze 3' deoksitimidina zatim se ligacijom dodaju na obrađene fragmente cfDNA. Ligacijom dobivena DNA pročišćava se pomoću reverznih imobilizacijskih zrnaca u krutoj fazi. Svaki uzorak u skupu od njih 24, 48 ili 96 dobiva jedinstveni indeksirani adapter. Adapteri imaju 2 svrhe:
  - ▶ Indeksi omogućuju prepoznavanje uzoraka prilikom slijednog sekvenciranja.
  - ▶ Adapteri indeksa sadrže sekvence koje omogućuju fiksiranje biblioteke na tvrdj površini protočnog članka za sekvenciranje radi generiranja klastera i slijednog sekvenciranja.
- ▶ **Kvantifikacija** – proizvod biblioteke kvantificira se pomoću fluorescentne boje u koncentraciji određenoj prema usporedbi sa standardnom krivuljom DNA.
- ▶ **Stvaranje skupova za biblioteku i sekvenciranje** – biblioteke uzorka stavljaju se zajedno u skupove od 24 ili 48 uzoraka u prilagođenim količinama radi svođenja varijacija u pokrivenosti na najmanju moguću mjeru. Svaki se skup zatim sekvencira pomoću instrumenta za sekvenciranje nove generacije.
- ▶ VeriSeq NIPT Solution v2 ne obuhvaća opremu ni potrošni materijal za sekvenciranje.
- ▶ **Analiza** – za svaki se uzorak analiza sastoji od sljedećeg:
  - ▶ Identifikacija fragmenata biblioteke prema sekvenci indeksa i poravnanju uparenih krajeva očitava se u usporedbi s humanim referentnim genomom.

- ▶ Fetalna frakcija biblioteke određuje se kombiniranjem informacija iz raspodjela dužina i genomskih koordinata fragmenata biblioteke.
- ▶ Nakon uzimanja u obzir poznatih utjecaja, statistički model prepoznaje regije genoma koje su ispodprosječno ili iznadprosječno zastupljene u biblioteci na način dosljedan s anomalijom na utvrđenoj razini fetalne frakcije.
- ▶ NIPT izvješće nudi sažetak rezultata za odabrani testni izbornik pri čemu se uz rezultat fetalne frakcije za uzorke koji su prošli kontrolu kvalitete navodi ANOMALY DETECTED (Anomalija otkrivena) ili NO ANOMALY DETECTED (Anomalija nije otkrivena).
- ▶ Dodatno izvješće nudi kvantitativne mjerne podatke koji karakteriziraju prepoznatu anomaliju.

## Ograničenja postupka

- ▶ VeriSeq NIPT Solution v2 je test za probir i ne smije se promatrati izdvojeno od drugih kliničkih saznanja i rezultata testiranja. Zaključci o stanju fetusa i odluke o upravljanju trudnoćom ne smiju se temeljiti samo na rezultatima NIPT probira.<sup>7</sup>
- ▶ VeriSeq NIPT Solution v2 izvješćuje o sljedećem:
  - ▶ Osnovni probir testira iznadprosječnu reprezentaciju kromosoma 13, 18 i 21.
  - ▶ Probir na razini genoma testira ispodprosječnu i iznadprosječnu reprezentaciju svih autosoma, uključujući djelomične delecije i dupliciranja veličine najmanje 7 Mb.
  - ▶ Kad se u jednoplodnih trudnoća odabere Yes (Da) ili SCA kao mogućnost izvješćivanja o spolu, mogu se prepoznati sljedeće anomalije spolnih kromosoma: XO, XXX, XXY i XYY.
  - ▶ Kad se u jednoplodnih trudnoća odabere Yes (Da) kao mogućnost izvješćivanja o spolu, otkriva se spol fetusa.
  - ▶ Prisutnost kromosoma Y u blizanačkim trudnoćama.
- ▶ Dokazi o osjetljivosti i specifičnosti testa pokrivaju jednoplodne i blizanačke trudnoće. U ovim se uputama za upotrebu ne navode podaci o osjetljivosti ili specifičnosti za trojke ni druge višeploidne trudnoće.
- ▶ VeriSeq NIPT Solution v2 nije namijenjen prepoznavanju poliploidija, primjerice triploidije.
- ▶ VeriSeq NIPT Solution v2 nije namijenjen prepoznavanju uravnoteženih preraspodjela kromosoma.
- ▶ Za ovu su analizu potrebni uzorci majčine periferne pune krvi trudnica gestacijske dobi najmanje 10 tjedana.
- ▶ U slučaju osnovnih probira test VeriSeq NIPT Solution v2 traži specifične abnormalnosti kromosoma. Rezultati koji se objavljuju kao NO ANOMALY DETECTED (Nije otkrivena anomalija) ne uklanjaju mogućnost kromosomskih abnormalnosti testiranih kromosoma. Negativan rezultat ne uklanja mogućnost da u trudnoći postoje druge kromosomske abnormalnosti, genetske bolesti ili prirođeni anomalije (npr. anomalija otvorene neuralne cijevi).
- ▶ Kod probira na razini genoma velike delecije i dupliciranja koji veličinom ne premašuju 75 % veličine kromosoma mogu biti indikativni za aneuploidiju cijelog kromosoma.
- ▶ Kod probira na razini genoma određene su regije izuzete iz analize. Popis takvih regija na „crnoj listi“ dostupan je na web-mjestu službe za podršku tvrtke Illumina. Prepoznavanje genomskih abnormalnosti provodi se samo nad regijama koje nisu izuzete.
- ▶ Izvješćivanje o spolu fetusa nije dostupno u svim regijama zbog lokalnih odredbi koje se tiču određivanja spola.
- ▶ Rezultati testa mogu biti ograničeni određenim majčinskim i fetalnim čimbenicima, uključujući – bez ograničenja – sljedeće:
  - ▶ nedavne transfuzije krvi u majke
  - ▶ transplantacija organa u majke
  - ▶ kirurški zahvat na majci
  - ▶ imunoterapija majke ili terapija matičnim stanicama
  - ▶ malignitet u majke
  - ▶ majčinski mozaicizam
  - ▶ fetoplacentalni mozaicizam
  - ▶ smrt fetusa u maternici
  - ▶ apsorpcija jednog od blizanaca u maternici

## Komponente proizvoda

VeriSeq NIPT Solution v2 (broj dijela 20030577) sastoji se od sljedećih kompleta za pripremu uzoraka:

- ▶ VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (24 samples) (broj dijela: 20025895)
- ▶ VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (48 samples) (broj dijela: 15066801)
- ▶ VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (96 samples) (broj dijela: 15066802)

VeriSeq NIPT Solution v2 (broj dijela 20030577) sastoji se od sljedećih softverskih komponenti:

- ▶ VeriSeq NIPT Assay Software v2 (broj dijela 20047024), unaprijed instaliran na VeriSeq Onsite Server v2
  - ▶ VeriSeq Onsite Server v2 (broj dijela 20028403 ili 20047000) ili postojeći VeriSeq Onsite Server (broj dijela 15076164 ili 20016240) nadograđen na v2
- ▶ VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 (broj dijela 20044988), unaprijed instaliran na VeriSeq NIPT Microlab STAR
  - ▶ VeriSeq NIPT Microlab STAR (broj dijela: Hamilton Company Reno: 95475-01 (115V) i 95475-02 (230V), Hamilton Company Bonaduz: 806288)
- ▶ Modul Local Run Manager VeriSeq NIPT (broj dijela 20044989)

## Reagensi

### Priloženi reagensi

Illumina prilaže sljedeće reagense: VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (24 samples) (broj dijela: 20025895), VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (48 samples) (broj dijela: 15066801) i VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (96 samples) (broj dijela: 15066802). Kompleti VeriSeq NIPT Sample Prep Kit konfigurirani su za upotrebu s platformom ML STAR (broj dijela: 95475-01, 95475-02 ili 806288), koja je proizvod tvrtke Hamilton Company.

### Priprema uzoraka uz VeriSeq NIPT, kutija za izdvajanje

Tablica 1 VeriSeq NIPT Extraction Box (24) i (48), broj dijela: 20025869 i 15066803

Naziv reagensna na naljepnici	Broj spremnika u kompletu	Aktivni sastojci	Skladištenje
Pufer za liziranje	1	Gvanidin-hidroklorid u puferiranoj vodenoj otopini	od 15 °C do 30 °C
Wash Buffer I	1	Gvanidin-hidroklorid i 2-propanol u puferiranoj vodenoj otopini	od 15 °C do 30 °C
Wash Buffer II	1	Puferirana vodena otopina koja sadrži soli	od 15 °C do 30 °C
Pufer za ispiranje	1	Puferirana vodena otopina	od 15 °C do 30 °C
Pufer s proteinazom	1	Glicerol u puferiranoj vodenoj otopini	od 15 °C do 30 °C
Proteinase K	3	Liofilizirana proteinaza K	od 15 °C do 30 °C

Tablica 2 VeriSeq NIPT Extraction Box (96), broj dijela: 15066807

Naziv reagensna na naljepnici	Broj spremnika u kompletu	Aktivni sastojci	Skladištenje
Pufer za liziranje	1	Gvanidin-hidroklorid u puferiranoj vodenoj otopini	od 15 °C do 30 °C
Wash Buffer I	1	Gvanidin-hidroklorid i 2-propanol u puferiranoj vodenoj otopini	od 15 °C do 30 °C
Wash Buffer II	2	Puferirana vodena otopina koja sadrži soli	od 15 °C do 30 °C
Pufer za ispiranje	1	Puferirana vodena otopina	od 15 °C do 30 °C
Pufer s proteinazom	1	Glicerol u puferiranoj vodenoj otopini	od 15 °C do 30 °C
Proteinase K	4	Liofilizirana proteinaza K	od 15 °C do 30 °C

## Priprema uzoraka uz VeriSeq NIPT, kutija za pripremu biblioteke

Tablica 3 VeriSeq NIPT Library Prep Box (24) i (48), broj dijela: 20026030 i 15066809

Naziv reagensa na naljepnici	Broj spremnika u kompletu	Aktivni sastojci	Skladištenje
End Repair Mix	1	DNA polimeraza i dNTP-ovi u puferiranoj vodenoj otopini	od –25 °C do –15 °C
A-Tailing Mix	1	DNA polimeraza i dATP u puferiranoj vodenoj otopini	od –25 °C do –15 °C
Ligation Mix	1	DNA ligaza u puferiranoj vodenoj otopini	od –25 °C do –15 °C
Pufer za hibridizaciju	1	Puferirana vodena otopina	od –25 °C do –15 °C
VeriSeq NIPT DNA Adapter Plate	1	Oligonukleotidi u puferiranoj vodenoj otopini	od –25 °C do –15 °C

Tablica 4 VeriSeq NIPT Library Prep Box (96), broj dijela: 15066810

Naziv reagensa na naljepnici	Broj spremnika u kompletu	Aktivni sastojci	Skladištenje
End Repair Mix	1	DNA polimeraza i dNTP-ovi u puferiranoj vodenoj otopini	od –25 °C do –15 °C
A-Tailing Mix	2	DNA polimeraza i dATP u puferiranoj vodenoj otopini	od –25 °C do –15 °C
Ligation Mix	2	DNA ligaza u puferiranoj vodenoj otopini	od –25 °C do –15 °C
Pufer za hibridizaciju	1	Puferirana vodena otopina	od –25 °C do –15 °C
VeriSeq NIPT DNA Adapter Plate	1	Oligonukleotidi u puferiranoj vodenoj otopini	od –25 °C do –15 °C

## Priprema uzoraka uz VeriSeq NIPT, kutija za dodatnu opremu

Tablica 5 VeriSeq NIPT Accessory Box, broj dijela 15066811

Naziv reagensa na naljepnici	Broj spremnika u kompletu	Aktivni sastojci	Skladištenje
Pločica za povezivanje DNA	1	Propilenska mikropločica s modificiranom silikonskom membranom	od 2 °C do 8 °C
Pufer za resuspendiranje	1	Puferirana vodena otopina	od 2 °C do 8 °C
Zrnca za pročišćavanje uzorka	1	Paramagnetska zrnca u krutoj fazi u puferiranoj vodenoj otopini	od 2 °C do 8 °C
Reagens za kvantifikaciju DNA-a	1	Interkalirajuća boja za DNA u DMSO-u	od 2 °C do 8 °C
Standard kvantifikacije DNA	1	dsDNA, standardni, u puferiranoj vodenoj otopini	od 2 °C do 8 °C

## Priprema uzorka, epruvete i naljepnice za tijek rada za VeriSeq NIPT

Tablica 6 Epruvete i naljepnice za tijek rada, broj dijela: 15071543

Naziv stavke na naljepnici	Broj stavki u kompletu	Skladištenje
Naljepnica (LBL) – barkod pločice	9	od 15 °C do 30 °C
Naljepnica (LBL) – barkod pločice s dubokim jažicama	12	od 15 °C do 30 °C
Epruveta (TB) – prazna epruveta za skupljanje	5	od 15 °C do 30 °C

## Reagensi koji nisu priloženi

### Obavezni reagensi koji nisu priloženi

- ▶ Obavezni reagensi i potrošna oprema za sekvenciranje nužni za sustav za sekvenciranje nove generacije (next-generation sequencing, NGS).
- ▶ Voda bez DNaze/RNaze
- ▶ Etanol, 100-postotni (razine 200), kvalitete za upotrebu u molekularnoj biologiji



#### NAPOMENA

Etanol koji nije kvalitete namijenjene upotrebi u molekularnoj biologiji može negativno utjecati na izvedbu analize.

### Neobavezni reagensi koji nisu priloženi

- ▶ Dulbeccova fosfatom puferirana fiziološka otopina (DPBS) za negativnu kontrolu (NTC)

## Skladištenje i rukovanje

- 1 Sobna je temperatura definirana kao temperatura od 15 °C do 30 °C.
- 2 Svi reagensi namijenjeni su isključivo jednokratnoj upotrebi. Kad se reagensi pripreme za upotrebu, moraju se odmah upotrijebiti.
- 3 Ako su bilo koje pakiranje ili sadržaj komponenti za VeriSeq NIPT Solution oštećeni ili načeti, obratite se službi za korisnike tvrtke Illumina.
- 4 Reagensi su stabilni kad se skladište kako je navedeno do datuma isteka roka trajanja navedenog na naljepnicama na kompletima. Uvjete skladištenja potražite u stupcu Skladištenje u tablicama u dokumentu *Priloženi reagensi na stranici 4*. Ne koristite reagensne kojima je istekao rok trajanja.
- 5 Promjene fizičkog izgleda reagensa mogu upućivati na propadanje materijala. Ako se primijete promjene u fizičkom izgledu (npr. očite promjene boje reagensa ili vidljiva zamućenost uz kontaminaciju mikrobima), reagensne nemojte upotrebljavati.
- 6 Pridržavajte se sljedećih najboljih primjera iz prakse dok rukujete zrnima za pročišćavanje uzoraka.
  - ▶ Nikad ne zamrzavajte zrnca.
  - ▶ Prije upotrebe zrnaca pričekajte da poprime sobnu temperaturu.
  - ▶ Neposredno prije upotrebe promiješajte zrnca dok ne budu dobro suspenzirana i boja se čini homogena.
- 7 Lysis Buffer, Wash Buffer I, Wash Buffer II, Elution Buffer i Proteinase Buffer mogu stvarati vidljive taloge ili kristale. Prije upotrebe energično ih promiješajte, a zatim vizualno provjerite ima li taloga.
- 8 Nikad ne zamrzavajte punu krv nakon prikupljanja.
- 9 Sekvencirajte biblioteke što prije nakon stvaranja skupova. Biblioteke sa stvorenim skupovima stabilne su najviše 7 dana na temperaturi od –25 °C do –15 °C. Nije nužna dodatna denaturizacija ako su skladištene to vremensko razdoblje u tim uvjetima.

## Oprema i materijal

### Obavezna oprema i materijal koji nisu priloženi

#### Oprema koja je obavezna, a ne dolazi s proizvodom

Oprema	Dobavljač
Jednokanalne pipete od 20 µl	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Jednokanalne pipete od 200 µl	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Jednokanalne pipete od 1000 µl	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Držač za pipete	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Hladnjak, od 2 °C do 8 °C	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Zamrzivač, od –25 °C do –15 °C	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Mikrocentrifuga	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Vrtložna miješalica	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Sklop centrifuge i rotora za epruvete za prikupljanje krvi	
Preporučeno:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Centrifuga iz serije Allegra X12R, 1600 g</li> <li>Allegra Centrifuge GH-3.8 Rotor sa spremnicima</li> <li>Allegra Centrifuge Bucket Covers, komplet od dva komada</li> <li>Allegra Centrifuge Adapter Assembly, 16 mm, komplet od četiri komada</li> </ul>	Beckman Coulter, broj artikla 392304 (120 V ili 230 V) Beckman Coulter, broj artikla 369704 Beckman Coulter, broj artikla 392805 Beckman Coulter, broj artikla 359150
Ekvivalent:	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
<ul style="list-style-type: none"> <li>Hlađena centrifuga ubrzanja do 1600 × g bez mogućnosti kočenja</li> <li>Njišući rotor sa spremnicima</li> <li>Umetci za spremnike kapaciteta 24, 48, ili 96 epruveta, minimalna dubina 76 mm</li> <li>Umetak za držanje 16 epruveta od 100 mm za prikupljanje krvi</li> </ul>	
Sklop centrifuge i rotora za mikropločice	
Preporučeno:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Sorvall Legend XTR Centrifuge</li> <li>HIGHPlate 6000 Microplate Rotor</li> <li>Bilo koja od sljedeće dvije potporne baze za mikropločice:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>MicroAmp 96-Well Support Base</li> <li>96-Well PCR Plate Carrier</li> </ul> </li> </ul>	Thermo Fisher Scientific, kataloški broj 75004521 (120 V) ili kataloški broj 75004520 (230 V) Thermo Fisher Scientific, kataloški broj 75003606 Thermo Fisher Scientific, kataloški broj 4379590 Thermo Fisher Scientific, kataloški broj AB-0563/1000
Ekvivalent:	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
<ul style="list-style-type: none"> <li>Centrifuga ubrzanja do 5600 × g</li> <li>Rotor s njišućim pladnjem s nosačima pladnjeva s 96 jažica, minimalna dubina 76,5 mm</li> <li>Potporna baza za mikropločice</li> </ul>	
Jedan od sljedećih čitača mikropločica (fluorometar) sa softverom SoftMax Pro v6.2.2 ili novijim:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Gemini XPS</li> <li>SpectraMax M2</li> </ul>	Molecular Devices, broj dijela XPS Molecular Devices, broj dijela M2
SpectraMax High-Speed USB, serijski prilagodnik	Molecular Devices, broj dijela 9000-0938

Oprema	Dobavljač
<p>Ciklički termostat sljedećih specifikacija:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Grijani poklopac</li> <li>Temperaturni raspon od 4 °C do 98 °C</li> <li>Temperaturna preciznost ± 2 °C</li> <li>Minimalni korak pojačavanja 2 °C/s</li> <li>Kompatibilan s pločicom Twin.tec PCR Plate 96-well, punog profila</li> </ul>	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
VeriSeq NIPT MicroLab STAR	Hamilton, broj dijela 95475-01 (115 V), broj dijela 95475-02 (230 V) ili broj dijela 806288 (za Hamilton Company Bonaduz)
<p>Sustav za sekvenciranje (NGS) nove generacije sa sljedećim mogućnostima:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>sekvenciranje 2 x 36 bp s uparenim krajevima</li> <li>kompatibilnost s prilagodnicima s dvostrukim indeksom za pripremu uzoraka uz VeriSeq NIPT</li> <li>automatsko generiranje .BCL datoteka</li> <li>dvokanalna kemija</li> <li>400 milijuna čitanja uparenih krajeva po obradi</li> <li>kompatibilnost sa softverom VeriSeq NIPT Assay Software v2</li> </ul> <p>ili sustavom za sekvenciranje NextSeq 550Dx.</p>	Dobavljač instrumenta ili Illumina, broj dijela 20005715
<p>Ako se koristi sustav za sekvenciranje NextSeq 550Dx:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5, 75 cycles</li> </ul>	Illumina, broj dijela 20028870
VeriSeq Onsite Server v2 ili nadograđeni VeriSeq Onsite Server	Illumina, broj dijela 20028403 ili 20047000 (v2) ili 15076164 ili 20016240 (nadograđeno)

### Neobavezna oprema, nije priložena

Oprema	Dobavljač
Pluggo Decapper System	LGP Consulting, broj dijela 4600 4450
pločica za potvrđivanje fluorescencije SpectraMax SpectraTest FL1	Molecular Devices, broj dijela 0200-5060
Tube Revolver/Rotator, epruvete od 15 ml, 40 okr./min, 100 – 240 V	Thermo Scientific, kataloški broj 88881001 (SAD) ili kataloški broj 88881002 (EU)

### Obavezan materijal koji nije priložen

Potrošni materijal	Dobavljač
Vodljivi nesterilni vrhovi filtra kapaciteta 1000 µl	Hamilton, broj dijela 235905
Vodljivi nesterilni vrhovi filtra kapaciteta 300 µl	Hamilton, broj dijela 235903
Vodljivi nesterilni vrhovi filtra kapaciteta 50 µl	Hamilton, broj dijela 235948
<p>Spremnik s dubokim jažicama sljedećih specifikacija:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Format mikropločice SLAS 1-2004 s 96 jažica s piramidalnim ili konusnim dnom minimalnog kapaciteta 240 ml</li> <li>Polipropilen s preferencijom za slabo vezanje DNA za sve kontaktne površine uzorka.</li> <li>Interne dimenzije (razina tekućine) kompatibilne su s koracima automatizirane aspiracije i punjenja uređaja VeriSeq NIPT MicroLab STAR.</li> <li>Dimenzije visine kompatibilne su s automatiziranim kretanjima uređaja VeriSeq NIPT MicroLab STAR.</li> </ul>	<p>Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora</p> <p>Kompatibilni spremnici:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Corning Axygen, broj proizvoda RES-SW96-HP-SI</li> <li>Agilent, broj proizvoda # 201246-100</li> </ul>



Potrošni materijal	Dobavljač
Posuda s reagensima sa sljedećim specifikacijama: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Posuda koja pristaje u nosač uređaja VeriSeq NIPT Microlab STAR sa suženim dnom i minimalnim kapacitetom od 20 ml.</li> <li>• Propilen bez RNaze/DNaze.</li> <li>• Interne dimenzije (razina tekućine) kompatibilne su s koracima automatizirane aspiracije i punjenja uređaja VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Dimenzije visine kompatibilne su s automatiziranim kretanjima uređaja VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> </ul>	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora  Kompatibilne posude: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Roche, broj proizvoda 03004058001</li> </ul>
Pločice s dubokim jažicama sa sljedećim specifikacijama: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Format mikropločice SLAS 1-2004, 3-2004 i 4-2004 s 96 jažica s piramidalnim ili konusnim dnom minimalnog kapaciteta jažice 2 ml.</li> <li>• Polipropilen s preferencijom za slabo vezanje DNA za sve kontaktne površine uzorka i okvir otporan na torziju.</li> <li>• Dimenzije jažica (razina tekućine) kompatibilne su s koracima automatizirane aspiracije i punjenja uređaja VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Dimenzije visine pločice kompatibilne su s automatiziranim kretanjima uređaja VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> </ul>	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora  Kompatibilne pločice: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Eppendorf, broj dijela 0030505301</li> <li>• Eppendorf, broj dijela 30502302</li> <li>• USA Scientific, broj dijela 1896-2000</li> </ul>
Pločica s 384 jažica i sljedećim specifikacijama: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mikropločica s 384 jažica optimizirana za male zapremine s minimalnim kapacitetom jažice 50 µl.</li> <li>• Polistiren s blokiranjem svjetlosti i slabim vezanjem DNA za sve kontaktne površine uzorka.</li> <li>• Dimenzije jažica (razina tekućine) kompatibilne su s koracima automatizirane aspiracije i punjenja uređaja VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Dimenzije visine pločice kompatibilne su s automatiziranim kretanjima uređaja VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> </ul>	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora  Kompatibilne pločice: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Corning, broj proizvoda 3820</li> </ul>
Pločica s 96 jažica i sljedećim specifikacijama: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mikropločica s okvirom otpornim na torziju i 96 jažica sa suženim dnom, povišenim rubovima i minimalnim kapacitetom jažice 150 µl.</li> <li>• Polipropilen bez RNaze/DNaze sa slabim vezanjem DNA za sve kontaktne površine uzorka.</li> <li>• Dimenzije jažica (razina tekućine) kompatibilne su s koracima automatizirane aspiracije i punjenja uređaja VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Dimenzije visine pločice kompatibilne su s automatiziranim kretanjima uređaja VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> </ul>	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora  Kompatibilne pločice: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Eppendorf, broj dijela 0030129512</li> <li>• Eppendorf, broj dijela 30129580</li> <li>• Eppendorf, broj dijela 30129598</li> <li>• Eppendorf, broj dijela 30129660</li> <li>• Eppendorf, broj dijela 30129679</li> <li>• BioRad, broj dijela HSP9601</li> </ul>
Jedan od sljedećih zatvarača: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Folija Microseal 'F'</li> <li>• Zatvarači od folije</li> </ul>	Bio-Rad, kataloški broj MSF1001 Beckman Coulter, broj artikla 538619
DNA BCT CE bez stanica	Streck, kataloški broj 218997
Utisni čepovi	Sarstedt, broj narudžbe 65.802
Epruvete od 2 ml s navojnim čepovima	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Vrhovi za pipete s filtrom od 20 µl za pipetu od 20 µl	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Vrhovi za pipete s filtrom od 200 µl za pipetu od 200 µl	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Vrhovi za pipete s filtrom od 1000 µl za pipetu od 1000 µl	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Serološke pipete od 25 ml	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Serološke pipete od 10 ml	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora

Potrošni materijal	Dobavljač
Preporučeno: Deconex® SOLARSEPT Deconex® 61 DR	Borer Chemie AG
Ekvivalent: Sprej za brzu dezinfekciju na bazi alkohola Otopina deterdženta za dezinfekciju	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora

### Neobavezan materijal koji nije priložen

Potrošni materijal	Dobavljač
Epruveta, čep s navojem, 10 ml (samo za kontrolne uzorke)	Sarstedt, broj narudžbe 60.551
Epruveta, čep s navojem, 50 ml	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora

## Prikupljanje, transport i pohrana uzoraka



### OPREZ

Svim uzorcima rukujte kao da su potencijalno zarazne tvari.

- 1 Uzorci pune krvi od 7 – 10 ml moraju se prikupiti u Streck Cell-Free DNA BCT.
- 2 Transport pune krvi mora se provesti u skladu sa svim primjenjivim odredbama koje se odnose na transport etioloških tvari. Preporučuju se žurne metode transporta/otpreme.
- 3 Tijekom transporta čuvajte na temperaturi između 4 °C i 30 °C. Nakon primitka uzoraka skladištite na temperaturi od 2 °C do 8 °C do trenutka nastavka obrade. Vrijeme između prikupljanja krvi i prvotne izolacije plazme ne smije premašiti 5 dana.
- 4 U slučaju potrebe za ponovnim testiranjem, uzorke je moguće nakon obrade ponovno zatvoriti i pohraniti na 4 °C dodatnih 5 dana (ukupno najviše 10 dana nakon uzimanja krvi).



### OPREZ

Premašivanje prethodno spomenutog vremena skladištenja može negativno utjecati na broj neuspjelih analiza pojedinačnih uzoraka.

## Upozorenja i mjere opreza

- ▶ Ova analiza sadrži reagens Proteinase K. Uslijed udisanja, gutanja te dodira s kožom i očima može doći do tjelesnih ozljeda. Upotrebljavajte u dobro prozračenom prostoru, nosite zaštitnu odjeću, izbjegavajte udisanje prašine i bacite u otpad sve spremnike i neiskorišten sadržaj u skladu s primjenjivim državnim sigurnosnim standardima.
- ▶ Ova analiza sadrži gvanidinijev klorid. Uslijed udisanja, gutanja te dodira s kožom i očima može doći do tjelesnih ozljeda. Upotrebljavajte u dobro prozračenom prostoru, nosite zaštitnu odjeću i bacite u otpad sve spremnike i neiskorišten sadržaj u skladu s primjenjivim lokalnim državnim sigurnosnim standardima.
- ▶ Ova analiza sadrži zapaljivu kemikaliju 2-propanol. Držite je podalje od topline i otvorenog plamena. Uslijed udisanja, gutanja te dodira s kožom i očima može doći do tjelesnih ozljeda. Upotrebljavajte u dobro prozračenom prostoru, nosite zaštitnu odjeću i bacite u otpad sve spremnike i neiskorišten sadržaj u skladu s primjenjivim lokalnim državnim sigurnosnim standardima.
- ▶ Ova analiza sadrži dimetilni sulfoksid, korozivnu i zapaljivu tekućinu. Uslijed udisanja, gutanja te dodira s kožom i očima može doći do tjelesnih ozljeda. Upotrebljavajte u dobro prozračenom prostoru, nosite zaštitnu odjeću i bacite u otpad sve spremnike i neiskorišten sadržaj u skladu s primjenjivim lokalnim državnim sigurnosnim standardima.
- ▶ Da biste spriječili stvaranje štetnih plinova, ne bacajte otpad nakon izdvajanja cfDNA (koji sadrži gvanidin tiocijanat) s otpadom koji sadrži izbjeljivač (natrijev hipoklorit).
- ▶ Svim uzorcima rukujte kao da sadrže potencijalno zarazne tvari.

- ▶ Pridržavajte se laboratorijskih mjera opreza. Nemojte pipetirati ustima. Nemojte jesti, piti ni pušiti u označenim prostorima za rad. Koristite rukavice za jednokratnu upotrebu i laboratorijske kute kada rukujete uzorcima i reagensima za analizu. Ruke temeljito operite nakon rukovanja uzorcima i reagensima za analizu.
- ▶ Ne koristite komponente analize nakon datuma isteka valjanosti navedenog na naljepnici na pakiranju analize. Ne upotrebljavajte komponente iz analiza iz drugih serija. Serije analiza navedene su na naljepnici na pakiranju analize. Pohranite komponente analize na navedenoj temperaturi.
- ▶ Da biste spriječili degradaciju uzorka ili reagensa, prije pokretanja protokola provjerite jesu li se sva isparavanja natrijeva hipoklorita posve izvjetrila.
- ▶ Nepridržavanje navedenih procedura može rezultirati netočnim rezultatima ili znatnim smanjenjem kvalitete uzoraka.
- ▶ Sve ozbiljne incidente povezane s ovim proizvodom odmah prijavite tvrtki Illumina i nadležnim tijelima država članica u kojima borave korisnik i pacijent.
- ▶ Informacije o zaštiti okoliša, zdravlju i sigurnosti potražite u sigurnosno-tehničkom listu (SDS-u) na web-mjestu [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).

## Napomene povezane s postupkom

### Izbjegavanje kontaminacije

- ▶ Koristite nove vrhove i nov potrošni materijal i laboratorijsko posuđe.
- ▶ Koristite vrhove otporne na aerosol da biste smanjili opasnost od prijenosa i unakrsne kontaminacije uzoraka.
- ▶ Zbog moguće kontaminacije, posebno pazite da sadržaj jažica ostane posve u njima. Pazite da sadržaj ne prska. Centrifugirajte nakon svakog koraka miješanja.
- ▶ Pratite primjenjive odredbe za odgovarajuće laboratorijske prakse i higijenu prilikom rukovanja krvlju i krvnim proizvodima.
- ▶ Prilikom pripreme biblioteke ne koristite sprejeve s izbjeljivačem u aerosolu. Kontaminacija izbjeljivačem u tragovima može rezultirati neuspjehom analizom.

### Čišćenje platforme VeriSeq NIPT Microlab STAR

- ▶ Prije upotrebe pregledajte je li platforma čista. Najmanje jednom tjedno napravite tjedno održavanje i slijedite ove upute za čišćenje.
- ▶ Uklonite sve uklonjive nosače, očistite ih sprejem za hitru dezinfekciju na bazi alkohola (Deconex® SOLARSEPT ili sličan) i ostavite da se osuše. Ako su jako prljavi, nakon toga ih ostavite da se namaču u otopini deterdženta za dezinfekciju (tekućina za čišćenje Deconex® 61 DR ili slično), isperite sredstvom za dezinfekciju na bazi alkohola i ostavite da se osuše.
- ▶ Otvorite prednji poklopac i obrišite platformu krpom natopljenom sredstvom Deconex® SOLARSEPT (ili sličnim). Posebno se mora provjeriti čistoća kliznih blokova.
- ▶ Uklonite CVS granu i očistite granu, brtvu i unutrašnje odjeljke CVS-a krpom.
- ▶ Ispraznite otpadne vrhove kutije CORE 96-head i nezavisnog kanala.
- ▶ Uklonite pločicu za izbacivanje vrhova nezavisnog kanala na stanici za otpadne vrhove i očistite je: nasprejajte Deconex® SOLARSEPT (ili slično sredstvo) izravno na površinu i obrišite. Navucite novu plastičnu vrećicu na okvir i ponovno je pričvrstite. Vratite na mjesto čistu pločicu za izbacivanje vrhova.
- ▶ Nasprejajte Deconex® SOLARSEPT (ili slično sredstvo) izravno na površinu kutije za otpad i tunela CORE 96-head i očistite je.
  - ▶ Ako je teško ukloniti naslage s kutija za otpadne vrhove, brišite ih krpom namočenom vodom bez DNaze/RNaze dok se naslage ne uklone. Na odgovarajući način bacite krp u otpad. Nastavite tako da sterilizirate kutiju sredstvom za dezinfekciju na bazi alkohola.

- ▶ Navlažite krpu koja ne ostavlja niti ili štapić s vatom 70-postotnim etanolom. Prebrišite prozor laserskog skenera na čitaču barkoda. Pomoću iste krpe ili štapića očistite svaku jažicu CPAC adaptera za pločice. Ako koristite krpu, utisnite je u svaku jažicu adaptera pomoću olovke da biste bili sigurni da je unutrašnjost jažice temeljito očišćena.
- ▶ Očistite nezavisne kanale:
  - ▶ Na nezavisnim kanalima očistite rukav za izbacivanje vrhova (vanjski dio kanala za pipetiranje) krpom koja ne ostavlja niti natopljenom sprejem Deconex® SOLARSEPT (ili sličnim sredstvom) (pogledajte *Referentni priručnik za Hamilton Microlab STAR, broj 15070074*).
  - ▶ Očistite disk za zaustavljanje i prstenove glave za pipetiranje (vanjski dio kanala za pipetiranje) krpom koja ne ostavlja niti natopljenom sprejem Deconex® SOLARSEPT (ili sličnim sredstvom).
- ▶ Očistite kutiju CORE 96-head:
  - ▶ Koristeći istu krpu koja ne ostavlja niti natopljenu sprejem Deconex® SOLARSEPT (ili sličnim sredstvom) očistite kućište kutije 96-head i podnožje diskova za zaustavljanje.
  - ▶ Koristeći istu krpu ili komad krpe u obliku trake natopljene sprejem Deconex® SOLARSEPT (ili sličnim sredstvom) prođite krpom oko bočnih dijelova kanala za pipetiranje kutije 96-head da biste očistili prstenove. Ponovite taj postupak za sve kanale za pipetiranje na kutiji 96-head.
- ▶ Nasprejajte prednji i stražnji poklopac sprejem Deconex® SOLARSEPT (ili sličnim sredstvom) i osušite krpom.
- ▶ Očistite zaštitnu vrpcu automatskog umetanja krpom natopljeom sprejem Deconex® SOLARSEPT (ili sličnim sredstvom) i lagano obrišite bez pritiskanja.
- ▶ Kad se platforma i komponente posve osuše, zamijenite nosače.



#### NAPOMENA

Nepravilno čišćenje i održavanje platforme ML STAR može rezultirati unakrsnom kontaminacijom i lošom djelotvornošću analize.

## Kontrola kvalitete

Možda će se testirati kontrolni materijal s poznatim karakteristikama radnih svojstava radi određivanja razlika u obradi i tehničkih postupaka u laboratoriju.



#### NAPOMENA

Obrada kontrolnog uzorka ili kontrole bez predloška smanjuje ukupan broj nepoznatih majčinskih uzoraka koji se mogu obrađivati pomoću svakog kompleta za pripremu uzoraka.

Nemojte koristiti više od dva NTC uzorka po seriji od 24 ili 48 uzoraka ili četiri NTC uzorka po seriji od 96 uzoraka.

## Upute za upotrebu

### Savjeti i tehnike

Ako u protokolu nije navedena točka sigurnog prekidanja, odmah prijedite na sljedeći korak.

#### Označavanje pločica barkodovima

- Barkodovi za pločice pune širine počinju s PL.
- Barkodovi za pločice s dubokim jažicama počinju s DW.
- Stavite barkodove na pločice pune širine i one s dubokim jažicama na stranu uz stupac 12.
- Umećite pločice s barkodom okrenutim desno da biste omogućili automatsko skeniranje.

## Brtvljenje i odbrtvljivanje pločice


- ▶ Uvijek zabrtvite pločicu s 96 jažica prije prijelaza na sljedeće korake u protokolu:
  - ▶ koraci centrifuge
  - ▶ koraci temeljnog cikliranja.
- ▶ Da biste zabrtvili pločicu, stavite ljepljivi pokrov na pločicu i zatim ga zabrtvite.
- ▶ Prije odbrtvljivanja:
  - ▶ Kratko centrifugirajte pločicu s 96 jažica na 1000 × g u trajanju 20 sekundi.
  - ▶ Stavite pločicu na ravnu površinu prije nego što polako uklonite brtvu.

## VeriSeq NIPT Microlab STAR

- ▶ Prije upotrebe napravite i dokumentirajte obavezno održavanje u skladu s uputama proizvođača.
- ▶ Promatrajte ML STAR tijekom automatiziranih koraka. Pratite sučelje softvera VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 radi upita i uputa za rukovatelja.
- ▶ Tijekom rada držite na mjestu prednji poklopac.
- ▶ Neka platforma bude prazna tijekom rada.
- ▶ Tijekom koraka vakuumiranja pločice, ako to od vas zatraži VeriSeq NIPT Workflow Manager v2, ručno formirajte brtvu između pločice i vakuumske grane.
- ▶ Omogućite da sustav automatski baci u otpad vrhove s adaptera. Nemojte ručno uklanjati vrhove ako to softver od vas ne zatraži.
- ▶ Uklonite potrošene reagense i potrošni materijal kad to Workflow Manager od vas zatraži.
- ▶ Svakodnevno praznite velike staklene boce vakuumnog otpada. Prva velika staklena boca nikad ne smije biti puna više od polovice. Preljev vakuumnog otpada može oštetiti vakuumsku pumpu i oslabiti vakuum koji sustav primjenjuje.

## Obrada uzoraka

### Postupak

- 1 Izvedite sljedeće korake za svaki alikvot:
    - a Centrifugirajte uzorke označene barkodom na 1600 × g u trajanju 10 minuta pri 4 °C s isključenom kočnicom.
    - b Kad se centrifuga posve zaustavi, uklonite epruvete s uzorcima.  
Nakon centrifugiranja počnite s izolacijom plazme unutar 15 minuta. Ako prođe više od 15 minuta, ponovite centrifugiranje.
  - 2 Pregledajte svaku epruvetu da biste utvrdili prikladnost uzorka, uključujući potvrdu sljedećeg:
    - ▶ Zapremina uzorka odgovara očekivanju.
    - ▶ Uzorak se pravilno razdvojio tijekom centrifugiranja.
    - ▶ Razina plazme je najmanje 1,5 ml iznad koncentrata eritrocita bez sloja leukocita i trombocita ("buffy coat").
    - ▶ Da uzorak nije dostatno hemoliziran (tj. plazma izgleda tamnocrveno).
    - ▶ Da uzorak nije lipemičan (npr. plazma je izgleda mutno ili mliječno i neprozirno).
    - ▶ Da uzorak ne sadrži ugruške.
-  **OPREZ**  
Uzorci koji su nepravilno skladišteni ili je njima nepravilno rukovano mogu postati neprikladni. Ako se u tijeku rada obrade neprikladni uzorci, oni mogu začepiti pločicu za vezivanje tijekom izdvajanja, što pak može uzrokovati prelijevanja uzoraka u susjedne jažice.
- 3 Skinite čep s epruveta pa ih postavite na nosače epruveta. Umetnite sve uzorke i sve kontrole za plazmu za tu seriju.

## Izoliranje plazme

### Priprema

- 1 Označite 1 pločicu s dubokim jažicama Intermediate Plasma i nalijepite barkod.
- 2 Označite 1 pločicu s dubokim jažicama Final Plasma i nalijepite barkod.



#### OPREZ

Pripazite da koristite odgovarajuću pločicu za pločice Intermediate Plasma i Final Plasma. Korištenje rezervoara s dubokim jažicama umjesto pločice s dubokim jažicama može dovesti do amalgamacije uzoraka i posljedično do netočnih rezultata.

### Postupak

- 1 Otvorite AppLauncher pa odaberite **VeriSeq NIPT Method**.
- 2 Unesite ID serije i korisničko ime pa odaberite **OK** (U redu).  
ID serije ograničen je na 26 znakova. Upotrebljavajte samo brojeve, slova, podvlake ( ) ili crtice (-).  
Npr.: 2025-10-16\_Serija3.
- 3 Odaberite **New Batch** (Nova serija).
- 4 Nakon inicijalizacije odaberite **OK** (U redu) da biste pokrenuli izolaciju plazme.
- 5 Izvedite neki od sljedećih koraka:
  - Da biste učitali postojeći list s uzorcima koji ste prije stvorili, odaberite list s uzorcima povezan sa serijom pa odaberite **OK** (U redu).
  - Da biste nastavili bez odabira lista s uzorcima, odaberite **No Sample Sheet** (Bez lista s uzorcima).Da biste saznali više o stvaranju lista s uzorcima ili postavljanju zadanih vrijednosti, pročitajte *Vodič za softver VeriSeq NIPT Solution v2 (broj dokumenta: 100000067940)*.



#### NAPOMENA

Vrsta uzorka – jednoplodni ili blizanački – mora se točno zabilježiti za svaki uzorak da bi se osigurala odgovarajuća analiza podataka.

Ako odaberete No Sample Sheet (Bez lista s uzorcima), provjerite da ste postavili zadane vrijednosti uzoraka u servisnim alatima Workflow Manager.

- 6 Odaberite veličinu serije pa **OK** (U redu).
- 7 Odaberite broj kontrola bez predloška (no template controls, NTC-ovi) pa **OK** (U redu).



#### NAPOMENA

NTC utori uvijek su zadnji odabrani utori. Primjerice, ako imamo dva NTC-a u obradi s 24 uzorka, položaji 23 i 24 su NTC-ovi.

- 8 Provjerite da su svi barkodovi nalijepljeni, a zatim umetnite uzorke, vrhove i pločice (s barkodom okrenutim desno) na nosač. Odaberite **OK** (U redu) nakon svakog upita prilikom umetanja.

Veličina serije uzorka	Vrsta nosača	Staza	Stavka	Položaj
24, 48, 96	vrh	7 – 12	vrhovi od 1000 µl	5
			vrhovi od 1000 µl (samo serija 96)	4, 5
	epruveta	15	pripremljene epruvete s uzorcima krvi 1 – 24 (za serije svih veličina)	1 – 24
	epruveta	16	pripremljene epruvete s uzorcima krvi 25 – 48 (samo za serije veličine 48 i 96)	25 – 48
	epruveta	17	pripremljene epruvete s uzorcima krvi 49 – 72 (samo za serije veličine 96)	49 – 72
	epruveta	18	pripremljene epruvete s uzorcima krvi 73 – 96 (samo za serije veličine 96)	73 – 96
	Multiflex	19 – 24	prazna pločica s dubokim jažicama, Final Plasma – s barkodom	4
	Multiflex	19 – 24	prazna pločica s dubokim jažicama, Intermediate Plasma – s barkodom	5
	reagens	47	[neobavezno] DPBS za kontrolu bez predloška	5

- 9 Provjerite jesu li nosači, laboratorijsko posuđe i reagensi pravilno umetnuti pa odaberite **OK** (U redu) na zaslonu za provjeru valjanosti platforme za predcentrifugu.
- 10 Promatrajte ML STAR dok izvodi automatizirane korake.
- 11 Kad to od vas zatraži softver Workflow Manager, provjerite da na platformi za umetanje ML STAR nema nikakvih prepreka kako bi ML STAR mogao izvaditi nosače.
- 12 Odaberite **Unload** (Isprazni) da biste ispraznili platformu.
- 13 Uklonite pločicu duboke posude s međuplazmom.
- Provjerite je li u svakoj jažici na pločici isti volumen (nije bilo pogrešaka prilikom pipetiranja). Očekivan je volumen 1000 µl.
  - Zabilježite sve nedosljednosti i zapišite ih po dovršetku postupka izolacije plazme.
  - Zabrtvite pločicu, umetnite s balansom i centrifugirajte na 5600 × g u trajanju 10 minuta s isključenom kočnicom ili na najnižoj postavci.
- 14 Odaberite **Yes** (Da) da biste nastavili na finalnu pripremu plazme.
- 15 Uklonite pečat pločice pa je ponovno postavite na nosač.

Veličina serije uzorka	Vrsta nosača	Staza	Stavka	Položaj
24, 48, 96	Multiflex	19 – 24	Pločica s dubokim jažicama Intermediate Plasma	5

- 16 Potvrdite okvir **Intermediate Plasma plate has been spun** (Pločica Intermediate Plasma je centrifugirana) pa odaberite **OK** (U redu).
- 17 Promatrajte ML STAR dok izvodi automatizirane korake.
- 18 Kad to od vas zatraži softver Workflow Manager, provjerite da na platformi za umetanje ML STAR nema nikakvih prepreka kako bi ML STAR mogao izvaditi nosače.
- 19 Odaberite **Unload** (Isprazni) da biste ispraznili platformu.
- 20 Kada Workflow Manager to zatraži, ispraznite nosače i platformu.
- 21 Uklonite ploču dubokih jažica s konačnom plazmom.
- 22 Provjerite sljedeće na pločici:
- ▶ Da je u svakoj jažici isti volumen. Očekivani je volumen 900 µl.
  - ▶ Ima li vidljivih staničnih peleta.
  - ▶ Je li nastupila prekomjerna hemoliza.

Ako zamijetite vidljive abnormalne stanične pelete ili prekomjernu hemolizu, na kraju metode izolacije plazme poništite zahvaćeni uzorak ili koristite upravitelj serije. Dodatne informacije o upravitelju serije potražite u dokumentu *Vodič za softver VeriSeq NIPT Solution v2 (dokument br. 100000067940)*.

- 23 Kad Workflow Manager to od vas zatraži, odaberite **OK** (U redu).
- 24 Unesite komentare o zahvaćenim jažicama pa odaberite **OK** (U redu).
- 25 Izvedite neki od sljedećih koraka.
  - Da biste nastavili s izdvajanjem cfDNA, odaberite **Yes** (Da).
  - Da biste zaustavili postupak, odaberite **Exit** (Izlaz).

### TOČKA SIGURNOG PREKIDANJA

U slučaju prekidanja zatvorite pločicu za konačnu plazmu i uskladištite je na temperaturi od 2 °C do 8 °C najviše 7 dana.

## Izdvajanje cfDNA

### Priprema

- 1 Vizualno pregledajte kutije za izdvajanje i kutije s dodatnom opremom da biste se uvjerali da kompletu nije istekao rok trajanja.
- 2 Pripremite sljedeće reagense. Označite spremničke posude i spremnike s dubokim jažicama nazivima reagensa.

Stavka	Skladištenje	Upute
Pločica s dubokim jažicama Final Plasma	od 2 °C do 8 °C	Ako je bila prethodno uskladištena, ostavite je 30 minuta da poprimi sobnu temperaturu. Centrifugirajte na 1000 x g u trajanju 20 sekundi. Prije upotrebe odbrtvite pločicu s dubokim jažicama Final Plasma.

- 3 Polako dodajte 3,75 ml pufera proteinaze u svaku bočicu s proteinazom K.
  - ▶ Pripremite 3 bočice za 24 i 48 uzorka.
  - ▶ Pripremite 4 bočice za 96 uzorka.
- 4 Začepite bočice s proteinazom K i promiješajte u miješalici radi ponovnog suspendiranja.



### OPREZ

Nemojte kontaminirati gumeni stoper. Ako na stoper dospiju druge tvari, kontaminirat će se budući uzorci.

- 5 Sakupite pripremljenu proteinazu K iz svih bočica u posudu s reagensom i označite ih kao proteinazu K.
- 6 U svaku bočicu za reagens s puferom Wash Buffer II dodajte 100 ml 100-postotnog EtOH.
  - ▶ Pripremite 1 bocu za 24 i 48 uzoraka.
  - ▶ Pripremite 2 boce za 96 uzoraka.
- 7 Preokrenite bočice s puferom Wash Buffer II radi miješanja.
- 8 Potvrdite okvire na bočicama s puferom Wash Buffer II.
- 9 Označite 1 novu pločicu pune širine s Intermediate i nalijepite barkod pločice.
- 10 Označite 1 novu pločicu pune širine s Ispiranje cfDNA i nalijepite barkod pločice.
- 11 Označite 1 novu pločicu s dubokim jažicama s Izdvajanje Intermediate i nalijepite barkod pločice s dubokim jažicama.
- 12 Nalijepite barkod pločice na pločicu za povezivanje DNA.
- 13 Pripremite otopinu za čišćenje od 70-postotnog etilnog alkohola (70 % EtOH, 30 % vode bez DNaze/RNaze) za čišćenje vakuuskog sustava.
- 14 Pripremite vakuuski sustav.
  - a Uklonite vakuusku granu i očistite 70-postotnim etilnim alkoholom.
  - b Ispraznite vakuuski otpad.
  - c Provjerite je li vakuuski sustav platforme ML STAR uključen.

Nemojte čistiti brtvu etilnim alkoholom jer on može učiniti taj materijal krivim.



## Postupak

- 1 Odaberite **OK** (U redu) da biste pokrenuli izdvajanje cfDNA.
- 2 Ako metoda VeriSeq NIPT Method nije već otvorena:
  - a Otvorite AppLauncher i odaberite **VeriSeq NIPT Method**.
  - b Unesite ID serije i korisničko ime pa odaberite **OK** (U redu).
- 3 Na sljedeći način umetnite vrhove na nosače vrhova pa odaberite **OK** (U redu).

Veličina serije uzorka	Vrsta nosača	Staza	Stavka	Položaj
24	vrh	1 – 6	vrhovi od 1000 µl	1
		7 – 12	vrhovi od 300 µl	1
48	vrh	1 – 6	vrhovi od 1000 µl	1, 2
		7 – 12	vrhovi od 300 µl	1
96	vrh	1 – 6	vrhovi od 1000 µl	1, 2, 3, 4
		7 – 12	vrhovi od 300 µl	1

- 4 Na sljedeći način umetnite prebrojane vrhove na nosače vrhova.

Veličina serije uzorka	Vrsta nosača	Staza	Stavka	Položaj
24, 48, 96	vrh	49 – 54	vrhovi od 1000 µl	1
			vrhovi od 300 µl	2
			vrhovi od 50 µl	3

- 5 Unesite lokaciju prvog i zadnjeg vrha za svaki stalak s vrhovima pa odaberite **OK** (U redu).
- 6 Skenirajte crtične kodove na kutiji za izdvajanje.
- 7 Unesite korisničko ime ili inicijale osobe koja priprema reagense pa odaberite **OK** (U redu).
- 8 Skenirajte barkodove na kutiji za dodatnu opremu.
- 9 Unesite korisničko ime ili inicijale osobe koja priprema reagense pa odaberite **OK** (U redu).
- 10 Potvrdite da su nalijepljeni barkodovi.
- 11 Otvorite pločicu Final Plasma s dubokim jažicama i na sljedeći način umetnite pločice (s barkodom okrenutim desno) na nosač pločica pa odaberite **OK** (U redu).

Veličina serije uzorka	Vrsta nosača	Staza	Stavka	Položaj
24, 48, 96	Multiflex	19 – 24	Nova pločica pune širine, Intermediate – s barkodom	1
			Nova pločica pune širine, cfDNA Elution – s barkodom	2
			Nova pločica s dubokim jažicama, Extraction Intermediate – s barkodom	4
			Pločica s dubokim jažicama Final Plasma – s barkodom	5

- 12 Provjerite da pločica za povezivanje DNA ima barkod pa odaberite **OK** (U redu).
- 13 Za djelomične serije pločica primijenite skraćenu brtvu pločice preko nekorištenih jažica (stupci 4 – 12 za 24 serije uzoraka i stupci 7 – 12 za 48 serija uzoraka).
- 14 Umetnite pločicu za povezivanje DNA na vakuumsku granu s barkodom okrenutim desno.
- 15 Potvrdite okvir **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (Jesu li stupci pločice za vezanje DNA zatvoreni?) pa odaberite **OK** (U redu).

16 Na sljedeći način umetnite posude s reagensom na nosač reagensa pa odaberite **OK** (U redu).

Veličina serije uzorka	Vrsta nosača	Staza	Stavka	Položaj
24, 48	reagens	47	16 ml Elution Buffer	1
			11 ml Proteinase K	2
96	reagens	47	16 ml Elution Buffer	1
			15 ml Proteinase K	2

17 Prenesite navedene reagense u spremnike s dubokim jažicama, a zatim na sljedeći način spremnike umetnite u nosače s dubokim jažicama.

18 Odaberite **OK** (U redu).

Veličina serije uzorka	Vrsta nosača	Staza	Stavka	Položaj
24, 48	s dubokim jažicama	39 – 44	125 ml Wash Buffer II	1
			125 ml Wash Buffer I	2
			60 ml 100-postotnog etilnog alkohola	3
			100 ml Lysis Buffer	4
			60 ml vode bez DNaze/RNaze	5
96	s dubokim jažicama	39 – 44	200 ml Wash Buffer II	1
			125 ml Wash Buffer I	2
			100 ml 100-postotnog etilnog alkohola	3
			100 ml Lysis Buffer	4
			100 ml vode bez DNaze/RNaze	5

19 Pričekajte da završi automatizirana provjera volumena reagensa.

20 Provjerite da vakuumski otpad nije pun više od polovice (preporučujemo da ga ispraznite) pa odaberite **OK** (U redu).

21 Provjerite smještaj svih nosača, laboratorijskog posuđa i reagensa pa na zaslonu Extraction Deck Verification (Provjera valjanosti platforme za izdvajanje) odaberite **OK** (U redu).

22 Promatrajte ML STAR tijekom automatiziranih koraka.



**OPREZ**

Morate ručno proglasiti nevaljanim prelijevanja uzoraka koje sustav nije prepoznao nego što se kontaminiraju obližnje jažice.

23 Nakon koraka završnog vakuumiranja uklonite pločicu za povezivanje DNA i očistite donju površinu 70-postotnim etilnim alkoholom.

24 Zabrtvite sve nepokrivene jažice na pločici za povezivanje DNA i stavite je na praznu pločicu s dubokim jažicama Final Plasma.

25 Centrifugirajte sklop pločice za povezivanje DNA/pločice Final Plasma na 5600 × g u trajanju 10 minuta s uključenom kočnicom.

26 Odaberite **OK** (U redu).

27 Tijekom centrifugiranja pločice za povezivanje DNA dovršite vakuumsko čišćenje:

- a Uklonite vakuumsku granu pa odaberite **OK** (U redu).
- b Pričekajte da završi automatizirano uklanjanje otpada.
- c Očistite vakuumsku granu i unutrašnjost vakuuskog sustava 70-postotnim etilnim alkoholom, a zatim zamijenite vakuumsku granu.
- d Potvrdite okvir **Manifold is on Vacuum** (Grana je pod vakuumom) da biste pokrenuli prijenos pločice za ispiranje na vakuumsku hranu pa odaberite **OK** (U redu).

- 28 Nakon centrifuge odbrtvite jažice koje sadrže uzorke na pločici za povezivanje DNA i stavite je na pločicu za ispiranje cfDNA.  
Pločica za eluiranje cfDNA nalazi se na vakuumskom razdjelniku.
- 29 Umetnite pločicu za povezivanje DNA s barkodom okrenutim desno pa odaberite **OK** (U redu).
- 30 Promatrajte ML STAR tijekom automatiziranih koraka.
- 31 Nakon inkubacije potvrdite okvir **Plates are assembled as indicated** (Pločice su spojene kako je navedeno) da biste potvrdili da je sklop pločice za povezivanje DNA/pločice za ispiranje cfDNA na potpornoj bazi (ako se tako zahtijeva za centrifugiranje).
- 32 Zabrtvite nepokrivene jažice na pločici za povezivanje DNA.
- 33 Centrifugirajte na 5600 × g u trajanju 2 minute s uključenom kočnicom pa odaberite **OK** (U redu).
- 34 Provjerite je li na pločici za ispiranje cfDNA u svakoj jažici isti volumen.  
Očekivani volumen iznosi oko 55 µl.
- 35 Zatvorite i pričvrstite pločicu za eluiranje cfDNA radi pripreme biblioteke.
- 36 Kad to od vas zatraži softver Workflow Manager, provjerite da na platformi za umetanje ML STAR nema nikakvih prepreka kako bi ML STAR mogao izvaditi nosače.
- 37 Odaberite **Unload** (Isprazni) da biste ispraznili platformu.
- 38 Izvadite sve nosače i očistite platformu ML STAR pa odaberite **OK** (U redu).
- 39 Unesite komentare o zahvaćenim jažicama pa odaberite **OK** (U redu).
- 40 Izvedite neki od sljedećih koraka:
  - Da biste nastavili s pripremom biblioteka, odaberite **Yes** (Da).
  - Da biste zaustavili postupak, odaberite **Exit** (Izlaz).

#### TOČKA SIGURNOG PREKIDANJA

U slučaju prekidanja zatvorite pločicu za eluiranje cfDNA i uskladištite na temperaturi od –25 °C do –15 °C najviše 7 dana.

## Priprema biblioteka

### Priprema

- 1 Vizualno pregledajte kutiju za pripremu biblioteke i kutiju s dodatnom opremom da biste se uvjerali da kompletu nije istekao rok trajanja.
- 2 Pripremite sljedeće reagense. Označite spremničke posude i spremnike s dubokim jažicama nazivima reagensa.

Stavka	Skladištenje	Upute
End Repair Mix	od –25 °C do –15 °C	Odmrznite na sobnoj temperaturi. Promiješajte u vrtložnoj miješalici.
A-Tailing Mix	od –25 °C do –15 °C	Odmrznite na sobnoj temperaturi. Promiješajte na vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
Ligation Mix	od –25 °C do –15 °C	Odmrznite na sobnoj temperaturi. Promiješajte na vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
Pufer za resuspendiranje	od 2 °C do 8 °C	Promiješajte u vrtložnoj miješalici. Nakon upotrebe vratite u skladište.
Pufer za hibridizaciju	od –25 °C do –15 °C	Odmrznite na sobnoj temperaturi. Promiješajte u vrtložnoj miješalici. Nakon upotrebe vratite u skladište.
VeriSeq NIPT DNA Adapter Plate	od –25 °C do –15 °C	Odmrznite na sobnoj temperaturi. Promiješajte u vrtložnoj miješalici. Centrifugirajte na 1000 × g tijekom 20 sekundi. Nalijepite barkod pločice.
Zrnca za pročišćavanje uzorka	od 2 °C do 8 °C	Ostavite je 30 minuta da poprimi sobnu temperaturu. Energično promiješajte u miješalici prije svake upotrebe. Promiješajte miješalicom ili inverzijom dok sva zrnca ne budu u suspenziji i smjesa postane homogena.
cfDNA Elution Plate	od –25 °C do –15 °C	Ako je pločica prethodno bila uskladištena, provjerite nije li bila uskladištena dulje od 7 dana i odmrznite na sobnoj temperaturi. Miješajte pri 1500 okr./min 1 minutu. Centrifugirajte pri 1000 × g tijekom 20 sekundi.

- 3 Pripremite svježih 50 ml 80-postotnog EtOH iz 40 ml 100-postotnog EtOH i 10 ml vode bez DNaze/RNaze. Invertirajte EtOH da biste ga promiješali.
- 4 Označite 1 novu pločicu pune širine s Biblioteke i nalijepite barkod pločice.
- 5 Provjerite je li termalna kontrola platforme ML STAR uključena.

### Razrjeđivanje enzima

- 1 Kombinirajte A-Tailing Mix i pufer za resuspendiranje u epruveti s čepom s navojem. Promiješajte na vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.

Veličina serije uzorka	A-Tailing Mix	Pufer za resuspendiranje
24, 48	900 µl	1200 µl
96	1800 µl	2400 µl

- 2 Kombinirajte Ligation Mix i pufer za resuspendiranje u epruveti s čepom s navojem. Promiješajte na vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.

Veličina serije uzorka	Ligation Mix	Pufer za resuspendiranje
24, 48	230 µl	1713 µl
96	440 µl	3278 µl

## Postupak

- 1 Odaberite **OK** (U redu) da biste počeli s pripremom biblioteke. Ako metoda VeriSeq NIPT Method nije već otvorena:
  - a Otvorite AppLauncher pa odaberite **VeriSeq NIPT Method**.
  - b Unesite ID serije i korisničko ime pa odaberite **OK** (U redu).
- 2 Potvrdite da je pripremljen sljedeći potrošni materijal kao što je navedeno na zaslonu Reagent Preparation (Priprema reagensa):
  - ▶ A-Tailing Mix, Ligation Mix i 80-postotni etilni alkohol.
  - ▶ Zrnca za pročišćavanje uzorka, End Repair Mix i pločica VeriSeq NIPT DNA Adapter Plate.
- 3 Potvrdite okvire pa odaberite **OK** (U redu).
- 4 Skenirajte barkodove na kutiji za pripremu biblioteke.
- 5 Unesite korisničko ime ili inicijale osobe koja priprema reagensa pa odaberite **OK** (U redu).
- 6 Skenirajte barkodove na kutiji za dodatnu opremu.
- 7 Unesite korisničko ime ili inicijale osobe koja priprema reagensa pa odaberite **OK** (U redu).
- 8 Na sljedeći način umetnite vrhove na nosače vrhova pa odaberite **OK** (U redu) za svaki nosač.

Veličina serije uzorka	Vrsta nosača	Staza	Stavka	Položaj
24	vrh	1 – 6	vrhovi od 50 µl	1
		7 – 12	vrhovi od 300 µl	1, 2
48	vrh	1 – 6	vrhovi od 50 µl	1, 2
		7 – 12	vrhovi od 300 µl	1, 2, 3, 4
96	vrh	1 – 6	vrhovi od 50 µl	1, 2, 3, 4
		7 – 12	vrhovi od 300 µl	1, 2, 3, 4, 5

- 9 Ako ste zaustavili protokol nakon postupka izdvajanja cfDNA, na sljedeći način stavite prebrojene vrhove na nosače vrhova.

Veličina serije uzorka	Vrsta nosača	Staza	Stavka	Položaj
24, 48, 96	vrh	49 – 54	vrhovi od 1000 µl	1
			vrhovi od 300 µl	2
			vrhovi od 50 µl	3

- 10 Unesite lokaciju prvog vrha za svaki stalak s vrhovima pa odaberite **OK** (U redu).
- 11 Provjerite da su nalijepljeni barkodovi i na sljedeći način umetnite pločice (s barkodom okrenutim desno) na nosač pločica pa odaberite **OK** (U redu).

Veličina serije uzorka	Vrsta nosača	Staza	Stavka	Položaj
24, 48, 96	Multiflex	19 – 24	pločica za ispiranje cfDNA – s barkodom	1
			adapterska pločica za DNA – s barkodom	2
			nova pločica pune širine s 96 jažica, biblioteke – s barkodom	3
			nove pločice pune širine s 96 jažica	4, 5

12 Na sljedeći način umetnite nosače s dubokim jažicama pa odaberite **OK** (U redu).

Veličina serije uzorka	Vrsta nosača	Staza	Stavka	Položaj
24, 48, 96	s dubokim jažicama	39 – 44	50 ml 80-postotnog etilnog alkohola u spremniku s dubokim jažicama	1
			nove pločice pune širine s 96 jažica	2, 3, 4, 5

13 Na sljedeći način umetnite posude s reagensom na nosač reagensa pa odaberite **OK** (U redu).

Veličina serije uzorka	Vrsta nosača	Staza	Stavka	Položaj
24, 48, 96	reagens	47	2,5 ml reagensa End Repair Mix	1
			pripremljeni A-Tailing Mix (ukupan volumen)	2
			pripremljeni Ligation Mix (ukupan volumen)	3
			10 ml zrnaca za pročišćavanje uzorka	4
			12 ml pufera za hibridizaciju	5

- 14 Provjerite jesu li nosači, laboratorijsko posuđe i reagensi pravilno umetnuti kako je navedeno pa na zaslonu Library Deck Verification (Provjera valjanosti platforme za biblioteku) odaberite **OK** (U redu).
- 15 Pričekajte da završi automatizirana provjera volumena reagensa.
- 16 Promatrajte ML STAR tijekom automatiziranih koraka.
- 17 Kad to od vas zatraži softver Workflow Manager, provjerite da na platformi za umetanje ML STAR nema nikakvih prepreka kako bi ML STAR mogao izvaditi nosače pa odaberite **Unload** (Isprazni) da biste ispraznili platformu.
- 18 Provjerite je li na pločici s bibliotekama u svakoj jažici isti volumen.



#### OPREZ

Ako volumeni u jažicama nisu isti, uzorci mogu dati netočne rezultate.

- 19 Ako ćete je pohranjivati, zabrtvite i zadržite pločicu s bibliotekama.
- 20 Izvadite nosače, očistite platformu pa odaberite **OK** (U redu).
- 21 Unesite komentare o zahvaćenim jažicama pa odaberite **OK** (U redu).
- 22 Izvedite neki od sljedećih koraka:
- ▶ Da biste nastavili s kvantificiranjem biblioteka, odaberite **Yes** (Da).
  - ▶ Da biste zaustavili postupak, odaberite **Exit** (Izlaz).
- 23 Ako ne prekidate, odmah prijedite na kvantifikaciju.

#### TOČKA SIGURNOG PREKIDANJA

U slučaju prekidanja zatvorite pločicu za biblioteke prije skladištenja. Pločica za biblioteke stabilna je najviše 7 dana od dana pripreme na temperaturi od  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## Kvantifikacija biblioteka

### Priprema

1 Pripremite sljedeće reagense:

Stavka	Skladištenje	Upute
Reagens za kvantifikaciju DNA-a	od $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $8\text{ }^{\circ}\text{C}$	Zaštite od svjetlosti. Odmrzavajte na sobnoj temperaturi 30 – 150 minuta (preporučuje se uklanjanje reagensa na početku postupka pripreme biblioteka). Promiješajte na vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
Standard kvantifikacije DNA	od $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $8\text{ }^{\circ}\text{C}$	Promiješajte na vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.

Stavka	Skladištenje	Upute
Pločica s bibliotekama	od –25 °C do –15 °C	Ako je pločica prethodno bila uskladištena, provjerite da nije bila uskladištena dulje od 7 dana i odmrznite na sobnoj temperaturi. Promiješajte u vrtložnoj miješalici. Centrifugirajte na 1000 × g tijekom 20 sekundi.
Pufer za resuspendiranje	od 2 °C do 8 °C	Promiješajte u vrtložnoj miješalici.

- Fluorometar uključite 10 minuta prije korištenja.
- Primijenite crtični kôd pločice na novu ploču od 384 jažica.
- Primijenite crtični kôd pločice na novu punu pločicu.

## Postupak

- Odaberite **OK** (U redu) da biste pokrenuli kvantifikaciju.
- Ako metoda VeriSeq NIPT Method nije već otvorena:
  - Otvorite AppLauncher i odaberite **VeriSeq NIPT Method**.
  - Unesite ID serije i korisničko ime pa odaberite **OK** (U redu).
- Skenirajte barkodove na kutiji za dodatnu opremu.
- Unesite korisničko ime ili inicijale osobe koja priprema reagense pa odaberite **OK** (U redu).
- Na sljedeći način umetnite vrhove na nosač vrhova pa odaberite **OK** (U redu).

Veličina serije uzorka	Vrsta nosača	Staza	Stavka	Položaj
24, 48	vrh	1 – 6	stalak s vrhovima od 300 µl	1
			stalak s vrhovima od 50 µl	2
96	vrh	1 – 6	stalak s vrhovima od 300 µl	1
			stalak s vrhovima od 50 µl	2, 3

- Provjerite da su barkodovi pričvršćeni, a zatim, ako je potrebno, odbrtvite pločicu s bibliotekama.
- Na sljedeći način umetnite pločice (s barkodom okrenutim desno) na nosač Multiflex pa odaberite **OK** (U redu).

Veličina serije uzorka	Vrsta nosača	Staza	Stavka	Položaj
24, 48, 96	Multiflex	19 – 24	nove pločice pune širine – s barkodom	1
			nova pločica s 384 jažica – s barkodom	2
			pločica s bibliotekama – s barkodom	3
			nove pločice pune širine s 96 jažica	4, 5

- Na sljedeći način umetnite epruvete s reagensom bez čepova na nosač epruveta pa odaberite **OK** (U redu).

Veličina serije uzorka	Vrsta nosača	Staza	Stavka	Položaj
24, 48, 96	epruveta	46	Standard kvantifikacije DNA	1
			Reagens za kvantifikaciju DNA-a	2

- Na sljedeći način umetnite posude s reagensom na nosač reagensa pa odaberite **OK** (U redu).

Veličina serije uzorka	Vrsta nosača	Staza	Stavka	Položaj
24, 48, 96	reagens	47	nova posuda za reagens (prazna)	1
			16 ml pufera za resuspendiranje	2

- 10 Ako ste zaustavili protokol nakon postupka pripreme biblioteke, na sljedeći način stavite prebrojene vrhove na nosače vrhova.

Veličina serije uzorka	Vrsta nosača	Staza	Stavka	Položaj
24, 48, 96	vrh	49 – 54	vrhovi od 1000 µl	1
			vrhovi od 300 µl	2
			vrhovi od 50 µl	3

- 11 Unesite lokaciju prvog i zadnjeg vrha za svaki stalak s vrhovima pa odaberite **OK** (U redu).
- 12 Provjerite jesu li nosači, laboratorijsko posuđe i reagensi pravilno umetnuti pa na zaslonu Quant Deck Verification (Provjera valjanosti platforme za kvantifikaciju) odaberite **OK** (U redu).
- 13 Pričekajte da završi automatizirana provjera volumena reagensa.
- 14 Promatrajte ML STAR tijekom automatiziranih koraka.
- 15 Kad to od vas zatraži softver Workflow Manager, provjerite da na platformi za umetanje ML STAR nema nikakvih prepreka kako bi ML STAR mogao izvaditi nosače.
- 16 Odaberite **Unload** (Isprazni) da biste ispraznili platformu.
- 17 Izvadite pločicu s bibliotekom.
- Provjerite je li na pločici u svakoj jažici isti volumen.
  - Zabrtvite pločicu s bibliotekama i pohranite je na sobnoj temperaturi do dovršetka analize fluorometrijskih podataka.
- 18 Izvadite preostale pločice s 96 jažica i provjerite je li u svakoj jažici isti volumen. Velike pogreške volumena mogu upućivati na problem s koracima pipetiranja.
- 19 Ispraznite pločicu s 384 jažica i provjerite ima li tekućine u odgovarajućim jažicama.
- 20 Zatvorite pločicu folijom.
- 21 Centrifugirajte na 1000 × g tijekom 20 sekundi.
- 22 Inkubirajte na sobnoj temperaturi 10 minuta zaštićeno od svjetlosti.
- 23 Izvadite sve nosače i očistite platformu ML STAR pa odaberite **OK** (U redu).



#### NAPOMENA

Ne bacajte reagensne za kvantifikaciju dok ne dobijete podatke. Trebat ćete reagensne ako ćete morati ponoviti kvantifikaciju.

- 24 Nakon inkubacije skinite foliju i postavite pločicu za 384 posude na čitač mikropločica. Neka prilikom umetanja A1 bude u gornjem lijevom kutu.
- 25 Dvaput kliknite predložak VeriSeq NIPT da biste ga otvorili u programu SoftMax Pro.
- 26 Na kartici Home (Početno) odaberite **New Experiment** (Novi eksperiment).
- 27 Odaberite **Read** (Očitaj).
- 28 Izvezite podatke u XML obliku na način opisan u nastavku.
- Desnom tipkom miša kliknite **Plate** (Pločica), a zatim odaberite **Rename** (Preimenuj).
  - Skenirajte barkod pločice za kvantifikaciju pa odaberite **OK** (U redu).
  - U gornjem lijevom kutu zaslona odaberite ikonu pločice, a zatim na izborniku odaberite **Export** (Izvezi).
  - Potvrdite okvir **Expt name** (Naziv izvezene datoteke), mogućnost datuma pločice postavite na neobrađeno, izlazni oblik postavite na XML, a zatim odaberite **OK** (U redu).
  - Postavite put i naziv izlazne datoteke pa odaberite **Save** (Spremi).

Računalo Hamilton mora moći pristupiti mjestu datoteke. U nazivu datoteke i putu datoteke nemojte upotrebljavati razmake.

## Analiza

- U alatu Workflow Manager na zaslonu Scanner Information (Podaci o skeneru) unesite ID fluorometra.
- Unesite komentare o obradi pomoću fluorometra pa odaberite **OK** (U redu).



- 3 Pronađite XML kvantifikacijsku datoteku koja sadrži fluorometrijske podatke pa odaberite **OK** (U redu).
- 4 Pregledajte rezultate analize krivulje standarda i koncentracije uzoraka pa odaberite **OK** (U redu).
- 5 Ako morate ponovno skenirati pločicu, odaberite **Rescan** (Ponovno skeniraj).  
Uzorci su osjetljivi na vrijeme i svjetlost. Po potrebi odmah izvedite ponovno skeniranje.
- 6 Unesite komentare o zahvaćenim jažicama pa odaberite **OK** (U redu).
- 7 Očitajte rezultate i nastavite kako je opisano.
  - Ako rezultati zadovoljavaju specifikacije, prijedite na stvaranje skupova biblioteka. Specifikacije potražite u tablici metričkih podataka i granica za kvantifikacijsku kontrolu kvalitete u priručniku za softver *VeriSeq NIPT Solution v2 (dokument br. 1000000067940)*.
  - Ako rezultati ne zadovoljavaju specifikacije, sustav će prekinuti metodu. Ponovite postupke kvantifikacije počevši od odjeljka *Priprema na stranici 22*.
- 8 Izvedite neki od sljedećih koraka:
  - Da biste nastavili na biblioteke skupova, odaberite **Yes** (Da).
  - Da biste zaustavili postupak, odaberite **Exit** (Izlaz).

### TOČKA SIGURNOG PREKIDANJA

U slučaju prekidanja zatvorite pločicu za biblioteke prije skladištenja. Pločica za biblioteke stabilna je najviše 7 dana ukupnog skladištenja na temperaturi od  $-25\text{ °C}$  do  $-15\text{ °C}$ .

## Stvaranje skupova biblioteka

### Priprema

- 1 Pripremite sljedeće reagense:

Stavka	Skladištenje	Upute
Pufer za hibridizaciju	od $-25\text{ °C}$ do $-15\text{ °C}$	Odmrznite na sobnoj temperaturi. Promiješajte u vrtožnoj miješalici. Nakon upotrebe vratite u skladište.
Pločica s bibliotekama	od $-25\text{ °C}$ do $-15\text{ °C}$	Ako su prethodno bile pohranjene, odmrznite ih na sobnoj temperaturi. Miješajte pri 1500 okr./min 1 minutu. Centrifugirajte pri $1000 \times g$ tijekom 20 sekundi.

- 2 Označite praznu epruvetu za stvaranje skupa „Skup A“. Za 96 uzoraka označite drugu praznu epruvetu za stvaranje skupa „Skup B“.
- 3 Spremite sljedeći program za denaturiranje na termocikler s grijanim poklopcem.
  - a Odaberite mogućnost predgrijanja poklopca i postavite ga na  $102\text{ °C}$ .
  - b Postavite reakcijski volumen na  $50\ \mu\text{l}$ .
  - c Postavite korak pojačavanja na maksimum ( $\geq 2\text{ °C}$  u sekundi).
  - d Inkubirajte na  $96\text{ °C}$  u trajanju 10 minuta, a zatim  $4\text{ °C}$  u trajanju 5 sekundi.
  - e Držite na  $4\text{ °C}$ .

### Postupak

- 1 Postavite pločicu s bibliotekama na unaprijed programirani termocikler i pokrenite program denaturizacije.



#### NAPOMENA

Nemojte denaturirati pločicu s bibliotekama prije nego što kvantifikacija prođe mjerne podatke kontrole kvalitete jer ćete možda morati ponovno izvesti kvantifikaciju.

- 2 Centrifugirajte pločicu s bibliotekama na  $1000 \times g$  tijekom 20 sekundi.
- 3 U alatu Workflow Manager odaberite **OK** (U redu) da biste pokrenuli stvaranje skupova biblioteka.

- 4 Ako metoda VeriSeq NIPT Method nije već otvorena:
  - a Otvorite AppLauncher i odaberite **VeriSeq NIPT Method**.
  - b Unesite ID serije i korisničko ime pa odaberite **OK** (U redu).
- 5 Odaberite koncentraciju skupa pa **OK** (U redu).  
Prema potrebi prilagodite koncentraciju stvaranja skupova da biste postigli ciljnu gustoću klastera od 220 – 260 k/mm<sup>2</sup>.
- 6 Ako Workflow Manager to od vas zatraži, izvedite jedan od sljedećih koraka:
  - ▶ Da biste učitali list s uzorcima, odaberite list s uzorcima povezan sa serijom pa **OK** (U redu).
  - ▶ Da biste koristili zadane vrijednosti sustava za ostale tipove podataka, izvješće o spolu ili vrstu probira, za svaku postavku odaberite **Use Default** (Koristi zadanu vrijednost).  
Da biste saznali više o stvaranju lista s uzorcima, pročitajte *Vodič za softver VeriSeq NIPT Solution v2 (broj dokumenta: 100000067940)*.



**OPREZ**

Prije nego odaberete mogućnost Use Default (Koristi zadanu vrijednost), provjerite da ste postavili zadane vrijednosti u servisnim alatima Workflow Manager. Ako to ne napravite, može doći do nepotpune analize uzoraka.

- 7 Odaberite **Start** (Pokreni) da biste počeli mjeriti vrijeme pločice za denaturiziranje.
- 8 Na sljedeći način umetnite vrhove na nosače vrhova.

Veličina serije uzorka	Vrsta nosača	Staza	Stavka	Položaj
24, 48, 96	vrh	7 – 12	vrhovi s filtrom od 50 µl	1

- 9 Na sljedeći način umetnite pločicu s denaturiziranom bibliotekom (s barkodom okrenutim desno) na nosač Multiflex pa odaberite **OK** (U redu).

Veličina serije uzorka	Vrsta nosača	Staza	Stavka	Položaj
24, 48, 96	Multiflex	19 – 24	pločica s denaturiziranom bibliotekom (s barkodom)	1

- 10 Na sljedeći način umetnite epruvete za stvaranje skupova na nosač epruveta pa odaberite **OK** (U redu).

Veličina serije uzorka	Vrsta nosača	Staza	Stavka	Položaj
24, 48	epruveta	46	nova epruveta od 2 ml, Skup A	1
96	epruveta	46	nova epruveta od 2 ml, Skup A	1
			nova epruveta od 2 ml, Skup B	2

- 11 Na sljedeći način umetnite posude s reagensom na nosač reagensa pa odaberite **OK** (U redu).

Veličina serije uzorka	Vrsta nosača	Staza	Stavka	Položaj
24, 48, 96	reagens	47	3 ml pufera za hibridizaciju	1

- 12 Na sljedeći način umetnite vrhove na nosače vrhova.

Veličina serije uzorka	Vrsta nosača	Staza	Stavka	Položaj
24, 48, 96	vrh	49 – 54	vrhovi s filtrom od 1000 µl	1
			vrhovi s filtrom od 300 µl	2
			vrhovi s filtrom od 50 µl	3

- 13 Unesite lokaciju prvog i zadnjeg vrha za svaki stalak s vrhovima pa odaberite **OK** (U redu).

- 14 Provjerite jesu li nosači, laboratorijsko posuđe i reagensi pravilno umetnuti pa odaberite **OK** (U redu) na zaslonu Pooling Deck Verification (Provjera valjanosti platforme za stvaranje skupova).
- 15 Promatrajte ML STAR tijekom automatiziranih koraka.
- 16 Unesite komentare o zahvaćenim jažicama pa odaberite **OK** (U redu).
- 17 Kad to od vas zatraži softver Workflow Manager, provjerite da na platformi za umetanje ML STAR nema nikakvih prepreka kako bi ML STAR mogao izvaditi nosače.
- 18 Odaberite **Unload** (Isprazni) da biste ispraznili platformu.
- 19 Ispraznite nosač epruveta.
- 20 Zatvorite svaku epruvetu za stvaranje skupova, promiješajte u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
- 21 Odaberite **OK** (U redu).
- 22 Sekvencirajte biblioteke što prije nakon stvaranja skupova. Ako je potrebno, zabrtvite pločicu s bibliotekama i pohranite je na temperaturi od  $-25^{\circ}\text{C}$  do  $-15^{\circ}\text{C}$  maksimalno 7 dana da bi se stvorili skupovi.

### TOČKA SIGURNOG PREKIDANJA

U slučaju prekidanja stavite čep na epruvete za stvaranje skupova i uskladištite na temperaturi od  $-25^{\circ}\text{C}$  do  $-15^{\circ}\text{C}$  najviše 7 dana.

## Priprema skupova biblioteka za sekvenciranje

### Priprema

- 1 Pripremite sljedeće reagense:

Stavka	Skladištenje	Upute
Epruvete skupa	od $-25^{\circ}\text{C}$ do $-15^{\circ}\text{C}$	Ako su prethodno bile pohranjene, odmrznite ih na sobnoj temperaturi. Kratko promiješajte u miješalici. Kratko centrifugirajte.

- 2 Pripremite u sustavu za sekvenciranje nove generacije ispunjavanjem sljedećih polja u modulu Local Run Manager VeriSeq NIPT:
  - a Run Name (Naziv obrade)
  - b Run Description (optional) (Opis obrade (neobavezno))
  - c Pool Barcode (Crtični kôd skupa)

Da biste saznali više o koroštenju modula Local Run Manager VeriSeq NIPT, pročitajte *Vodič za softver VeriSeq NIPT Solution v2 (broj dokumenta 100000067940)*.



#### OPREZ

Barkod skupa koji se unosi u modul Local Run Manager mora se podudarati s barkodom skupa koji je unijet u Workflow Manager. Softver za analizu odbacit će netočne konfiguracije obrade i možda će biti potrebno ponovno sekvenciranje.

Sljedeći postupak opisuje pravilno umetanje biblioteka sa stvorenim skupovima u instrument za sekvenciranje nove generacije koji koristi spremnike.

### Postupak

- 1 Dodajte sljedeći potrošni materijal u spremnik reagensa, a zatim pipetirajte u smjesu.
  - ▶ 900  $\mu\text{l}$  pufera za hibridizaciju
  - ▶ 450  $\mu\text{l}$  skupa A
- 2 Nastavite sa sekvenciranjem na sustavu za sekvenciranje nove generacije.  
Upute za sekvenciranje potražite u referentnom vodiču za svoj instrument za sekvenciranje nove generacije. U slučaju instrumenta NextSeq 550Dx pročitajte *Referentni vodič za instrument NextSeq 550Dx (broj dokumenta: 100000009513)* ili *Informativni pregled instrumenta NextSeq 550Dx (broj dokumenta: 1000000043133)*.
- 3 Prema potrebi ponovite postupak za skup B.

- ▶ Da biste postigli raspon gustoće ciljnog klastera, za pločicu s bibliotekom može se ponovno stvoriti skup pomoću druge koncentracije za stvaranje skupa na uređaju Hamilton. Ponovno stvaranje skupa čini izvorni skup nevažećim.
- ▶ Umjesto toga se omjer skupa prema HT1 (450 + 900 ul) može izmijeniti tako da se postigne raspon gustoće ciljnog klastera.

## Sekvenciranje nove generacije

VeriSeq NIPT Solution v2 može se koristiti s uređajem za sekvenciranje nove generacije sljedećih specifikacija:

- ▶ čitanje 2x36 uparenih krajeva
  - ▶ kompatibilnost s prilagodnicima indeksa u kompletu za pripremu uzoraka VeriSeq NIPT Sample Prep
  - ▶ dvokanalna kemija
  - ▶ automatsko generiranje .BCL datoteka (sirovi podaci iz instrumenta za sekvenciranje)
  - ▶ 400 milijuna čitanja uparenih krajeva po obradi
  - ▶ kompatibilnost sa softverom VeriSeq NIPT Assay Software v2.
- NextSeq 550Dx je kompatibilan sa softverom VeriSeq NIPT Solution v2.

## Analiza podataka o sekvencama

Nakon dovršetka sekvenciranja podaci dobiveni sekvenciranjem automatski se šalju softveru VeriSeq NIPT Assay Software v2 radi analize i generiranja izvješća. Izvješće obuhvaća klasifikaciju svakog uzorka u seriji kao i procjenu svih mjernih podataka kontrole kvalitete za obradu. Postupak analize od dovršetka sekvenciranja do završnih rezultata traje otprilike 4 sata za seriju s 48 uzoraka. Detaljne informacije o analizi podataka i izlaznoj datoteci potražite u *Vodiču za softver VeriSeq NIPT Solution v2 (broj dokumenta: 100000067940)*.

## Tumačenje rezultata

Algoritam softvera VeriSeq NIPT Solution v2 koristi složen statistički model koji kombinira nekoliko različitih vrsta informacija dobivenih prikupljanjem sekvenciranih dijelova biblioteke s uparenim krajevima. Taj se model koristi za prepoznavanje područja genoma koja su ispodprosječno ili natprosječno zastupljena u biblioteci svakog uzorka. Važno je da taj model uzima u obzir je li stupanj ispodprosječne ili natprosječne zastupljenosti kvantitativno dosljedan s nekim slučajem aneuploidije u fetalnom genomu na razini fetalne frakcije otkrivene za tu biblioteku.

Za sve su kromosome podaci dobiveni sekvenciranjem s uparenim krajevima usklađeni s referentnim genomom (HG19). Jedinstvena neduplicirana usklađena očitavanja agregiraju se u spremnike od 100 kb. Odgovarajući broj spremnika prilagođava se GC utjecaju i u skladu s prethodno utvrđenom genomskom pokrivenošću specifičnom za područje. Upotrebom takvih normaliziranih količina spremnika dobivaju se statistički rezultati za svaki autosom usporedbom regija pokrivenosti koje mogu biti zahvaćene aneuploidijom s ostatkom autosoma. Logaritamski omjer vjerojatnosti (log likelihood ratio, LLR) izračunava se za svaki uzorak uz uzimanje u obzir tih rezultata utemeljenih na pokrivenosti i određene fetalne frakcije. LLR je vjerojatnost da je uzorak zahvaćen uz uočenu pokrivenost i fetalnu frakciju u suprotnosti s vjerojatnosti da je uzorak nezahvaćen uz istu uočenu pokrivenost. Pri izračunu tog omjera uzima se u obzir i određena nesigurnost fetalne frakcije. Za daljnje izračune koristi se prirodni logaritam omjera. Softver za analizu određuje LLR za svaki ciljni kromosom i svaki uzorak kako bi odredio aneuploidiju.

Tijekom stvaranja serije morate definirati vrstu uzorka (jednoplodan ili blizanački), vrstu probira (osnovni ili na razini genoma) te izvješćivanje o spolnom kromosomu (Da, Ne i SCA) za svaki pojedini uzorak. Te mogućnosti zajedno određuju koji će se podaci dobiti za svaki uzorak.

Kod svih vrsta uzoraka vrsta probira određuje koje će se autosomne nepravilnosti prepoznavati. U osnovnoj vrsti probira prepoznaju se samo slučajevi trisomije na cijelom kromosomu koji zahvaćaju kromosome 13, 18 i 21. Kod vrste probira na razini genoma prepoznaju se cijele ili djelomične delecije kromosoma ili dupliciranje bilo kojeg autosomnog kromosoma. Dužina najmanje prepoznatljive djelomične delecije ili duplikacije kromosoma je 7 Mb.

Kod jednoplodnih uzoraka možete onemogućiti prepoznavanje spolnih kromosoma. Možete i konfigurirati da se prepoznaju aneuploidije spolnih kromosoma s prepoznavanjem spola euploidnih uzoraka ili bez prepoznavanja.

Kod blizanačkih uzoraka, ako se za prepoznavanje spolnih kromosoma odabere Yes (Da), rezultat je ograničen na prepoznavanje prisutnosti ili odsutnosti kromosoma Y u biblioteci. Aneuploidija spolnih kromosoma ne može se prepoznati u uzorcima blizanaca.

Rezultat ANOMALY DETECTED (PREPOZNATA ANOMALIJA) ukazuje na to da je uzorak probiran kao pozitivan na jednu anomaliju ili više njih u skladu s odabranom vrstom probira i mogućnosti prepoznavanja spolnih kromosoma. Kad se otkrije anomalija, u izvješću se dobiva opis anomalije u citogenetičkoj notaciji.

VeriSeq NIPT Assay Software v2 koristi statističke podatke generirane tijekom sekvenciranja da bi odredio fetalnu frakciju (fetal fraction estimation, FFE) za svaki uzorak. FFE je određena fetalna komponenta cfDNA koja se dobiva analizom i izražava kao zaokruženi postotak za svaki uzorak. Prosječna standardna devijacija tog određivanja za sve uzorke iznosi 1,3 %. FFE se ne smije koristiti zasebno za izdvajanje uzoraka prilikom objave rezultata.

Za izradu otkrivanja kromosomnih predstavljanja VeriSeq NIPT Assay Software v2 koristi individualizirani test pouzdanosti fetalne aneuploidije (Fetal Aneuploidy Confidence Test, iFACT) – metriku s dinamičkim pragom koja govori je li sustav generirao dostatnu pokrivenost sekvenciranjem uzimajući u obzir određenu fetalnu frakciju za svaki uzorak. Negativna prepoznavanja navode se samo ako uzorak prelazi iFACT prag. Ako uzorak ne dosegne taj prag, procjena kontrole kvalitete prikazuje FAILED iFACT (iFACT nije uspio) i sustav ne generira rezultat.

Osim iFACT-a, VeriSeq NIPT Assay Software v2 tijekom analize procjenjuje i neke druge mjerne podatke za kontrolu kvalitete. Dodatna metrika obuhvaća procjene uniformnosti pokrivenosti u referentnim regijama genoma i raspodjelu dužina fragmenata cfDNA. Procjena kontrole kvalitete prikazuje zastavicu kontrole kvalitete ili neuspješnu kontrolu kvalitete za sve mjerne podatke izvan prihvatljivog raspona. U slučaju neuspješne kontrole kvalitete sustav ne generira rezultat za uzorak. Ako uzorak nije dobar, može se ponovno obraditi uz uvjet da je dostatan volumen plazme u epruveti.

VeriSeq NIPT Solution v2 generira podatke za upotrebu u završnom izvješću. Ne generira završno izvješće za pacijenta. Korisnici su odgovorni za izgled završnog izvješća i njegovo dostavljanje nadležnom liječniku. Illumina nije odgovorna za točnost rečeničnih konstrukcija u završnom izvješću za korisnike.



#### OPREZ

Provjerite procjene fetalne frakcije svih uzoraka. Ako su procjene fetalne frakcije slične za sve uzorke u obradi, možda se dogodila amalgamacija uzoraka koja utječe na rezultate. Pomoć pri otklanjanju poteškoća zatražite od službe za tehničku podršku tvrtke Illumina.

## Karakteristike radnih svojstava

Sljedeći podaci navedeni u odjeljcima o kliničkom i analitičkom učinku generirani su upotrebom protokola i materijala navedenih u uputama za upotrebu počevši od plazme. Svi podaci o sekvenciranju za ovaj odjeljak generirani su na sustavu za sekvenciranje NextSeq 500/550 ili sustavu za sekvenciranje NextSeq 550Dx sa sljedećim konfiguracijama:

	NextSeq 500/550	NextSeq 550Dx
Softver na instrumentu	NextSeq Control Software 4.0	NextSeq Operating Software 1.3
Verzija kompleta reagensa	NextSeq 500/550 High Output v2.5 (75 cycle) Reagent Kit	NextSeq 550Dx High Output v2.5 (75 cycle) Reagent Kit
Metoda sekvenciranja	obrada sekvenciranjem 2x36 uparenih krajeva u načinu rada visoke snage	obrada sekvenciranjem 2x36 uparenih krajeva u načinu rada visoke snage

## Kliničko ispitivanje

Klinička preciznost softvera VeriSeq NIPT Solution v2 pokazana je obradom uzoraka plazme trudnih žena s jednoplođnim i blizanačkim trudnoćama. Uzorci su dobiveni iz masovno pohranjenih anonimiziranih uzoraka plazme koji su prethodno obrađeni iz uzoraka periferne pune krvi. Radi uključivanja u ispitivanje razmotreno je više od 45 000 uzoraka. Ti su uzorci prošli prenatalni probir za fetalne kromosomske aneuploidije i djelomične delecije i dupliciranja veličine 7 Mb ili veće. Svi uzorci zahvaćenih trudnoća i podskup daljnjih uzoraka nezahvaćenih trudnoća

kvalificirali su se za testiranje pod uvjetom dostupnosti kliničkih ishoda i zadovoljenja kriterija za uzorke. U skupu za testnu analizu našlo se ukupno 2335 uzoraka. U tom skupu je 2328 uzoraka bilo iz jednodnodnih trudnoća, a sedam od blizanačkih trudnoća.

28 od tih uzoraka (1,2 %, 28/2335) palo je na kontroli kvalitete analize pri prvom prolazu tijekom analize gotovih podataka dobivenih sekvenciranjem:

- 27 iFACT padova (jedan XO, 26 nezahvaćenih)
- jedan pad zbog podataka izvan očekivanog raspona

### Demografski podaci i karakteristike trudnoće

Dob majke, gestacijska dob i tromjesečje trudnoće sažeti su u [Tablica 7](#) za uzorke u probiru na razini genoma, uključujući uzorke s poznatim mozaicizmima.

Demografski podaci procijenjeni su između općih kohorti i kohorti na razini genoma i nisu primijećene statističke razlike. Demografski podaci i karakteristike trudnoće bile su slične bez obzira jesu li poznati mozaicizmi bili uključeni ili isključeni.

Tablica 7 Demografski podaci i karakteristike trudnoće

Sažetak statističkih podataka	Na razini genoma (uključujući poznate mozaicizme)
Broj uzoraka	2307*
<b>Dob majke – u godinama</b>	
Srednja vrijednost	35,08
Standardna devijacija	4,04
Medijan	34,95
25. percentil, 75. percentil	32,31, 37,79
Minimum, maksimum	20,22, 53,02
<b>Gestacijska dob prilikom vađenja krvi – u tjednima</b>	
Srednja vrijednost	10,93
Standardna devijacija	1,20
Medijan	10,57
25. percentil, 75. percentil	10,29, 11,14
Minimum, maksimum	10,00, 27,86
<b>Tromjesečje trudnoće – n (%)</b>	
< prvo (<14 tjedana)	2252 (98 %)
Drugo	54 (2 %)
Treće (≥ 27 tjedana)	1 (0 %)

\* Predstavljani završni uzorci obuhvaćali su 7 blizanaca.

## Kliničko djelovanje

Rezultati koje daje VeriSeq NIPT Solution v2 uspoređeni su s ishodima prema kliničkom referentnom standardu. Ishodi prema kliničkom referentnom standardu (klinička saznanja) svih ispitanih uzoraka bili su povezani sa stanjem fetalne kromosomske aneuploidije i djelomičnim delecijama i dupliciranjima veličine najmanje 7 Mb. Ishodi prema kliničkom referentnom standardu u ovom ispitivanju ovisili su o rezultatima analize kromosoma ili fizičkom pregledu novorođenčeta s negativnim NIPT probirom utemeljenom na NGS-u. Obučeno ispitivačko osoblje izvelo je klasifikaciju podataka kliničkog referentnog standarda u skladu s dokumentom sponzora sa šiframa u medicini.

Metode analize kromosoma uključivale su karotipiziranje, hibridizaciju fluorescencijom in situ (fluorescence in situ hybridization, FISH) ili mikropodručje kromosoma (chromosome microarray, CMA) dobiveno komparativnom genomskom hibridizacijom. Analiza kromosoma izvedena je na perifernoj krvi ili slini novorođenčeta ili dojenčeta, uzorcima proizvoda začeća (products of conception, POC), amniocitima, korionskim resicama, tkivu posteljice ili krvi iz pupčane vrpce nakon poroda.

Mozaicizam se definira kao prisutnost dviju ili više linija stanica različitog kromosomskog sastava kod pojedinca. Linije stanica potječu od iste zigote. Vrsta i razina mozaicizma razlikuje se i ovisi o vremenskom određenju mozaičkih slučajeva tijekom embriogeneze i fetalnog razvoja. U prenatalnim se dijagnozama pojavljuju različite vrste mozaicizma ovisno o raspodjeli abnormalnih linija stanica u odnosu na normalne u citotrofoblastu, mezenhimu ili fetusu.<sup>10</sup> Iako se mozaicizam može primijetiti uz bilo koju kromosomsku anomaliju, mozaicizam je prisutniji u rijetkih trisomija nego kod trisomija kromosoma 21, 18 i 13 (T21, T18 i T13).<sup>11</sup> Prilikom evaluacije performansi slučajevi mozaicizma bili su obuhvaćeni analizom na razini cijelog genoma jer je svrha te vrste probira prepoznavanje rijetkih autosomnih aneuploidija (rare autosomal aneuploidies, RAA).

### Učinkak osnovnog probira

Kod osnovnog probira anomalije obuhvaćaju T21, T18 i T13. Analizom su obuhvaćena ukupno 2243 jednoplodna i blizanačka uzorka. Svih sedam blizanačkih trudnoća točno je prepoznato kao T21 i nisu objavljene u sljedećoj tablici.

Tablica 8 Osjetljivost i specifičnost testa VeriSeq NIPT Solution v2 za prepoznavanje trisomija 21, 18 i 13 u osnovnom probiru za jednoplodne trudnoće (bez poznatih mozaicizama)

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

Učinkak analize u osnovnom probiru kao što prikazuje [Tablica 8](#) računa se uz izuzimanje podskupa od 64 uzorka zahvaćenih rijetkim aneuploidijama autosoma, djelomičnim delecijama ili dupliciranjima autosoma ili poznatim mozaicizmom. Ta 64 uzorka uključuju osam mozaika T21 i tri mozaika T18. Pet od tih 11 uzoraka prepoznato je kao pogođeno anomalijom koju je prepoznao VeriSeq NIPT Assay Software v2.

### Učinkak probira na razini genoma

Kod probira na razini genoma, pod svim anomalijama podrazumijevaju se trisomije, monosomije i djelomične delecije ili dupliciranja od 7 Mb ili veće. Uzorci za probir na razini genoma sastojali su se od 36 uzoraka s poznatim mozaicizmom. Testirano je ukupno 2307 jednoplodnih i blizanačkih uzoraka. Kod svih sedam blizanačkih trudnoća točno je prepoznato da se radi o anomaliji kromosoma 21 te nisu objavljene u sljedećim tablicama.

### Učinkak probira na razini genoma za sve anomalije

Tablica 9 Osjetljivost i specifičnost softvera VeriSeq NIPT Solution v2 za prepoznavanje svih anomalija u probiru na razini genoma (uključujući i poznate mozaicizme)

	Osjetljivost	Specifičnost
Procijenjeni % (n/N)	95,5 % (318/333)	99,34 % (1954/1967)
Dvostrani 95 % CI	92,7 %, 97,3 %	98,87 %, 99,61 %

## Učinak probira na razini genoma za rijetku autosomnu aneuploidiju

Tablica 10 Osjetljivost i specifičnost softvera VeriSeq NIPT Solution v2 prilikom probira na razini genoma za rijetku autosomnu aneuploidiju (Rare Autosomal Aneuploidy, RAA) (uključujući i poznate mozaicizme)

	Osjetljivost	Specifičnost
Procijenjeni % (n/N)	96,4 % (27/28)	99,80 % (2001/2005)
Dvostrani 95 % CI	82,3 %, 99,4 %	99,49 %, 99,92 %

## Učinak probira na razini genoma za djelomične delecije i dupliciranja

Tablica 11 Osjetljivost i specifičnost softvera VeriSeq NIPT Solution v2 prilikom probira na razini genoma za djelomične delecije i dupliciranja od 7 Mb i veće (uključujući i poznate mozaicizme)

	Osjetljivost	Specifičnost
Procijenjeni % (n/N)	74,1 % (20/27)	99,80 % (2000/2004)
Dvostrani 95 % CI	55,3 %, 86,8 %	99,49 %, 99,92 %

## Razlike u djelovanju osnovnih probira i probira na razini genoma

Metodologija računanja rezultata za česte trisomije i aneuploidije spolnih kromosoma ista je za osnovne probire i probire na razini genoma. U osnovnom probiru algoritam se primjenjuje samo na T21, T18 i T13. No, kod probira na razini genoma ta se metodologija proširuje tako da se analiziraju sve trisomije i rijetke aneuploidije autosoma te djelomična dupliciranja i delecije.

Dvije su razlike između izvješćivanja o učincima između osnovnog probira i onog na razini genoma. Kao prvo, kod probira na razini genoma uzorci s poznatim mozaicizmom za česte trisomije kao i za rijetke aneuploidije autosoma i djelomične delecije i dupliciranja uključeni su u mjerne rezultate učinaka. Kao drugo, kod probira na razini genoma može se prema želji izvijestiti o prepoznavanju djelomičnih dupliciranja ili delecija uz punu trisomiju. Prisutnost pune trisomije uz dodatak djelomičnog dupliciranja ili delecije može se vidjeti tako da se referencira LLR rezultat naveden u dodatnom izvješću.

### Uvrštavanje mozaika u probir na razini genoma

Mozaicizam se navodi kao ograničenje ove analize. Kad je prisutan mozaicizam, smanjen je fetalni signal anomalije, pa stoga može biti teže njeno prepoznavanje bez ugrožavanja cjelokupne specifičnosti analize. Međutim, kako je mozaicizam važniji za prošireni sadržaj, uzorci s mozaicizmom uvršteni su u probir na razini genoma.

Od 64 uzorka uvrštena u probir na razini genoma ali ne i u osnovni probir, za 36 uzoraka prepoznato je da prema kliničkom referentnom standardu sadrže mozaicizam. Od tih 36 uzoraka, 23 otkrivanja podudarala su se s kliničkim referentnim standardom.

### Djelomična delecija i dupliciranje nasuprot prepoznavanja aneuploidije cijelih kromosoma

VeriSeq NIPT Solution v2 nudi mogućnosti na izborniku za osnovni probir i probir na razini genoma. U osnovnom probiru rezultat ANOMALY DETECTED (Prepoznata anomalija) daje se samo kad je na kromosomima 21, 18 ili 13 prepoznata potpuna aneuploidija i ako su zadovoljeni sve mjerne vrijednosti kontrole kvalitete. Kod probira na razini genoma sustav prepoznaje aneuploidiju kod svih autosoma te slučajeve djelomične delecije i dupliciranja veličine najmanje 7 Mb.

Tijekom upotrebe probira na razini genoma sustav u izvješćivanju daje prednost slučajevima djelomične delecije ili dupliciranja pred prepoznavanjem cijelog kromosoma ako veličina djelomične delecije ili dupliciranja pokriva manje od ili je jednaka 75 % kromosoma na kojemu je slučaj prepoznat. Ako je regija s djelomičnom delecijom i dupliciranjem veća od 75 % veličine kromosoma, slučaj se prijavljuje kao puna trisomija ili monosomija cijelog kromosoma. Stoga delecije i dupliciranja znatne veličine koji veličinom ne premašuju 75 % veličine kromosoma mogu biti indikativni za aneuploidiju cijelog kromosoma.



Kod svih uzoraka LLR rezultat za klasifikaciju cijelog kromosoma dostupan je u dodatnom izvješću. LLR rezultat treba se prije tumačenja rezultata promatrati u svjetlu navedene gornje granice sa slike [Slika 2 na stranici 40](#). LLR rezultati na razini kromosoma koji premašuju gornju granicu dodatno podržavaju tumačenje koje odgovara aneuploidiji cijelog kromosoma.

U kliničkom ispitivanju bila su dva uzorka jednoplodne trudnoće sa znatnim dupliciranjima (jedno na kromosomu 21 i drugo na kromosomu 18) koji su veličinom bili manji od 75 % relativne veličine kromosoma (pogledajte [Tablica 12](#)). Oba slučaja bila su navedena kao djelomična dupliciranja, a ne puna trisomija tih kromosoma. LLR rezultati za te slučajeve bili su iznad gornje granice dosljedno sa zahvaćenim ishodom za punu trisomiju. Kod otkrivanja djelomičnog dupliciranja ili pune trisomije postupanje nakon pozitivnog otkrivanja NIPT-om jest ponuditi pacijentu testiranje radi potvrde putem prenatalnih dijagnostičkih testova.

Tablica 12 Primjeri slučajeva velikog dupliciranja prepoznati u probiru na razini genoma

	Klinička saznanja	Rezultat sustava na razini genoma	Veličina anomalije (Mb)	% kromosoma	LLR rezultati
Uzorak 1	Jedan plod s trisomijom 21	Djelomično dupliciranje na 21	22,50	48,9 %	19,43
Uzorak 2	Jedan plod s trisomijom 18	Djelomično dupliciranje na 18	47,00	60,2	12,99

Da biste saznali više o mjernim vrijednostima kontrole kvalitete koje se koriste prilikom otkrivanja rezultata aneuploidije, pročitajte *Vodič za softver VeriSeq NIPT Solution v2 (broj dokumenta: 100000067940)*.

## Spolni kromosomi

Rezultati za spolne kromosome dobiveni testom The VeriSeq NIPT Solution v2 uspoređeni su s ishodom prema kliničkom referentnom standardu te su sažeti u sljedećoj tablici. Izračunat je postotak čestotnosti za svaki spolni kromosom unutar svakog ishoda prema kliničkom referentnom standardu. Postotak čestotnosti izračunat je kao broj uzoraka kod kojih se prepoznavanje spolnog kromosoma od strane testa VeriSeq NIPT Solution v2 podudaralo s klasifikacijom prema kliničkom referentnom standardu, podijeljen s ukupnim brojem uzoraka s istom klasifikacijom prema kliničkom referentnom standardu.

Tablica 13 Postotak čestotnosti za fetalnu klasifikaciju spola\*

Fetalna klasifikacija spola		Fenotip prema fizičkom pregledu novorođenčeta		Citogenetski rezultati							
Prepoznato	Kariotip	Ženski spol	Muški spol	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY	Drugo**	Nedostaje
Anomalija nije otkrivena	XX	997	0	21	0	2	0	0	0	0	0
Anomalija nije otkrivena	XY	0	966	0	15	0	0	0	0	0	1
Anomalija otkrivena	XO	0	0	0	0	19	0	0	1	0	0
Anomalija otkrivena	XXX	0	0	0	0	0	17	0	0	1	0
Anomalija otkrivena	XXY	0	0	0	0	0	0	23	0	1	0
Anomalija otkrivena	XYY	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0
Ukupno		997	966	21	15	21	17	23	12	2	1
Postotak čestotnosti		100	100	100	100	90,5	100	100	91,7	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo

\* Pet blizanačkih trudnoća ispravno je klasificirano kao prisutnost kromosoma Y. Dvije trudnoće su ispravno klasificirane kao neprisutnost kromosoma Y.

\*\* Drugi citogenetski rezultati bili su XXXXX i XYY.

Pozitivna prediktivna vrijednost i negativna prediktivna vrijednost testa VeriSeq NIPT Solution v2  
 Pozitivna prediktivna vrijednost (positive predictive value, PPV) i negativna prediktivna vrijednost (negative predictive value, NPV) testa daju informaciju o njegovoj sposobnosti da utječe na kliničke odluke na temelju osjetljivosti, specifičnosti i predtestne vjerojatnosti da je fetus zahvaćen trisomijom (rasprostranjenost). PPV i NPV ovise o rasprostranjenosti, a rasprostranjenost tih aneuploidija može se razlikovati u raznim populacijama ispitanika, pa su PPV i NPV izračunati za niz smislenih vrijednosti rasprostranjenosti na temelju vrijednosti osjetljivosti i specifičnosti uočenih u osnovnom probiru (bez poznatih mozaicizama) kliničkog ispitivanja točnosti. **Tablica 17** utemeljena je na probiru na razini genoma (s poznatim mozaicizmima).

Tablica 14 Rasprostranjenost trisomije 21, PPV i NPV u osnovnom probiru (ne obuhvaća poznate mozaicizme)

Rasprostranjenost (%)	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

Tablica 15 Rasprostranjenost trisomije 18, PPV i NPV u osnovnom probiru (ne obuhvaća poznate mozaicizme)

Rasprostranjenost (%)	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

Tablica 16 Rasprostranjenost trisomije 13, PPV i NPV u osnovnom probiru (ne obuhvaća poznate mozaicizme)

Rasprostranjenost (%)	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

Tablica 17 Rasprostranjenost bilo koje anomalije, PPV i NPV u probiru na razini genoma (obuhvaća poznate mozaicizme)

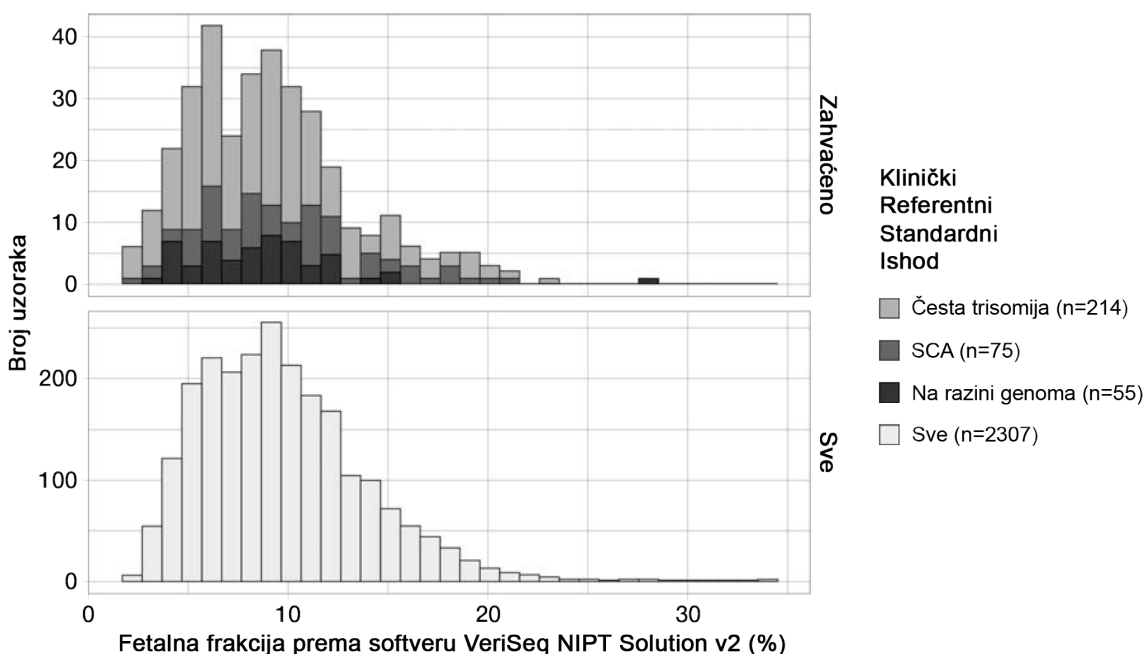
Rasprostranjenost (%)	PPV (%)	NPV (%)
0,01	1,42	> 99,99
0,02	2,81	> 99,99
0,05	6,74	> 99,99
0,10	12,64	> 99,99
0,20	22,45	99,99

Rasprostranjenost (%)	PPV (%)	NPV (%)
0,50	42,07	99,98
1,00	59,34	99,95
1,50	68,75	99,93
2,00	74,68	99,91

## Raspodjela fetalne frakcije

Raspodjela rezultata fetalne frakcije (FF) dobivenih testom VeriSeq NIPT Solution v2 za probir na razini genoma s mozaicizmima pokazani su kategorijom izlaznog rezultata prema Kliničkom referentnom standardu koji prikazuje Slika 1.

Slika 1 Raspodjela fetalne frakcije



5 uzoraka imalo je anomalije iz više kategorija.

Česta trisomija obuhvaća uzorke s trisomijom 21, 18 i/ili 13.

Na razini genoma obuhvaća uzorke s RAA ili djelomičnim delecijama i/ili dupliciranjima.

Rezultati FF-a kretali su se ukupno gledano od 2 % do 34 % s medijanom od 9 % i interkvartilnim rasponom (IQ) od 6 % do 12 %. Medijan rezultata FF-a za česte trisomije i slučajeve prepoznate tijekom probira na razini genoma iznosi 8 %, a za SCA-ove 9 %. Raspon rezultata FF-a bio je dosljedan za sve ishode. Nema očitog pomaka u raspodjeli FF-a među čestim trisomijama, SCA-ovima, slučajevima prepoznatim tijekom probira na razini genoma ni svih uzoraka u analizi na razini genoma.

## Učinak kod blizanačkih trudnoća

### Određivanje trisomije 13, 18 i 21 i djelovanja kromosoma Y u blizanačkim trudnoćama

Uslijed niske pojavnosti trisomije 21, 18 i 13 u blizanačkim trudnoćama samo je mali broj zahvaćenih uzoraka blizanaca bio dostupan za kliničko ispitivanje. Da bi se procijenio učinak softvera VeriSeq NIPT Solution v2 u blizanačkim trudnoćama, korišteni su računalni (*in silico*) modeli utemeljeni na promatranjima kliničkih uzoraka za simulaciju populacija blizanačkih trudnoća. Ta je simulacija bila dosljedna s namjenskom populacijom. Raspodjela fetalne frakcije određena je iz otprilike 4500 uzoraka blizanaca i uspoređena s raspodjelom iz oko 120 000 jednoplodnih uzoraka. Raspodjela fetalne frakcije uvjetovane statusom aneuploidije određen je iz navodnih jednoplodnih otkrivanja

(1044 trisomije 21, 307 trisomije 18 i 192 trisomije 13). Kombiniranje tih dviju raspodjela omogućilo je upućivanje na prepoznavanje aneuploidije u blizanaca. Simulirani su skupovi dizigotnih i monozigotnih blizanaca te je uzet ponderirani prosjek koji predstavlja njihovu pojavnost u namjenskoj populaciji (2 dizigotni: 1 monozigotni) radi procjene osjetljivosti. Za specifičnost simulirani su skupovi nezahvaćenih blizanaca.

Za svaku je kategoriju uzorka različito izračunata frakcija svakog simuliranog uzorka zahvaćena trisomijom (tj. zahvaćena frakcija):

- ▶ Kod monozigotnih blizanaca zahvaćena frakcija svakog uzorka postavljena je na 1.0 jer u toj situaciji trisomija pogađa oba blizanca.
- ▶ Kod dizigotnih blizanaca pretpostavljeno je da je samo jedan blizanac pogođen (iznimno su rijetki slučajevi u kojima su zahvaćena oba dizigotna blizanca). Vrijednosti zahvaćene frakcije simulirane su pomoću poznate raspodjele omjera fetalne frakcije utvrđene na temelju kliničkih uzoraka blizanaca različitog spola. Korišten je konzervativni pristup u skladu s kojim je pretpostavljeno da zahvaćeni blizanac uvijek ima najnižu fetalnu frakciju među blizancima. Primijenjen je faktor korekcije za fetalne frakcije koje su u prosjeku niže kod trudnoća s trisomijom 13 i 18.
- ▶ Kod nezahvaćenih blizanaca zahvaćena frakcija svakog uzorka postavljen je na nulu.

Kod blizanaca zahvaćenih ili trisomijom 18 ili trisomijom 13, smanjena je fetalna frakcija koja odgovara zahvaćenoj frakciji uzorka. Smanjenje je bilo proporcionalno prosječnom smanjenju fetalne frakcije zamijećene u kliničkim podacima kod jednoplodnih trudnoća s trisomijom 18 ili 13 u usporedbi s euploidnim jednoplodnim trudnoćama.

Ukupna fetalna frakcija kao i zahvaćena frakcija svakog simuliranog uzorka zatim je korištena za izračunavanje rezultata aneuploidije pomoću standardnog algoritma softvera VeriSeq NIPT Solution v2. Osjetljivost je izračunata određivanjem učestalosti slučajeva u kojima su rezultati aneuploidije za simulirane zahvaćene blizance bili iznad odgovarajuće granice za aneuploidiju. U skladu s time, specifičnost je izračunata određivanjem koliko su često rezultati za aneuploidiju za simulirane nezahvaćene blizance bili ispod odgovarajuće granične vrijednosti za aneuploidiju (Tablica 18). Utvrđeni su intervali pouzdanosti od 95 % na temelju broja stvarnih kliničkih blizanačkih uzoraka u izvornom skupu podataka, koji su bili klasificirani kao zahvaćeni ili nezahvaćeni relevantnom trisomijom.

Radi određivanja osjetljivosti kromosoma Y u blizanačkim uzorcima, simulirani su skupovi blizanaca XY/XY i XX/XY. Uzet je ponderirani prosjek koji predstavlja njihovu učestalost u namjenskoj populaciji (1 XY/XY: 1 XX/XY). Radi određivanja specifičnosti kromosoma Y u blizanaca, simuliran je skup blizanaca XX/XX. Ukupne vrijednosti fetalne frakcije simulirane su u skladu s poznatom raspodjelom fetalne frakcije u kliničkim uzorcima blizanaca.

Za blizance XY/XY i XX/XY utvrđeni su odgovarajući rezultati kromosoma Y pomoću poznatog odnosa između fetalne frakcije i rezultata kromosoma Y u kliničkim jednoplodnim uzorcima klasificiranim kao muškog spola. Samo u slučaju blizanaca XX/XY simulirane su zahvaćene (tj. muške) vrijednosti fetalne frakcije pomoću poznate raspodjele omjera fetalne frakcije primijećenih između blizanaca iz iste trudnoće, kao što je utvrđeno kliničkim uzorcima blizanaca različitog spola. Korišten je konzervativni pristup, pa je odabrana zahvaćena frakcija koja je odgovarala manjem od dvaju blizanaca. Za svaki simulirani uzorak XX/XY rezultat kromosoma Y pomnožen je sa zahvaćenom frakcijom.

U slučaju blizanaca XX/XX, rezultati kromosoma Y uzorkovani su iz rezultata dobivenih iz kliničkih jednoplodnih uzoraka klasificiranih kao ženskog spola. Rezultat kromosoma Y i ukupna fetalna frakcija zatim su upotrijebljeni za klasifikaciju svakog simuliranog uzorka kao onog u kojem je kromosom Y prisutan ili odsutan pomoću standardnog algoritma softvera VeriSeq NIPT Solution v2.

Osjetljivost je izračunata određivanjem učestalosti slučaja točne klasifikacije simuliranih blizanaca XY/XY ili XX/XY kao onih kod kojih je kromosom Y prisutan. Specifičnost je izračunata utvrđivanjem koliko su često simulirani blizanci XX/XX bili točno klasificirani kao da ne sadrže kromosom Y. Utvrđeni su intervali pouzdanosti od 95 % na temelju broja stvarnih kliničkih uzoraka blizanaca u izvornom skupu podataka koji su bili klasificirani kao oni kod kojih je kromosom Y prisutan ili odsutan.

Tablica 18 Određivanja za trisomiju 21, 18 i 13 u simuliranoj populaciji blizanačkih trudnoća

	Trisomija 21	Trisomija 18	Trisomija 13	Prisutnost kromosoma Y
Osjetljivost	96,4 %	95,7 %	93,6 %	> 99,9 %
dvostrani 95 % CI	(86,4 %, 98,9 %)	(68,3 %, 99,4 %)	(64,1 %, 98,9 %)	(99,9 %, > 99,9 %)

	Trisomija 21	Trisomija 18	Trisomija 13	Prisutnost kromosoma Y
Specifičnost	99,9 %	> 99,9 %	> 99,9 %	> 99,9 %
dvostrani 95 % CI	(99,8 %, > 99,9 %)	(99,9 %, > 99,9 %)	(99,9 %, > 99,9 %)	(99,7 %, > 99,9 %)

**Tablica 18** prikazuje određene točke i određene intervale pouzdanosti od 95 % za osjetljivost i specifičnost softvera VeriSeq NIPT Solution v2 u prepoznavanju trisomije 21, 18, 13 i prisutnosti kromosoma Y u simuliranoj populaciji blizanačkih trudnoća dosljednih namjenskoj populaciji. Intervali pouzdanosti utvrđeni su na temelju broja kontrola kvalitete koje su prošli klinički uzorci blizanaca klasificirani kao zahvaćeni ili nezahvaćeni relevantnom trisomijom. Izračun osjetljivosti podrazumijeva da su dvije trećine zahvaćenih trudnoća digizigotne s jednim zahvaćenim blizancem, dok je jedna trećina zahvaćenih blizanačkih trudnoća monozigotna sa zahvaćena oba blizanca.

Određivanja navedena u **Tablica 18** odnose se na samo dvije trudnoće. Zbog još manje učestalosti, podaci za višepodne trudnoće (troplodne ili više) nisu bili dovoljni za utvrđivanje odgovarajućih statističkih modela za određivanje točnosti prepoznavanja aneuploidije.

## Analitički učinak

### Preciznost

Da bi se ocijenila i kvantificirala preciznost analize, provedena je ponovna analiza podataka pomoću softvera za sustavnu analizu VeriSeq NIPT Solution v2 iz dvaju prethodnih ispitivanja pomoću radne stanice VeriSeq NIPT Solution:

- ▶ Ispitivanja ponovljivosti na raznim mjestima koje se sastojalo od tri obrade izvedene od strane tri rukovatelja na tri mjesta uz korištenje jedne serije reagensa za ukupno devet obrada.
- ▶ Ispitivanja preciznosti unutar laboratorija koje se sastojalo od 12 obrada pomoću dvije platforme ML STAR, dva sustava instrumenata za sekvenciranje i tri serije reagensa za sekvenciranje.

Cilj ispitivanja preciznosti bio je kvantifikacija preciznosti analize koja se tiče trisomije 21 (T21) i kromosoma Y te određivanje varijabilnosti između različitih instrumenata, kompleta za pripremu biblioteke i serija reagensa za sekvenciranje.

Stvoren je skup fetalne frakcije T21 od 5 % kombiniranjem cfDNA izdvojene iz majčine plazme trudne žene (s fetusom koji ima T21) i cfDNA izdvojene iz plazme žene koja nije trudna. Stvoren je i skup cfDNA s fetalnom frakcijom od 10 % majčinskog muškog spola (fetus XY). Panel uzorka za svako ispitivanje za svaku obradu obuhvaćao je 4 replikata skupa s fetalnom frakcijom od 5 % koja ima T21 i 20 replikata skupa cfDNA s fetalnom frakcijom od 10 % majčinskog muškog spola. Testiranje je provođeno 10 dana te je napravljena ukupno 21 obrada za kombinaciju dva ispitivanja.

Za određivanje odabrani su T21 i prisutnost kromosoma Y na temelju reprezentativnosti kliničkih uvjeta i složenosti prepoznavanja anomalije. Veličina kromosoma 21, kao najmanjeg ljudskog autosoma, izravno utječe na osjetljivost prepoznavanja T21, osobito pri niskim vrijednostima fetalne frakcije kao što su one korištene u ovom ispitivanju. Kromosom Y u obliku u kojem je prisutan u majčinoj plazmi isključivo je fetalnog podrijetla te ga stoga analiza lakše prepoznaje.

Uočena srednja i standardna devijacija LLR rezultata za kromosom 21 i normalizirane kromosomske vrijednosti za kromosom Y (NCV) pokazale su da je standardna devijacija replikata (SD) bila najveći izvor varijabilnosti. Varijacije između mjesta, instrumenata i serija reagensa dodale su neznatnu količinu varijabilnosti, kao što dokazuje razlika između ukupne SD i SD replikata u **Tablica 19** i **Tablica 20**.

Tablica 19 Sažetak standardne devijacije odziva sekvenciranja na raznim mjestima (ponovljivost)

Odziv	N	Srednja vrijednost	SD replikata	SD ukupne ponovljivosti*
LLR rezultat za kromosom 21	36	34,43	11,36	11,36
NCV za kromosom Y	180	190,56	7,96	10,20

\* Ukupna vrijednost obuhvaća varijabilnost zbog mjesta, rukovatelja, obrade, dana i replikata.

Tablica 20 Sažetak preciznosti odziva sekvenciranja unutar laboratorija

Odziv	N	Srednja vrijednost	SD replikata	SD ukupna unutar laboratorija*
LLR rezultat za kromosom 21	48	36,01	9,07	10,25
NCV za kromosom Y	240	198,68	7,63	7,82

\* Ukupna vrijednost obuhvaća varijabilnost zbog instrumenta za sekvenciranje, serije reagensa, rukovatelja, obrade, dana i replikata.

Provedeno je dodatno ispitivanje radi usporedbe preciznosti sekvenciranja rješenjem VeriSeq NIPT Solution v2 (ukupna standardna devijacija) uz korištenje verzije 2.0 u usporedbi s verzijom 2.5 protočne ćelije. Ispitivanje je obuhvaćalo dvije vrste protočnih ćelija (v2.0 i v2.5), tri serije kompleta za sekvenciranje, četiri instrumenta i dvije obrade sekvenciranjem po kombinaciji što daje ukupno 48 obrada jednog mjesta. Pripremljen je jedan skup za sekvenciranje iz pločica cfDNA koje su ručno pripremljene. Panel uzorka obuhvaćao je 4 replikata skupa s fetalnom frakcijom od 5 % koja ima T21 i 20 replikata skupa cfDNA s fetalnom frakcijom od 10 % majčinskog muškog spola (fetus XY). Rezultati tog ispitivanja predstavljeni su u [Tablica 21](#) i podržavaju tezu da nema razlike u preciznosti sekvenciranja uz korištenje protočnog članka v2.0 i v2.5.

Tablica 21 Sažetak preciznosti odziva sekvenciranja protočnog članka v2.0 u usporedbi s protočnim člankom v2.5

Odziv	Broj promatranja po verziji	SD ukupna za v2.0*	SD ukupna za v2.5*	Statistički rezultat**
LLR rezultat za kromosom 21	96	9,56	8,44	Statistički ekvivalent (p-vrijednost = 0,25)
NCV za kromosom Y	480	7,74	7,38	Statistički ekvivalent (p-vrijednost = 0,38)

\* Ukupna vrijednost obuhvaća varijabilnost zbog instrumenta za sekvenciranje, serije reagensa, obrade, dana i replikata.

\*\*Na temelju F-testa jednakosti varijanci (kvadrat standardne devijacije).

## Unakrsna kontaminacija

Unakrsna kontaminacija određena je kroz tijek rada pripreme uzorka uređaja VeriSeq NIPT Solution. Testirani su skupovi plazme žena koje nisu trudne (XX) i odraslih muškaraca (XY) prema uzorku šahovske ploče u formatu pločice s 96 jažica na 4 pločice. N = 48 za svaki ženski i muški uzorak po pločici za ukupno 192 ženska i 192 muška uzorka. Nijedan ženski uzorak nije pokazao pokrivenost kromosoma Y koja bi bila statistički veća od procijenjene pozadine, što znači da nije bilo unakrsne kontaminacije muškim uzorcima s iste pločice. U softveru VeriSeq NIPT Solution nije prepoznata unakrsna kontaminacija.

## Potencijalno ometajuće tvari

Određen je utjecaj potencijalno ometajućih tvari na VeriSeq NIPT Solution određivanjem učinka analize u prisutnosti takvih tvari.

U skupove majčinske plazme nezahvaćenih ženskih (fetus XX) trudnoća dodani su albumin, bilirubin, hemoglobin i trigliceridi (endogeni). Skupovi su testirani s dvije koncentracije svake od testnih tvari (n = 16 za svaku). Nisu zamijećeni ometajući utjecaji na učinak analize.

Tablica 22 Potencijalno ometajuće tvari (endogene)

Testna tvar	Niska testna koncentracija (mg/mL)	Visoka testna koncentracija (mg/mL)
Albumin	35	50
Bilirubin	0,01	0,15
Hemoglobin	100	200
Triglicerid	1,5	5

I prirodno prisutan majčinski genomska DNA (gDNA) u plazmi može potencijalno ometati učinak analize jer se može izdvojiti zajedno s fetalnom cfDNA. Genomske razine DNA od 1,6, 3,3 i 4,9 ng po uzorku (što odgovara 1., 2. i 3. standardnoj devijaciji iznad srednje očekivane vrijednosti koncentracije gDNA nakon 7 dana skladištenja pune krvi<sup>12</sup>)

dodane su u cfDNA izdvojenu iz majčinske plazme nezahvaćenih ženskih (fetus XX) trudnoća. Uzorci su zatim testirani u instrumentu VeriSeq NIPT Solution (n = 16 za svaku koncentraciju). Nisu zamijećeni ometajući utjecaji na učinak analize u prisutnosti povišenih razina gDNA.

Dvadeset potencijalno ometajućih tvari baziranih na lijekovima (egzogenih) koje se često koriste ili prepisuju tijekom trudnoće testirano je prema EP7-A2 (Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline-Second Edition). 20 potencijalnih interferenata kombinirano je u četiri skupa, dodano u majčinsku plazmu nezahvaćenih ženskih (fetus XX) trudnoća i testirano uređajem VeriSeq NIPT Solution (N = 16 za svaki skup). Nisu zamijećeni ometajući utjecaji na učinak analize u prisutnosti tih egzogenih tvari.

Tablica 23 Potencijalno ometajuće tvari (egzogene)

Skup 1	Skup 2	Skup 3	Skup 4
Acetaminofen	Difenhidramin	Albuterol	Cetirizin
Acetilcistein	Eritromicin	Bupropion	Dekstrometorfan
Bisoprolol	Gvaifenezin	Kofein	L-askorbinska kiselina
Citalopram	Heparin	Sertralin	Metoprolol
Desloratadin	Lidokain	Natrijev fluorid	Nadolol

## Granica prepoznavanja

Granica prepoznavanja (Limit of Detection, LOD) definira se kao razina fetalne frakcije koja odgovara 95-postotnoj vjerojatnosti prepoznavanja stanja koje se promatra, npr. T21. Da bi se odredio LOD uređaja VeriSeq NIPT Solution v2 za razna česta stanja, provedene su razna ispitivanja i statističke analize.

Vjerojatnost prepoznavanja stanja koje se prati u zahvaćenom uzorku koji se obrađuje uređajem VeriSeq NIPT Solution v2 prvenstveno ovisi o trima čimbenicima:

- ▶ fetalnoj frakciji
- ▶ dubini sekvenciranja
- ▶ veličini i složenosti genomske regije koja se proučava.

Ako pretpostavimo konstantnu dubinu sekvenciranja, lakše je prepoznati određenu aberaciju u uzorku s većim postotkom fetalne frakcije nego u uzorku s manjim postotkom fetalne frakcije. I obratno, ako pretpostavimo konstantnu fetalnu frakciju, lakše je prepoznati određenu aberaciju u uzorku s većom dubinom sekvenciranja nego u uzorku s manjom dubinom sekvenciranja. I na kraju, aberacije u manjim ili složenijim genomskim regijama teže se prepoznaju nego aberacije u većim ili manje složenim genomskim regijama, uz pretpostavku konstantne fetalne frakcije i dubine sekvenciranja.

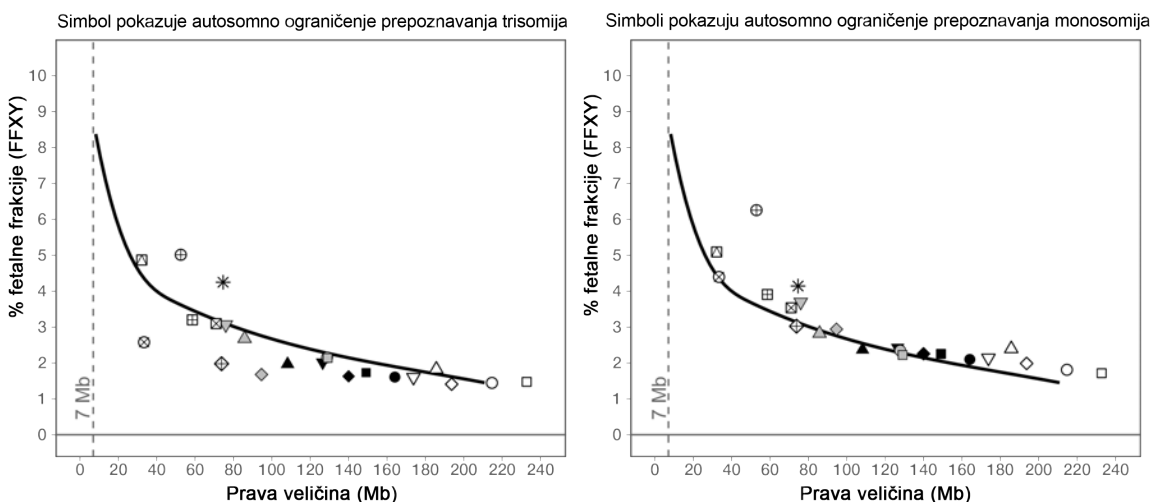
Da bi se odredio LOD za prepoznavanje T21, analizirani su uzorci koji se sastoje od mješavine uzoraka sa stvorenim skupom s T21 i nezahvaćenih uzoraka sa stvorenim skupom. Dvije vrste analita pomiješane su preko titrationske serije radi stvaranja skupa od sedam razina fetalne frakcije (0, 2, 3, 4, 5, 6 i 10 %). Svaku razinu predstavljalo je ukupno 10 replikata.

Da bi se dodatno povećala razlučivost rešetke fetalne frakcije za analizu LOD-a, podaci iz tog ispitivanja pojačani su podacima dobivenim razrjeđivanjem in silico (u računalnoj simulaciji). Učinci eksperimentalnog razrjeđivanja i titracije simulirani su kontroliranim miješanjem podataka dobivenih sekvenciranjem. Podaci dobiveni titracijom in silico pokrili su niz od 14 razina fetalne frakcije (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 i 4,50 %) uz 32 replikata za svaku razinu. Na dobivene podatke primijenjena je probit analiza da bi se utvrdio LOD za T21.

Neovisno o tome, razvijen je statistički model utemeljen na fetalnoj frakciji, dubini sekvenciranja i genomskoj veličini/složenosti koji predviđa vjerojatnost prepoznavanja bilo koje aberacije u bilo kojem uzorku. Taj je model utemeljen na podacima koji odgovaraju skupu od 1405 uzoraka XY. Utvrđeno je da je LOD za T21, kao što je predvidio taj model, sukladan s procjenom baziranom na probit analizi koja je prethodno opisana. Taj je statistički model korišten za određivanje vrijednosti LOD-a za aneuploidije na svim autosomima i za djelomične delecije i dupliciranja.

**Slika 2** prikazuje 95-postotnu vjerojatnost prepoznavanja za prosječne regije po veličini i autosomne granice prepoznavanja za sve trisomije i monosomije.

Slika 2 Vjerojatnost prepoznavanja od 95 % za prosječne regije po veličini za VeriSeq NIPT Solution v2



Chr	Simbol	Trisomija		Monosomija	
		Gornja granica LLR-a	LoD (%)	Gornja granica LLR-a	LoD (%)
1	○	7	1,44	13,2	1,80
2	□	9	1,47	13,6	1,71
3	◇	5	1,41	13,8	1,99
4	△	7	1,82	15,2	2,39
5	▽	7,6	1,60	17	2,14
6	●	7,3	1,60	15,4	2,09
7	■	6,6	1,73	14	2,25
8	◆	5,8	1,63	14,8	2,25
9	▲	8	1,97	13,6	2,37
10	▼	8,8	2,01	14,7	2,42
11	⊙	12,2	2,14	15,7	2,35

Chr	Simbol	Trisomija		Monosomija	
		Gornja granica LLR-a	LoD (%)	Gornja granica LLR-a	LoD (%)
12	▣	11,6	2,14	12,8	2,22
13	◇	3	1,68	16,5	2,94
14	△	12,7	2,68	14,7	2,82
15	▽	9,8	3,07	16,4	3,69
16	⊠	10,7	3,10	15,3	3,54
17	*	16,8	4,25	15,7	4,14
18	⊕	3	1,98	11,3	3,02
19	⊗	15,5	5,01	27,5	6,26
20	⊞	10,6	3,20	18,2	3,91
21	⊠	2,5	2,58	13,2	4,40
22	⊞	13,5	4,87	15,3	5,09

## Otklanjanje poteškoća

### Otklanjanje poteškoća s testom VeriSeq NIPT Solution v2

Neuspjeli način rada	Mogući rezultat	Tumačenje	Preporučeno djelovanje	Komentari
Nema dovoljno ulazne plazme	Pad uzorka na kontroli kvalitete	Volumen plazme nije dovoljan	Ponovno uzmite krv	Na temelju vizualnog pregleda volumena plazme.
Kvar na epruveti s krvlju	Krv se nije razdijelila na slojeve	Uzorak nije centrifugiran	Provjerite je li pokrenuta centrifuga i je li epruveta centrifugirana korištenjem odgovarajuće sile. Ponovno uzmite uzorak.	
		Nepravilno skladištenje ili transport uzorka (hemoliza uzorka)	Ponovno uzmite uzorak.	Smrznuti uzorci neće se razdvojiti. Nepravilni uvjeti transporta ili skladištenja mogu dovesti do hemolize uzorka.



Neuspjeli način rada	Mogući rezultat	Tumačenje	Preporučeno djelovanje	Komentari
Čep u uzorku / spor protok	Kontaminacija plazme	Pojedini uzorci mogu začepiti pločicu za povezivanje ako je uzorak plazme znatno kontaminiran	Pregledajte uzorak, pa ako je preostala plazma u epruveti crvena ili mlječna, otkazite uzorak i zatražite ponovno uzimanje uzorka. Ako se uzorak čini normalan, ponovno ga testirajte.	
	Preljevanje uzorka	Neodgovarajuća vizualna provjera svake epruvete radi utvrđivanja prikladnosti uzorka	Sve uzorke u obližnjim jažicama na koje je utjecalo prelijevanje proglasite nevaljanim.	Može ukazivati na nepravilan transport ili uvjete pohrane uzorka prije obrade. Neprikladne uzorke morate izuzeti iz obrade.
	Kvar na hardveru	Neodgovarajuće uzimanje materijala tijekom izdvajanja	Ponovno testirajte uzorak. Ako će se problem pojavljivati i na mjestima jažica s drugim uzorcima, obratite se službi za tehničku podršku tvrtke Illumina.	
Neuspjela kvantifikacija pri kontroli kvalitete	Neuspjela kvantifikacijska obrada – medijan serije je ispod minimuma	Nedostatan prinos postupka	Ponovite kvantifikaciju. Ako ni ponavljanje ne uspije, obratite se službi za tehničku podršku tvrtke Illumina.	Prolaz standarda u mjernim podacima krivulje ukazuje na probleme s pripremom biblioteke.
	Neuspjela kvantifikacijska obrada	Neuspjela standardna krivulja	Ponovite kvantifikaciju. Ako ni ponavljanje ne uspije, obratite se službi za tehničku podršku tvrtke Illumina.	Među čestim su uzrocima neuspjeha standardne krivulje nedovoljno otopljeni reagensi za kvantifikaciju, nedosljedni volumeni u jažicama uslijed prolijevanja i degradacija reagensa za kvantifikaciju DNA (npr. uslijed izlaganja svjetlosti).
Neuspjeh pri stvaranju skupova	Neuspjelo dovršetak stvaranja skupova uzoraka	Analiza stvaranja skupova ne može izračunati ispravne volumene stvaranja skupova	Ponovno odredite koncentraciju ciljnog skupa, ponovno obradite analizu stvaranja skupova.	Može se javiti kad svi uzorci u seriji imaju niske vrijednosti kvantifikacije, a postavili ste visoku koncentraciju skupa (obično veću od 3 – 5 pm).
Neuspjeh analize pojedinačnog uzorka pri kontroli kvalitete	Neuspjelo sekvenciranje pri kontroli kvalitete	Nema dovoljno ulaznog genetskog materijala ILI krivi prijenos tijekom rukovanja uzorcima ILI pogreška reagensa za sekvenciranje	Provjerite oznake na uzorcima. Provjerite kakav je bio sličan učinak kod prethodnih uzoraka u relativnom položaju na pločici. Ponovno testirajte uzorak.	Ukazuje na loše ulazne uzorke ili krivi prijenos na platformi ML STAR. Uzrok tome da nema dovoljno genetskog materijala može biti nedostatak DNA bez stanica u plazmi ili pak DNA utemeljena na stanicama uzrokuje pretjerano razrjeđivanje uzorka za sekvenciranje.
	Mali broj FF-a ili mali broj mjesta koja nisu izuzeta (Non-Excluded Sites, NES)	Nije generirano dovoljno podataka za precizno izvješće	Ponovite testiranje na plazmi.	

## Otklanjanje poteškoća u radu s radnom stanicom VeriSeq NIPT Microlab STAR

Korak postupka	Šifra pogreške	Dijaloški okvir pogreške	Opis	Korisničko rješenje
Stvaranje serije	EM0044	The Batch ID entered contains forbidden characters. (Uneseni ID serije sadrži zabranjene znakove.)	VeriSeq NIPT Solution v2 u svim poljima s podacima prihvaća samo brojeve, slova, podvlake i crtice.	Preimenujte seriju u naziv koji ne sadrži posebne tekstne znakove.
Stvaranje serije	EM0051	The Batch ID is greater than 26 characters in length. (ID serije duži je od 26 znakova.)	VeriSeq NIPT Solution v2 ograničava dužinu naziva serija na 26 znakova ili manje.	Preimenujte seriju u naziv koji je kraći od 26 znakova.
Stvaranje serije	EM0076	Unable to connect to VeriSeq Onsite Server v2 (Nije moguće povezivanje sa serverom VeriSeq Onsite Server v2)	VeriSeq Onsite Server v2 ne odgovara na zahtjeve za podacima programa Workflow Manager.	Provjerite sljedeće: 1. Je li ML STAR povezan s mrežom. 2. Je li VeriSeq Onsite Server v2 uključen. 3. Može li se ML STAR povezati sa serverom VeriSeq Onsite Server v2 (provjerite ping-zahtjevom). 4. Ako prethodno navedeni koraci ne riješe problem, pošaljite poruku e-pošte službi za tehničku podršku tvrtke Illumina. 5. Provjerite je li vakuumska boca za otpad više nego dopola puna. Ako jest, ispraznite bocu za otpad.
Stvaranje serije	EM0118	This batch has been failed and cannot be further processed. (Ta serija nije valjana i ne može se dalje obrađivati.)	Za navedenu je seriju već utvrđeno da nije valjana te se ona ne može dalje obrađivati.	Zapis o seriji na uređaju VeriSeq Onsite Server v2 ukazuje na to da odabrana serija nije valjana. Nije dopušten nastavak obrade. Stvorite drugu seriju sa željenim uzorcima.
Stvaranje serije	Nije primjenjivo	Već je dovršena obrada te serije. Would you like to repool? (Ta je serija već završila s obradom. Želite li ponovno stvoriti skup?)	Predmetna serija obrađena je kroz stvaranje skupova. Jedina obrada koja se može dopustiti jest ponovno stvaranje skupova.	Da biste ponovno stvorili skup, odaberite <b>Re-Pool</b> (Ponovno stvori skup). ILI Obustavite metodu i provjerite naziv skupa.
Izoliranje plazme	WP0087	Duplicate sample barcodes loaded. (Umetnuti su uzorci s dupliranim barkodom.)	U sustav su stavljeni uzorci s identičnim barkodom.	1. Pratite upite alata Workflow Manager da biste prepoznali duplirane uzorke. 2. Uklonite te uzorke te im promijenite naljepnicu ili ih zamijenite. 3. Ponovno umetnite uzorke.
Izoliranje plazme	EP0102	Samples specified in the Sample Sheet were not loaded. (Nisu umetnuti uzorci navedeni na listu uzoraka.)	Uzorci navedeni na listu uzoraka nisu uvršteni među umetnute barkodove.	1. Pratite upite alata Workflow Manager da biste prepoznali uzorke koji nedostaju. 2. U seriju dodajte uzorke koji nedostaju i ponovno umetnite uzorke. ILI Obustavite metodu, unesite potrebne izmjene na list uzoraka, ponovno pokrenite metodu.

Korak postupka	Šifra pogreške	Dijaloški okvir pogreške	Opis	Korisničko rješenje
Umetanje pločica	Nije primjenjivo	Venus Barcode Mask Error (Pogreška maske Venus za barkodove)	Workflow Manager provodi točno povezivanje pločice sa serijom pomoću maski Venus za barkodove.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Provjerite kako je smještena pločica i potvrdite je li smještena pravilno.</li> <li>2. Provjerite da je umetnuta pločica odgovarajuća za navedenu seriju.</li> </ol>
Izdvajanje cfDNA	WE0150	Pressure in the vacuum chamber is too low. (Tlak u vakuumskoj komori je prenizak.)	Workflow Manager neće nastaviti s radom ako je vrijednost tlaka vakuumske cijevi u mirovanju < 400 Torr.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Provjerite ima li zastoja ili drugih prepreka u vakuumskoj cijevi.</li> <li>2. Otvorite stezaljke za otpuštanje cijevi za otpad, pričekajte da padne tlak, posve zatvorite stezaljke za otpuštanje na cijevi.</li> <li>3. Provjerite jesu li vakuumski kontroler i pumpa uključeni.</li> <li>4. Ako time ne uklonite problem, obratite se službi za tehničku podršku tvrtke Illumina.</li> </ol>
	WE0153	Pressure in the vacuum chamber is too high. (Tlak u vakuumskoj komori je previsok.)	Ako je prije pokretanja vakuumske kontrole mjereni tlak vakuuma previsok, može doći do kvara sustava.	Na poleđini kontrolera provjerite jesu li svi vakuumski spojevi i cijevi učvršćeni.
	WE0996	Vacuum failed to seal. (Vakuumska brtva ne funkcionira.)	Sustav ne može vakuumski zabrtviti pločicu za povezivanje.	<p><b>NAPOMENA Nemojte odabrati OK (U redu) sve dok se ne riješi problem s brtvljenjem.</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Provjerite je li pločica za povezivanje u ravnini s vakuumskom granom. Rukom u rukavici i koristeći silu pritisnite pločicu za povezivanje prema dolje.</li> <li>2. Odaberite <b>OK (U redu)</b> da biste nastavili s izdvajanjem cfDNA.</li> <li>3. Ako se ta poruka o pogrešci prikaže više od triput tijekom obrade, pošaljite poruku e-pošte službi za podršku tvrtke Illumina.</li> </ol>
	WM0219	If Vacuum is on, manually rest the pump. (Ako je vakuum uključen, ručno stavite pumpu u mirovanje.)	Vakuum može ostati uključen nakon obustave metode tijekom izdvajanja.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Na vakuumskom kontroleru pritisnite gumb za uključivanje da biste isključili vakuum.</li> <li>2. Pričekajte 10 sekundi, a zatim ponovno pritisnite gumb za uključivanje da biste uključili vakuum.</li> </ol>
	EE0477	Pojavila se pogreška prilikom premještanja pločice. (iSWAP pogreška)	Ako se javi iSWAP pogreška (pad pločice, neuspjelo podizanje i slično), sustav će od korisnika zatražiti da ručno dovrši premještanje pločice.	<p>Pripazite da se pločica može upotrijebiti (nema prolijevanja materijala).</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ako to nije slučaj, obustavite obradu.</li> <li>- Ako je upotrebljiva, slijedite prikazane upute da biste ručno dovršili prijenos pločice.</li> </ul>
	EE0519	Scanned barcode does not match binding plate barcode on record. (Skenirani barkod ne podudara se s barkodom pločice za povezivanje u zapisu.)	Umetnuta pločica za povezivanje ne podudara se s barkodom uklonjene pločice.	Pripazite da se pločica koja se umeće podudara s barkodom u zapisu (pogledajte koji se barkod očekuje u zapisniku praćenja).

Korak postupka	Šifra pogreške	Dijaloški okvir pogreške	Opis	Korisničko rješenje
API	EA0372	Unable to connect to the data server. (Nije se moguće povezati s poslužiteljem podataka.)	VeriSeq Onsite Server v2 ne odgovara na zahtjeve za podacima programa Workflow Manager.	Provjerite sljedeće: 1. Je li ML STAR povezan s mrežom. 2. Može li se ML STAR povezati sa serverom VeriSeq Onsite Server v2 (provjerite ping-zahtjevom). 3. Je li VeriSeq Onsite Server v2 uključen.
	EA0774	Connection Error The API server connection failed to validate. (Pogreška u povezivanju – nije uspjela provjera valjanosti API veze sa serverom.)	VeriSeq Onsite Server v2 prestao je odgovarati na zahtjeve za podacima komponente Workflow Manager.	Provjerite sljedeće: 1. Je li ML STAR povezan s mrežom. 2. Može li se ML STAR povezati sa serverom VeriSeq Onsite Server v2 (provjerite ping-zahtjevom). 3. Je li VeriSeq Onsite Server v2 uključen.
	EA0780	403: Invalid Request The current transaction is not valid. (403: zahtjev nije valjan Trenutačna transakcija nije valjana.)	Poslani podaci krše logiku tjeka rada sustava.	Da biste saznali više, pogledajte pojedinosti o pogrešci. Među čestim su uzrocima predugi ulazni podaci ili upotreba znakova koji nisu na popisu prihvatljivih znakova.

## Reference

- 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, Nicolaidis KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2017 Apr 11. doi: 10.1002/uog.17484.
- 6 Bianchi D, Parker R, Wentworth J et al. DNA Sequencing versus Standard Prenatal Aneuploidy Screening. *N Engl J Med.* 2014;370(9):799-808. doi:10.1056/nejmoa1311037.
- 7 Benn P, Borrell A, Chiu RW, et al. "Position statement from the Chromosome Abnormality Screening Committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis." *Prenat Diagn* 35 (2015): 725-34.
- 8 Gregg AR, Skotko BG, Benkendorf JL, et al. Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med.* 2016; doi:10.1038/gim.2016.97.
- 9 Dondorp W, de Wert G, Bombard Y, et al. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy and beyond: challenges of responsible innovation in prenatal screening. *Eur J Hum Genet.* 2015 Nov;23(11):1438-50.
- 10 Grati, et al. "Fetoplacental mosaicism: potential implications for false-positive and false-negative noninvasive prenatal screening results." *Genetics in Medicine* 16 (2014): 620–624.
- 11 Wellesley, et al. "Rare chromosome abnormalities, prevalence and prenatal diagnosis rates from population-based congenital anomaly registers in Europe." *European Journal of Human Genetics* 20 (2012): 521 – 526.
- 12 Norton S, Lechner J, Williams T, Fernando M et al. A Stabilizing Reagent Prevents Cell-free DNA Contamination by Cellular DNA in Plasma During Blood Sample Storage and Shipping as Determined by Digital PCR. *Clin. I Biochem.* 2013;46: 1561–1565. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2013.06.002.
- 13 Bianchi D W, et al. "Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing." *Obstet Gynecol* 119 (2012): 890-901.
- 14 Ehrich M, et al. "Genome-wide cfDNA screening: clinical laboratory experience with the first 10,000 cases." *Genet Med* 19 (2017): 1332-1337.
- 15 Fiorentino F, et al. "The clinical utility of genome-wide cfDNA screening." *Prenat Diagn* 37 (2017): 593-601.
- 16 Pertile, MD, et al. "Rare autosomal trisomies, revealed by maternal plasma DNA sequencing, suggest increased risk of fetoplacental disease." *Sci Transl Med* 9 (2017): ean1240.

## Povijest revizija

Dokument	Datum	Opis promjene
Broj dokumenta 1000000078751 v06	kolovoza 2021.	Ažurirana adresa ovlaštenog predstavnika za EU.
Broj dokumenta 1000000078751 v05	prosinac 2020.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ažurirani odjeljci Načela postupka, Upozorenja i mjere opreza te Oznaka proizvoda dodatnim objašnjenjima radi zadovoljenja regulatornih zahtjeva.</li> <li>Manja ažuriranja sadržaja u protokolu radi podudaranja s trenutnim stilom i organizacijom tvrtke Illumina.</li> <li>Ispravljen opis kromosoma 21 iz "drugog po redu najmanjeg ljudskog autosoma" u "najmanjeg ljudskog autosoma" u odjeljku Preciznost koji se odnosi na analitička radna svojstva.</li> <li>Dodane izjave o oprezu koje se tiču nepravilne upotrebe rezervoara i rizika od amalgamacije uzoraka u odjeljcima Priprema izolata plazme i Tumačenje rezultata.</li> <li>Dodani novi brojevi poslužiteljskih i softverskih dijelova za izdanje novog modela poslužitelja i ažuriranja brojeva softverskih dijelova.</li> <li>Dodane mjere opreza u informacije o protokolima i otklanjanju poteškoća radi bavljenja prelijevanjem uzoraka i njegovim sprječavanjem.</li> <li>Ažurirani aktivni sastojci u odjeljku Standard kvantifikacije DNA u kutiji dodatne opreme reagensa radi usklađenosti sa sigurnosno-tehničkim listom.</li> <li>Ažurirane konvencije imenovanja modula Local Run Manager VeriSeq NIPT radi usklađenosti s ostalom dokumentacijom.</li> <li>Dodana povijest revizija.</li> </ul>
Broj dokumenta 1000000078751 v04	listopad 2020.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Manje ispravke.</li> </ul>
Broj dokumenta 1000000078751 v03	rujan 2020.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ažuriran popis materijala tako da sadrži specifikacije laboratorijskog posuđa zajedno s poznatim kompatibilnim opcijama.</li> </ul>
Broj dokumenta 1000000078751 v02	veljača 2020.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ažurirano predstavljanje informacija o kliničkim radnim svojstvima kako bi se bolje objasnile razlike između osnovnih probira i probira na razini genoma.</li> <li>Dodan novi odjeljak Razlike u djelovanju osnovnih probira i probira na razini genoma.</li> <li>Uklonjene kontradiktorne informacije o neobaveznosti dodatnog izvješća iz odjeljka Načela postupka.</li> <li>Ažurirana konvencija imenovanja softvera VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 u cijelom dokumentu radi stilske dosljednosti.</li> <li>Ažurirane adrese Illumine Australija i Nizozemska kako bi odražavale nedavne promjene.</li> </ul>
Broj dokumenta 1000000078751 v01	kolovoz 2019.	Uklonjen duplicirani korak u uputama za izdvajanje cfDNA koji je uzrokovala pogreška softvera za grafički prijelom.
Broj dokumenta 1000000078751 v00	svibanj 2019.	Početno izdanje.

## Patenti i žigovi

Ovaj dokument i njegov sadržaj vlasništvo su tvrtke Illumina, Inc. i njezinih povezanih društava („Illumina“) te su namijenjeni isključivo za ugovornu upotrebu klijentima u vezi s proizvodima opisanima u njemu. Dokument i njegov sadržaj ne smiju se upotrebljavati ni distribuirati ni u koju drugu svrhu niti se smiju na neki drugi način prenositi, otkrivati ili reproducirati bez prethodnog pisanog odobrenja tvrtke Illumina. Illumina ovim dokumentom ne prenosi nikakve licence zaštićene svojim pravom na patent, žig, autorskim pravom ili običajnim pravom ni slična prava bilo koje treće strane.

Kvalificirano i odgovarajuće obučeno osoblje mora se strogo i bez iznimki pridržavati uputa u ovom dokumentu da bi se zajamčila pravilna i sigurna upotreba proizvoda opisanih u njemu. Prije upotrebe proizvoda nužno je s razumijevanjem pročitati cjelokupan sadržaj dokumenta.

**AKO UPUTE U DOKUMENTU NE PROČITATE U CIJELOSTI TE IH SE NE PRIDRŽAVATE BEZ IZNIMKI, MOŽE DOĆI DO OŠTEĆENJA PROIZVODA, OZLJEDA KORISNIKA ILI DRUGIH OSOBA I DO OŠTEĆENJA DRUGE IMOVINE TE SE TIME PONIŠTAVAJU SVA JAMSTVA ZA PROIZVODE.**

ILLUMINA NE PREUZIMA ODGOVORNOST ZA ŠTETE NASTALE USLIJED NEPRAVILNE UPOTREBE PROIZVODA KOJI SU OPISANI U OVOM DOKUMENTU (UKLJUČUJUĆI DIJELOVE TIH PROIZVODA I SOFTVER).

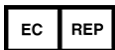
© 2021. Illumina, Inc. Sva prava pridržana.

Svi su žigovi vlasništvo tvrtke Illumina, Inc. i njezinih vlasnika. Konkretno informacije o žigovima potražite na adresi [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Podaci za kontakt



Illumina  
5200 Illumina Way  
San Diego, California 92122 SAD  
+1.800.809.ILMN (4566)  
+1.858.202.4566 (izvan Sjeverne Amerike)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com



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

### Australski sponzor

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

## Oznaka proizvoda

Sveobuhvatno objašnjenje simbola koji se mogu pojaviti na pakiranju i naljepnicama proizvoda potražite u legendi simbola za svoj komplet na web-mjestu [support.illumina.com](http://support.illumina.com).

Sažetak o sigurnosti i radnim svojstvima (Summary of Safety and Performance, SSP) nalazi se na web-mjestu <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>, nakon predstavljanja Europske baze podataka medicinskih uređaja (Eudamed), gdje je povezan s osnovnim UDI-DI-jem (0081627002NIPTRP).