

Uputstvo u pakovanju za VeriSeq NIPT Solution v2

ZA IN VITRO DIJAGNOSTIČKU UPOTREBU

Namena

VeriSeq NIPT Solution v2 je *in vitro* dijagnostički test koji se koristi kao skrining test za otkrivanje genetskih anomalija kod fetusa na nivou celog genoma iz uzoraka periferne pune krvi žena koje su trudne najmanje 10 nedelja. VeriSeq NIPT Solution v2 koristi sekvenciranje celog genoma za otkrivanje delimičnih duplikacija i delecija za sve autozome, kao i statusa aneuploidije za sve hromozome. Test nudi opciju zahteva za izveštavanje o aneuploidiji polnih hromozoma (SCA). Ovaj proizvod se ne sme koristiti kao jedina osnova za dijagnostiku ili druge odluke za vođenje trudnoće.

VeriSeq NIPT Solution v2 obuhvata: VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 za VeriSeq NIPT Microlab STAR, VeriSeq NIPT komplete za pripremu uzoraka i VeriSeq Onsite Server v2 sa softverom VeriSeq NIPT Assay Software v2. VeriSeq NIPT Solution v2 namenjen je za upotrebu sa instrumentom za sekvenciranje nove generacije.

Rezime i objašnjenje analize

Fetalne hromozomske abnormalnosti, naročito aneuploidija koja predstavlja abnormalan broj hromozoma, čest su razlog reproduktivnog neuspeha, urođenih anomalija, zaostajanja u razvoju i mentalnih poteškoća. Aneuploidija se javlja kod otprilike 1 od 300 živorođenih, uz mnogo veću učestalost u vezi sa spontanim pobačajima i mrtvorođenjem.^{1,2} Donedavno su postojale dve vrste prenatalnih testova za ove poremećaje: dijagnostičko testiranje ili skrining. Dijagnostičko testiranje obuhvata invazivne postupke kao što su amniocenteza ili biopsija horionskih resica. Ove metode testiranja se smatraju zlatnim standardom za otkrivanje fetalne aneuploidije. Međutim, oni su povezani sa rizikom od gubitka trudnoće u rasponu između 0,11% i 0,22%.³ Konvencionalni skrining testovi sa većim brojem markera ne nose opasnost od gubitka trudnoće jer su neinvazivni, ali su manje pouzdani od dijagnostičkih testova. Njihova uspešnost otkrivanja za trizomiju 21 varira u rasponu od 69% do 96% u zavisnosti od tipa skrininga, starosti majke i gestacijske starosti u trenutku testiranja.⁴ Još važnija je činjenica da imaju oko 5% lažno pozitivnih otkrivanja, što može dovesti do invazivnog dijagnostičkog testiranja radi potvrde i time do rizika od gubitka trudnoće uzrokovanog postupkom.⁴ Ultrazvučnim pregledima se takođe mogu otkriti anomalije hromozoma, ali uz još manju pouzdanost nego prethodno navedene metode.

Fetalna aneuploidija za hromozome 21, 18, 13, X i Y može se sa visokim nivoom tačnosti otkriti neinvazivnim prenatalnim testiranjem (noninvasive prenatal testing, NIPT) pomoću sekvenciranja celog genoma DNK bez ćelija (cfDNK) dobijene iz plazme majke u gestacijskom dobu od 10 nedelja ili kasnije. Nedavna metaanaliza više kliničkih ispitivanja pokazala je da ponderisane stope otkrivanja na skupovima i specifičnosti za trizomiju 21 i trizomiju 18 kod jednoplodnih trudnoća imaju sledeće vrednosti: trizomija 21 99,7% i 99,96%, trizomija 18 97,9% i 99,96%.⁵ Jedno ispitivanje je pokazalo da korišćenje NIPT-a kao primarnog skrininga za sve trudnoće može dovesti do 89% manje invazivnih postupaka radi potvrde.⁶

Imajući u vidu znatno smanjenje lažno pozitivnih rezultata NIPT-a u poređenju sa uobičajenim skriningom sa većim brojem markera, brojne profesionalne medicinske organizacije izdale su saopštenja kojima podržavaju nekoliko indikacija za upotrebu NIPT-a.

Konkretno, Međunarodno udruženje za prenatalnu dijagnostiku (International Society for Prenatal Diagnosis), Američki koledž akušera i ginekologa (American College of Obstetricians and Gynecologists, ACOG)/Udruženje za medicinu majke i fetusa (Society for Maternal Fetal Medicine, SMFM), Američki koledž medicinske genetike i genomike (American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG) i Evropsko udruženje humane genetike (European Society of Human Genetics)/Američko udruženje humane genetike (American Society of Human Genetics) podržavaju NIPT za sve trudnoće.^{7,8,9} Preporučuju se savetovanje pre testiranja, informisani pristanak i dijagnostičko testiranje radi potvrđivanja pozitivnih rezultata skrininga cfDNK.⁴

VeriSeq NIPT Solution v2 je neinvazivni in vitro dijagnostički (IVD) test koji koristi sekvenciranje fragmenata cfDNK na nivou celog genoma, dobijenih iz uzoraka majčine periferne pune krvi kod trudnica gestacijske starosti najmanje 10 nedelja. Test nudi dve opcije za tip skrininga: osnovni skrining i skrining celog genoma. Osnovni skrining pruža informacije o statusu aneuploidije samo za hromozome 21, 18, 13, X i Y. Skrining celog genoma otkriva delimične delecije i duplikacije svih autozoma i status aneuploidije za sve hromozome. Oba tipa skrininga sadrže opciju izveštavanja o aneuploidiji polnih hromozoma (sex chromosome aneuploidy, SCA) sa otkrivanjem pola fetusa ili bez njega. Opcija izveštavanja za SCA može se isključiti. Ako je opcija izveštavanja za SCA isključena, ne otkriva se ni pol fetusa. Više informacija o opcijama izveštavanja o polu potražite u *Vodiču za softver VeriSeq NIPT Solution v2 (br. dokumenta 100000067940)*.

Načela postupka

VeriSeq NIPT Solution v2 je automatizovano rešenje za NIPT testiranje u laboratoriji koje se sastoji od automatske pripreme uzoraka i analize podataka dobijenih sekvenciranjem. Kompleti za pripremu uzoraka VeriSeq NIPT Sample Prep Kits specijalizovani su reagensi za jednokratnu upotrebu koji se koriste sa platformom VeriSeq NIPT Microlab STAR za pripremu serija od 24, 48 ili 96 uzoraka za sekvenciranje nove generacije. Specijalizovani softver VeriSeq NIPT Assay Software v2 analizira podatke o celom genomu sa uparenim krajevima koji su dobijeni sekvenciranjem, pa se generiše izveštaj koji daje kvalitativne rezultate.

Tok rada se sastoji od sledećih postupaka: prikupljanja uzoraka, izolovanja plazme, ekstrahovanja cfDNK, pripreme biblioteka, kvantifikacije biblioteka, formiranja skupova biblioteka, sekvenciranja i analize, koji su ovde detaljnije opisani:

- ▶ **Prikupljanje uzoraka** – 7–10 ml majčine periferne pune krvi prikuplja se u epruvetu Streck cell-free DNA Blood Collection Tube (za DNK bez ćelija) koja sprečava liziranje ćelija i genomsku kontaminaciju i stabilizuje punu krv.
- ▶ **Izolovanje plazme** – u roku od 5 dana od uzimanja krvi, plazma se izoluje iz majčine periferne pune krvi pomoću standardnih tehnika centrifugiranja. VeriSeq NIPT Microlab STAR uvlači i ispušta plazmu na pločicu sa 96 dubokih otvora radi dalje obrade. U slučaju potrebe za ponovnim testiranjem, uzorke je posle obrade moguće ponovo zatvoriti i skladištiti na 4 °C dodatnih 5 dana (ukupno najviše 10 dana nakon uzimanja krvi).



OPREZ

Premašivanje gorepomenutog vremena skladištenja može negativno uticati na stopu neuspelih analiza pojedinačnih uzoraka.

- ▶ **Ekstrahovanje cfDNK** – prečišćavanje cfDNK od plazme postiže se adsorpcijom na pločici za vezivanje, pranjem pločice za vezivanje radi uklanjanja kontaminanata i ispiranjem.
- ▶ **Priprema biblioteka** – prečišćeni fragmenti cfDNK prolaze kroz postupak popravka krajeva kako bi se 5' i 3' prepusti pretvorili u „tupe“ krajeve. Zatim se 3' krajevima dodaje dezoksiadenozin nukleotid radi stvaranja prepusta od jedne baze. Indeksirani adapteri koji sadrže dezoksitimidin 3' prepust od jedne baze zatim se ligacijom dodaju na obrađene fragmente cfDNK. DNK ligaza se prečišćava pomoću reverznih imobilizacionih zrnaca u čvrstoj fazi. Svaki uzorak u skupu od 24, 48 ili 96 uzoraka dobija jedinstveni indeksirani adapter. Adapteri imaju 2 svrhe:
 - ▶ Indeksi omogućavaju identifikovanje uzoraka prilikom daljeg sekvenciranja.
 - ▶ Adapteri indeksa sadrže sekvence koje omogućavaju fiksiranje biblioteka na tvrdoj površini ćelije toka za sekvenciranje radi generisanja klastera i daljeg sekvenciranja.
- ▶ **Kvantifikacija** – proizvod biblioteka se kvantifikuje pomoću fluorescentne boje u koncentraciji određenoj poređenjem sa standardnom krivom za DNK.
- ▶ **Formiranje skupova biblioteka i sekvenciranje** – biblioteka uzorka se sastavljaju u skupove od 24 ili 48 uzoraka u prilagođenim količinama kako bi se varijacije u pokrivenosti svele na minimum. Svaki skup se zatim sekvencira pomoću instrumenta za sekvenciranje nove generacije.
- ▶ VeriSeq NIPT Solution v2 ne obuhvata opremu ni potrošni materijal za sekvenciranje.

- ▶ **Analiza** – analizu za svaki uzorak čini sledeće:
 - ▶ Identifikacija fragmenata biblioteke prema sekvenci indeksa i poravnanje očitavanja uparenih krajeva u odnosu na referentni humani genom.
 - ▶ Procena fetalne frakcije biblioteke kombinovanjem informacija iz raspodela dužina i genomskih koordinata fragmenata biblioteke.
 - ▶ Nakon uzimanja u obzir poznatih otklona, statistički model otkriva regione genoma koji su malo ili mnogo zastupljeni u biblioteci, na način koji je dosledan sa anomalijom na procenjenom nivou fetalne frakcije.
 - ▶ NIPT izveštaj pruža rezime rezultata za izabrani meni za testiranje, pri čemu se uz procenu fetalne frakcije za uzorke koji su prošli kontrolu kvaliteta navodi „ANOMALY DETECTED“ (Anomalija otkrivena) ili „NO ANOMALY DETECTED“ (Anomalija nije otkrivena).
 - ▶ Dodatni izveštaj pruža kvantitativne pokazatelje koji karakterišu svaku otkrivenu anomaliju.

Ograničenja postupka

- ▶ VeriSeq NIPT Solution v2 je skrining test i ne sme se posmatrati izolovano od drugih kliničkih saznanja i rezultata testiranja. Zaključci o stanju fetusa i odluke o vođenju trudnoće ne smeju se zasnivati samo na rezultatima NIPT skrininga.⁷
- ▶ VeriSeq NIPT Solution v2 izveštava o sledećem:
 - ▶ Osnovni skrining testira povećan broj hromozoma 13, 18 i 21.
 - ▶ Skrining celog genoma testira malu ili veliku zastupljenost svih autozoma, uključujući delimične delecije i duplikacije veličine najmanje 7 Mb.
 - ▶ Kada se kod jednoplodnih trudnoća izabere „Yes“ (Da) ili SCA kao opcija izveštavanja o polu, mogu se prepoznati sledeće anomalije polnih hromozoma: XO, XXX, XXY i XYY.
 - ▶ Kada se kod jednoplodnih trudnoća izabere „Yes“ (Da) kao opcija izveštavanja o polu, izveštava se o polu fetusa.
 - ▶ Prisutnost hromozoma Y u blizanačkim trudnoćama.
- ▶ Dokazi o osetljivosti i specifičnosti testa odnose se na jednoplodne i blizanačke trudnoće. Ova uputstva za upotrebu ne sadrže podatke o osetljivosti ili specifičnosti za troplodne i druge višepodne trudnoće.
- ▶ VeriSeq NIPT Solution v2 nije namenjen za otkrivanje poliploidija, na primer triploidije.
- ▶ VeriSeq NIPT Solution v2 nije namenjen za otkrivanje uravnoteženih preraspodela hromozoma.
- ▶ Za ovu analizu su potrebni uzorci majčine periferne pune krvi trudnica gestacijske starosti najmanje 10 nedelja.
- ▶ Kod osnovnog skrininga, test VeriSeq NIPT Solution v2 traži specifične abnormalnosti hromozoma. Rezultati koji glase „NO ANOMALY DETECTED“ (Anomalija nije otkrivena) ne otklanjaju mogućnost hromozomskih abnormalnosti testiranih hromozoma. Negativan rezultat ne otklanja mogućnost da u trudnoći postoje druge hromozomske abnormalnosti, genetske bolesti ili urođene anomalije (npr. defekt neuralne tube).
- ▶ Kod skrininga celog genoma, delecije i duplikacije značajne veličine koje čine manje od 75% veličine hromozoma mogu biti indicacija za aneuploidiju celog hromozoma.
- ▶ Kod skrininga celog genoma, određeni regioni su izuzeti iz analize. Spisak takvih regiona na „crnoj listi“ dostupan je na veb-sajtu službe za podršku kompanije Illumina. Otkrivanje genomskih anomalija obavlja se samo na regionima koji nisu izuzeti.
- ▶ Izveštavanje o polu fetusa nije dostupno u svim regionima zbog lokalnih odredbi koje regulišu pitanje određivanja pola.
- ▶ Rezultati testa mogu biti ograničeni određenim faktorima u vezi sa majkom i fetusom, uključujući, bez ograničenja, sledeće:
 - ▶ nedavna transfuzija krvi data majci
 - ▶ transplantacija organa majke
 - ▶ hirurški zahvat obavljen na majci
 - ▶ imunoterapija majke ili terapija matičnim ćelijama
 - ▶ malignitet kod majke

- ▶ mozaicizam kod majke
- ▶ fetoplacentalni mozaicizam
- ▶ smrt fetusa u materici
- ▶ sindrom nestajućeg blizanca

Komponente proizvoda

VeriSeq NIPT Solution v2 (br. dela 20030577) sastoji se od sledećih kompleta za pripremu uzoraka:

- ▶ Komplet za pripremu uzoraka VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (24 uzorka) (br. dela 20025895)
- ▶ Komplet za pripremu uzoraka VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (48 uzoraka) (br. dela 15066801)
- ▶ Komplet za pripremu uzoraka VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (96 uzoraka) (br. dela 15066802)

VeriSeq NIPT Solution v2 (br. dela 20030577) sastoji se od sledećih softverskih komponenti:

- ▶ Softvera VeriSeq NIPT Assay Software v2 (br. dela 20047024), koji je unapred instaliran na VeriSeq Onsite Server v2
 - ▶ Servera VeriSeq Onsite Server v2 (br. dela 20028403 ili 20047000) ili postojećeg servera VeriSeq Onsite Server (br. dela 15076164 ili 20016240) koji je nadograđen na v2
- ▶ Alatke VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 (br. dela 20044988), koja je unapred instalirana na VeriSeq NIPT Microlab STAR
 - ▶ Platforme VeriSeq NIPT Microlab STAR (br. dela Hamilton Company Reno: 95475-01 (115V) i 95475-02 (230V), Hamilton Company Bonaduz: 806288)
- ▶ Modula Local Run Manager VeriSeq NIPT (br. dela 20044989)

Reagensi

Priloženi reagensi

Illumina dostavlja sledeće reagense: komplete za pripremu uzoraka VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (24 uzorka) (br. dela 20025895), VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (48 uzoraka) (br. dela 15066801) i VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (96 uzoraka) (br. dela 15066802). Kompleti VeriSeq NIPT Sample Prep Kit konfigurisani su za korišćenje sa platformom ML STAR (br. dela 95475-01, 95475-02 ili 806288), koju dostavlja kompanija Hamilton.

Priprema uzoraka VeriSeq NIPT Sample Prep, kutija za ekstrahovanje

Tabela 1 VeriSeq NIPT kutija za ekstrahovanje(24) i (48), br. dela 20025869 i 15066803

Naziv reagensa na nalepnici	Broj kontejnera u kompletu	Aktivni sastojci	Skladištenje
Lysis Buffer (pufer za liziranje)	1	Gvanidin-hidrohlorid u puferovanom vodenom rastvoru	Od 15 °C do 30 °C
Wash Buffer I (pufer za ispiranje)	1	Gvanidin-hidrohlorid i izopropil alkohol u puferovanom vodenom rastvoru	Od 15 °C do 30 °C
Wash Buffer II (pufer za ispiranje)	1	Puferovan vodeni rastvor koji sadrži soli	Od 15 °C do 30 °C
Elution Buffer (pufer za ispiranje)	1	Puferovan vodeni rastvor	Od 15 °C do 30 °C
Pufer sa proteinazom	1	Glicerol u puferovanom vodenom rastvoru	Od 15 °C do 30 °C
Proteinaza K	3	Liofilizovana proteinaza K	Od 15 °C do 30 °C

Tabela 2 VeriSeq NIPT kutija za ekstrakovanje (96), br. dela 15066807

Naziv reagensa na nalepnici	Broj kontejnera u kompletu	Aktivni sastojci	Skladištenje
Lysis Buffer (pufer za liziranje)	1	Gvanidin-hidrohlorid u puferovanom vodenom rastvoru	Od 15 °C do 30 °C
Wash Buffer I (pufer za ispiranje)	1	Gvanidin-hidrohlorid i izopropil alkohol u puferovanom vodenom rastvoru	Od 15 °C do 30 °C
Wash Buffer II (pufer za ispiranje)	2	Puferovan vodeni rastvor koji sadrži soli	Od 15 °C do 30 °C
Elution Buffer (pufer za ispiranje)	1	Puferovan vodeni rastvor	Od 15 °C do 30 °C
Pufer sa proteinazom	1	Glicerol u puferovanom vodenom rastvoru	Od 15 °C do 30 °C
Proteinaza K	4	Liofilizovana proteinaza K	Od 15 °C do 30 °C

Priprema uzoraka VeriSeq NIPT Sample Prep, kutija za pripremu biblioteke

Tabela 3 VeriSeq NIPT kutija za pripremu biblioteke (24) i (48), br. dela # 20026030 i 15066809

Naziv reagensa na nalepnici	Broj kontejnera u kompletu	Aktivni sastojci	Skladištenje
End Repair Mix	1	DNK polimeraza i dNTP-ovi u puferovanom vodenom rastvoru	Od -25 °C do -15 °C
A-Tailing Mix	1	DNK polimeraza i dATP u puferovanom vodenom rastvoru	Od -25 °C do -15 °C
Ligation Mix	1	DNK ligaza u puferovanom vodenom rastvoru	Od -25 °C do -15 °C
Pufer za hibridizaciju	1	Puferovan vodeni rastvor	Od -25 °C do -15 °C
Pločica VeriSeq NIPT DNA Adapter Plate	1	Oligonukleotidi u puferovanom vodenom rastvoru	Od -25 °C do -15 °C

Tabela 4 VeriSeq NIPT kutija za pripremu biblioteke (96), br. dela 15066810

Naziv reagensa na nalepnici	Broj kontejnera u kompletu	Aktivni sastojci	Skladištenje
End Repair Mix	1	DNK polimeraza i dNTP-ovi u puferovanom vodenom rastvoru	Od -25 °C do -15 °C
A-Tailing Mix	2	DNK polimeraza i dATP u puferovanom vodenom rastvoru	Od -25 °C do -15 °C
Ligation Mix	2	DNK ligaza u puferovanom vodenom rastvoru	Od -25 °C do -15 °C
Pufer za hibridizaciju	1	Puferovan vodeni rastvor	Od -25 °C do -15 °C
Pločica VeriSeq NIPT DNA Adapter Plate	1	Oligonukleotidi u puferovanom vodenom rastvoru	Od -25 °C do -15 °C

Priprema uzoraka VeriSeq NIPT Sample Prep, kutija sa dodatnim priborom

Tabela 5 VeriSeq NIPT kutija sa dodatnim priborom, br. dela 15066811

Naziv reagensa na nalepnici	Broj kontejnera u kompletu	Aktivni sastojci	Skladištenje
Pločica za vezivanje DNK	1	Propilenska mikropločica sa modifikovanom silikonskom membranom	Od 2 °C do 8 °C
Pufer za ponovnu suspenziju	1	Puferovan vodeni rastvor	Od 2 °C do 8 °C
Zrnca za prečišćavanje uzorka	1	Paramagnetna zrnca u čvrstoj fazi u puferovanom vodenom rastvoru	Od 2 °C do 8 °C
Reagens za kvantifikaciju DNK	1	Interkalirajuća boja za DNK u DMSO-u	Od 2 °C do 8 °C
Standard kvantifikacije DNK	1	dsDNA standard (double-stranded DNA), standardna dvolančana DNK u puferovanom vodenom rastvoru	Od 2 °C do 8 °C

Priprema uzoraka VeriSeq NIPT Sample Prep, epruvete i nalepnice za tok rada

Tabela 6 Epruvete i nalepnice za tok rada, br. dela 15071543

Naziv stavke na nalepnici	Broj stavki u kompletu	Skladištenje
Nalepnica (LBL) – bar-kod pločice	9	Od 15 °C do 30 °C
Nalepnica (LBL) – bar-kod pločice sa dubokim otvorima	12	Od 15 °C do 30 °C
Epruveta (TB) – prazna epruveta za formiranje skupa	5	Od 15 °C do 30 °C

Reagensi koji nisu priloženi

Obavezni reagensi, nisu priloženi

- ▶ Reagensi i potrošni materijal za sekvenciranje potrebni za sistem za sekvenciranje nove generacije (NGS)
- ▶ Voda bez DNaze i RNaze
- ▶ Etanol, 100% (čistoće 200) za molekularnu biologiju



NAPOMENA

Etanol koji nije namenjen za molekularnu biologiju može negativno da utiče na obavljanje analize.

Opcionalni reagensi, nisu priloženi

- ▶ Dulbecco fosfatni pufer rastvor (DPBS) za kontrolu bez predloška (eng. no template controle – NTC)

Skladištenje i rukovanje

- 1 Sobna temperatura se definiše kao temperatura od 15 °C do 30 °C.
- 2 Svi reagensi su namenjeni samo za jednokratnu upotrebu. Kada se reagensi pripreme za korišćenje, moraju se odmah upotrebiti.
- 3 Ako je neko pakovanje ili sadržaj komponenti sistema VeriSeq NIPT Solution oštećen ili kompromitovan, obratite se korisničkoj podršci kompanije Illumina.
- 4 Kada se skladište kao što je navedeno, reagensi su stabilni do datuma isteka roka trajanja navedenog na oznakama na kompletima. Uslove skladištenja potražite u koloni „Skladištenje“ u tabelama u delu *Priloženi reagensi na stranici 4*. Ne koristite reagense kojima je istekao rok trajanja.

- 5 Promene fizičkog izgleda priloženih reagensa mogu upućivati na propadanje materijala. Ako dođe do primena u fizičkom izgledu (npr. očigledne promene boje reagensa ili vidljiva zamućenost uz kontaminaciju mikrobima), nemojte koristiti reagense.
- 6 Pridržavajte se sledećih najboljih praksi kada rukujete zrnima za prečišćavanje uzoraka:
 - ▶ Nikada ne zamrzavajte zrnca.
 - ▶ Sačekajte da zrnca dostignu sobnu temperaturu pre upotrebe.
 - ▶ Neposredno pre upotrebe vorteksujte zrnca dok ne budu dobro suspendovana i dok ne dostignu homogenu boju.
- 7 Pufer za liziranje, puferi za ispiranje Wash Buffer I, Wash Buffer II i Elution Buffer, kao i pufer sa proteinazom mogu oformiti vidljiv talog ili kristale. Pre upotrebe ih energično vorteksujte, a zatim vizualno proverite da li ima taloga.
- 8 Nikada ne zamrzavajte punu krv nakon prikupljanja.
- 9 Sekvencirajte biblioteke što pre nakon formiranja skupova. Skupovi biblioteka su stabilni najviše 7 dana na temperaturi od $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nije potrebna dodatna denaturacija ako su skladišteni tokom tog perioda i u navedenim uslovima.

Oprema i materijali

Obavezna oprema i materijali koji nisu priloženi

Obavezna oprema, nije priložena

Oprema	Dobavljač
Jednokanalne pipete 20 μl	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Jednokanalne pipete 200 μl	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Jednokanalne pipete 1000 μl	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Držač za pipete	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Frižider, $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $8\text{ }^{\circ}\text{C}$	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Zamrzivač, $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Mikrocentrifuga	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Vortex mešalica	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Sklop centrifuge i rotora za epruvete za uzimanje krvi	
Preporučeno: <ul style="list-style-type: none"> • Centrifuga iz serije Allegra X12R, 1600 g • Allegra Centrifuge GH-3.8 Rotor sa posudama • Poklopci za posude Allegra centrifuge, komplet od dva komada • Sklop adaptera za Allegra centrifugu, 16 mm, komplet od četiri komada 	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: <ul style="list-style-type: none"> • Centrifuga sa hlađenjem brzine do $1600 \times g$ sa opcijom bez kočenja • Rotor sa oscilirajućim posudama • Umeći za posude, kapaciteta 24, 48 ili 96 epruveta, minimalne dubine 76 mm • Adapteri umetaka za epruvete za uzimanje krvi dimenzija $16 \times 100\text{ mm}$ 	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Sklop centrifuge i rotora za mikropločice	

Oprema	Dobavljač
<p>Preporučeno:</p> <ul style="list-style-type: none"> Sorvall Legend XTR centrifuga HIGHPlate 6000 rotor za mikropločice Bilo koja od sledeće dve potporne baze za mikropločice: <ul style="list-style-type: none"> MicroAmp postolje sa 96 otvora Nosač PCR pločice sa 96 otvora 	<p>Thermo Fisher Scientific, kataloški broj 75004521 (120 V) ili kataloški broj 75004520 (230 V)</p> <p>Thermo Fisher Scientific, kataloški broj 75003606</p> <p>Thermo Fisher Scientific, kataloški broj 4379590</p> <p>Thermo Fisher Scientific, kataloški broj AB-0563/1000</p>
<p>Ekvivalent:</p> <ul style="list-style-type: none"> Centrifuga ubrzanja do 5600 × g Rotor sa oscilirajućom pločicom i nosačima pločica sa 96 otvora, minimalna dubina 76,5 mm Potporna baza za mikropločice 	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
<p>Jedan od sledećih čitača mikropločica (fluorometar) sa softverom SoftMax Pro v6.2.2 ili novijim:</p> <ul style="list-style-type: none"> Gemini XPS SpectraMax M2 	<p>Molecular Devices, broj dela XPS</p> <p>Molecular Devices, broj dela M2</p>
SpectraMax High-Speed USB, serijski adapter	Molecular Devices, broj dela 9000-0938
<p>Termički cikler sledećih specifikacija:</p> <ul style="list-style-type: none"> Poklopac koji se zagreva Temperaturni raspon od 4 °C do 98 °C Temperaturna tačnost ± 2 °C Minimalni korak pojačavanja 2 °C/s Kompatibilan s Twin.tec PCR pločicom sa 96 otvora, pune širine 	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
VeriSeq NIPT MicroLab STAR	Hamilton, broj dela 95475-01 (115 V), broj dela 95475-02 (230 V) ili broj dela 806288 (za Hamilton Company Bonaduz)
<p>Sistem za sekvenciranje nove generacije (NGS) sa sledećim mogućnostima:</p> <ul style="list-style-type: none"> sekvenciranje 2 × 36 bp sa uparenim krajevima kompatibilnost sa adapterima VeriSeq NIPT Sample Prep sa dvostrukim indeksom za pripremu uzoraka automatsko generisanje .BCL datoteka dvokanalna hemija 400 miliona očitavanja uparenih krajeva po obradi kompatibilnost sa softverom VeriSeq NIPT Assay Software v2 <p>ili sistemom za sekvenciranje NextSeq 550Dx.</p>	Dobavljač instrumenta ili Illumina, broj dela 20005715
<p>Ako se koristi sistem za sekvenciranje NextSeq 550Dx:</p> <ul style="list-style-type: none"> NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5, 75 ciklusa 	Illumina, broj dela 20028870
VeriSeq Onsite Server v2 ili nadograđeni VeriSeq Onsite Server	Illumina, broj dela 20028403 ili 20047000 (v2) ili broj 15076164 ili broj 20016240 (nadograđeno)

Opcionalna oprema, nije priložena

Oprema	Dobavljač
Pluggo sistem za uklanjanje čepova	LGP Consulting, broj dela 4600 4450
SpectraMax SpectraTest FL1 fluorescentna pločica za validaciju	Molecular Devices, broj dela 0200-5060
Obrač/rotator epruveta, epruvete od 15 ml, 40 obr./min., 100–240 V	Thermo Scientific, kataloški broj 88881001 (SAD) ili kataloški broj 88881002 (EU)

Obavezan materijal koji nije priložen

Potrošni materijal	Dobavljač
Provodni nesterilni nastavci sa filterima zapremine 1000 µl	Hamilton, broj dela 235905
Provodni nesterilni nastavci sa filterima zapremine 300 µl	Hamilton, broj dela 235903
Provodni nesterilni nastavci sa filterima zapremine 50 µl	Hamilton, broj dela 235948
Rezervoar sa dubokim otvorima sledećih specifikacija: <ul style="list-style-type: none"> • Format mikropločice SLAS 1-2004 sa 96 otvora piramidalnog ili konusnog dna minimalnog kapaciteta 240 ml. • Polipropilen sa slabim vezivanjem DNK za sve kontaktne površine uzorka. • Interne dimenzije (nivo tečnosti) kompatibilne su sa automatizovanim koracima uvlačenja i ispuštanja uređaja VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Dimenzije visine kompatibilne su sa automatizovanim kretanjima uređaja VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora Kompatibilni rezervoari: <ul style="list-style-type: none"> • Corning Axygen, broj proizvoda RES-SW96-HP-SI • Agilent, broj proizvoda 201246-100
Posuda za reagense sledećih specifikacija: <ul style="list-style-type: none"> • Posuda koja se bezbedno postavlja u nosač uređaja VeriSeq NIPT Microlab STAR sa suženim dnom i minimalnim kapacitetom od 20 ml. • Polipropilen bez RNaze/DNaze. • Interne dimenzije (nivo tečnosti) kompatibilne su sa automatizovanim koracima uvlačenja i ispuštanja uređaja VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Dimenzije visine kompatibilne su sa automatizovanim kretanjima uređaja VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora Kompatibilne posude: <ul style="list-style-type: none"> • Roche, broj proizvoda 03004058001
Pločice sa dubokim otvorima sledećih specifikacija: <ul style="list-style-type: none"> • Format mikropločice SLAS 1-2004, 3-2004 i 4-2004 sa 96 otvora piramidalnog ili konusnog dna i minimalnog kapaciteta otvora 2 ml. • Polipropilen sa slabim vezivanjem DNK za sve kontaktne površine uzorka i okvir otporan na torziju. • Dimenzije otvora (nivo tečnosti) kompatibilne su sa automatizovanim koracima uvlačenja i ispuštanja uređaja VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Dimenzije visine pločice kompatibilne su sa automatizovanim kretanjima uređaja VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora Kompatibilne pločice: <ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, broj dela 0030505301 • Eppendorf, broj dela 30502302 • USA Scientific, broj dela 1896-2000
Pločica sa 384 otvora sledećih specifikacija: <ul style="list-style-type: none"> • Mikropločica sa 384 otvora optimizovana za male zapremine, sa minimalnim kapacitetom otvora 50 µl. • Polistiren sa blokiranjem svetlosti i slabim vezivanjem DNK za sve kontaktne površine uzorka. • Dimenzije otvora (nivo tečnosti) kompatibilne su sa automatizovanim koracima uvlačenja i ispuštanja uređaja VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Dimenzije visine pločice kompatibilne su sa automatizovanim kretanjima uređaja VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora Kompatibilne pločice: <ul style="list-style-type: none"> • Corning, broj proizvoda 3820

Potrošni materijal	Dobavljač
Pločica sa 96 otvora sledećih specifikacija: <ul style="list-style-type: none"> • Mikropločica sa okvirom otpornim na torziju i 96 otvora sa suženim dnom, povišenim rubovima i minimalnim kapacitetom otvora 150 µl. • Polipropilen bez RNaze/DNaze sa slabim vezanjem DNK za sve kontaktne površine uzorka. • Dimenzije otvora (nivo tečnosti) kompatibilne su sa automatizovanim koracima uvlačenja i ispuštanja uređaja VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Dimenzije visine pločice kompatibilne su sa automatizovanim kretanjima uređaja VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora Kompatibilne pločice: <ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, broj dela 0030129512 • Eppendorf, broj dela 30129580 • Eppendorf, broj dela 30129598 • Eppendorf, broj dela 30129660 • Eppendorf, broj dela 30129679 • BioRad, broj dela HSP9601
Jedan od sledećih zatvarača: <ul style="list-style-type: none"> • Microseal „F“ folija • Zatvarači od folije 	Bio-Rad, kataloški broj MSF1001 Beckman Coulter, broj artikla 538619
Epruveta Cell-Free DNA BCT CE	Streck, kataloški broj 218997
Čepovi	Sarstedt, broj narudžbine 65.802
Epruvete sa navojnim zavrtačem 2 ml	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Nastavci sa filterom od 20 µl za pipetor od 20 µl	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Nastavci sa filterom od 200 µl za pipetor od 200 µl	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Nastavci sa filterom od 1000 µl za pipetor od 1000 µl	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Serološke pipete, 25 ml	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Serološke pipete, 10 ml	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Preporučeno: Deconex® SOLARSEPT Deconex® 61 DR	Borer Chemie AG
Ekvivalent: Sprej za brzu dezinfekciju na bazi alkohola Rastvor deterdženta za dezinfekciju	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora

Opcionalni materijali, nisu priloženi

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

Prikupljanje, transport i skladištenje uzoraka



OPREZ

Svim uzorcima rukujte kao sa potencijalno infektivnim agensima.

- 1 Uzorci pune krvi zapremine 7–10 ml moraju se prikupiti u epruvetu Streck Cell-Free DNA BCT (za DNK bez ćelija)
- 2 Transport pune krvi mora biti u skladu sa svim primenjivim odredbama koje regulišu transport etioloških supstanci. Preporučuju se metode ubrzanog transporta/isporuke.
- 3 Tokom transporta čuvati na temperaturi od 4 °C do 30 °C. Nakon prijema uzorke skladištite na temperaturi od 2 °C do 8 °C do trenutka nastavka obrade. Vreme od uzimanja krvi do početnog izolovanja plazme ne sme premašiti 5 dana.
- 4 U slučaju potrebe za ponovnim testiranjem, uzorke je posle obrade moguće ponovo zatvoriti i skladištiti na 4 °C dodatnih 5 dana (ukupno najviše 10 dana nakon uzimanja krvi).

**OPREZ**

Premašivanje gorepomenutog vremena skladištenja može negativno uticati na stopu neuspelih analiza pojedinačnih uzoraka.

Upozorenja i mere predostrožnosti

- ▶ Ova analiza sadrži reagens proteinazu K. Udisanje, gutanje, kontakt sa kožom i očima mogu dovesti do telesnih povreda. Upotrebljavajte u dobro provetrenom prostoru, nosite zaštitnu odeću, izbegavajte udisanje prašine i bacite u otpad sve kontejnere i neiskorišćen sadržaj u skladu sa važećim državnim sigurnosnim standardima.
- ▶ Ova analiza sadrži gvanidin-hidrohlorid. Udisanje, gutanje, kontakt sa kožom i očima mogu dovesti do telesnih povreda. Upotrebljavajte u dobro provetrenom prostoru, nosite zaštitnu odeću i bacite u otpad sve kontejnere i neiskorišćen sadržaj u skladu sa važećim lokalnim državnim sigurnosnim standardima.
- ▶ Ova analiza sadrži zapaljivu hemikaliju izopropil alkohol. Držite je dalje od izvora toplote i otvorene vatre. Udisanje, gutanje, kontakt sa kožom i očima mogu dovesti do telesnih povreda. Upotrebljavajte u dobro provetrenom prostoru, nosite zaštitnu odeću i bacite u otpad sve kontejnere i neiskorišćen sadržaj u skladu sa važećim lokalnim državnim sigurnosnim standardima.
- ▶ Ova analiza sadrži dimetil sulfoksid, korodirajuću i zapaljivu tečnost. Udisanje, gutanje, kontakt sa kožom i očima mogu dovesti do telesnih povreda. Upotrebljavajte u dobro provetrenom prostoru, nosite zaštitnu odeću i bacite u otpad sve kontejnere i neiskorišćen sadržaj u skladu sa važećim lokalnim državnim sigurnosnim standardima.
- ▶ Da biste sprečili stvaranje štetnih gasova, ne bacajte otpad nakon ekstrahovanja cfDNK (koji sadrži gvanidin tiocijanat) sa otpadom koji sadrži izbeljivač (natrijum hipohlorit).
- ▶ Svim uzorcima rukujte kao da sadrže potencijalno infektivne agense.
- ▶ Pridržavajte se rutinskih laboratorijskih mera predostrožnosti. Ne primenjujte pipetiranje ustima. Nemojte jesti, piti ni pušiti u označenim prostorima za rad. Koristite rukavice za jednokratnu upotrebu i laboratorijske mantile kada rukujete uzorcima i reagensima za analizu. Ruke temeljno operite nakon rukovanja uzorcima i reagensima za analizu.
- ▶ Ne koristite komponente analize nakon datuma isteka roka trajanja navedenog na oznaci na pakovanju analize. Ne koristite komponente iz drugih serija analiza. Serije analiza su navedene na oznaci na pakovanju analize. Skladištite komponente analize na navedenoj temperaturi.
- ▶ Da biste sprečili degradaciju uzorka ili reagensa, pre pokretanja protokola proverite da li su sva isparenja natrijum hipohlorita u potpunosti izvetrela nakon čišćenja.
- ▶ Nepridržavanje navedenih procedura može dovesti do pogrešnih rezultata ili značajnog smanjenja kvaliteta uzoraka.
- ▶ Sve ozbiljne incidente u vezi sa ovim proizvodom odmah prijavite kompaniji Illumina i nadležnim organima u državama članicama u kojima se nalaze korisnik i pacijent.
- ▶ Informacije o zaštiti životne sredine, zdravlju i bezbednosti potražite u bezbednosno-tehničkim listovima (SDS) na veb-sajtu support.illumina.com/sds.html.

Napomene u vezi sa postupkom

Izbegavanje kontaminacije

- ▶ Koristite nove nastavke i novu potrošnu laboratorijsku opremu.
- ▶ Koristite nastavke otporne na aerosol da biste smanjili opasnost od prenosa i unakrsne kontaminacije uzoraka.
- ▶ Zbog moguće kontaminacije, naročito obratite pažnju da sadržaj otvora ostane sasvim u njima. Pazite da sadržaj ne prska. Centrifugirajte nakon svakog koraka vorteksovanja.
- ▶ Pratite primenjive odredbe za odgovarajuće laboratorijske prakse i higijenu prilikom rukovanja krvlju i derivatima krvi.

- ▶ Prilikom pripreme biblioteka ne koristite sprejove sa izbeljivačem u aerosolu. Kontaminacija izbeljivačem u tragovima može dovesti do neuspele analize.

Čišćenje platforme VeriSeq NIPT Microlab STAR

- ▶ Pre upotrebe proverite da li je platforma čista. Najmanje jednom nedeljno obavite nedeljno održavanje i pratite ova uputstva za čišćenje.
- ▶ Skinite sve nosače koji mogu da se uklone, očistite ih sprejom za brzu dezinfekciju na bazi alkohola (Deconex® SOLARSEPT ili ekvivalent) i ostavite da se osuše. Ako su jako zaprljani, nakon toga ih potopite u rastvor deterdženta za dezinfekciju (tečnost za čišćenje Deconex® 61 DR ili ekvivalent), isperite sredstvom za dezinfekciju na bazi alkohola i ostavite da se osuše.
- ▶ Otvorite prednji poklopac i prebrišite platformu krpom natopljenom sredstvom Deconex® SOLARSEPT (ili ekvivalentnim sredstvom). Naročito proverite da li su čisti klizni blokovi.
- ▶ Uklonite CVS razdelnik i očistite razdelnik, zaptivku i unutrašnje odeljke CVS-a krpom.
- ▶ Ispraznite kantu za otpadne nastavke CORE 96-head i nezavisni kanal.
- ▶ Uklonite pločicu za izbacivanje nastavaka nezavisnog kanala na stanici za otpadne nastavke i očistite je: naprskajte sprej Deconex® SOLARSEPT (ili ekvivalentno sredstvo) direktno na površinu i prebrišite. Navucite novu plastičnu vrećicu na okvir i ponovo je pričvrstite. Vratite čistu pločicu za izbacivanje nastavaka na njeno mesto.
- ▶ Naprskajte sprej Deconex® SOLARSEPT (ili ekvivalentno sredstvo) direktno na površinu kante za otpad i na otvor za nastavke CORE 96-head i očistite ih.
 - ▶ Ako imate poteškoće sa uklanjanjem naslaga sa kante za otpadne nastavke, trljajte krpom navlaženom vodom bez DNaze/RNaze dok se naslage ne uklone. Krpu odložite na otpad na odgovarajući način. Nastavite sa sterilizacijom sredstvom za dezinfekciju na bazi alkohola.
- ▶ Navlažite krpom koja ne ostavlja dlačice ili pamučni tupfer 70% etanolom. Prebrišite prozor laserskog skenera na čitaču bar-kodova. Istom krpom ili tupferom očistite svaki otvor CPAC adaptera za pločice. Ako koristite krpom, gurnite je u svaki otvor adaptera koristeći zadnji deo olovke da biste bili sigurni da je unutrašnjost otvora temeljno očišćena.
- ▶ Očistite nezavisne kanale:
 - ▶ Na nezavisnim kanalima očistite deo za izbacivanje nastavaka (spoljni deo kanala za pipetiranje) krpom koja ne ostavlja dlačice natopljenom sprejom Deconex® SOLARSEPT (ili ekvivalentnim sredstvom). (Pogledajte referentni vodič za Hamilton Microlab STAR, broj 15070074.)
 - ▶ Očistite disk za zaustavljanje i prstenove glave za pipetiranje (spoljni deo kanala za pipetiranje) krpom koja ne ostavlja dlačice natopljenom sprejom Deconex® SOLARSEPT (ili ekvivalentnim sredstvom).
- ▶ Očistite kutiju CORE 96-head:
 - ▶ Koristeći istu krpom koja ne ostavlja dlačice natopljenom sprejom Deconex® SOLARSEPT (ili ekvivalentnim sredstvom) očistite kućište kutije 96-head i donji deo diskova za zaustavljanje.
 - ▶ Koristeći istu krpom ili komad krpe u obliku trake natopljene sprejom Deconex® SOLARSEPT (ili ekvivalentnim sredstvom) prođite krpom oko bočnih delova kanala za pipetiranje kutije 96-head da biste očistili prstenove. Ponovite ovaj postupak za sve kanale za pipetiranje na kutiji 96-head.
- ▶ Naprskajte prednji i bočni poklopac sprejom Deconex® SOLARSEPT (ili ekvivalentnim sredstvom) i osušite krpom.
- ▶ Očistite zaštitnu traku jedinice za automatsko umetanje krpom natopljenom sprejom Deconex® SOLARSEPT (ili ekvivalentnim sredstvom) i lagano obrišite bez pritiskanja.
- ▶ Kada se platforma i komponente sasvim osuše, vratite nosače.



NAPOMENA

Nepravilno čišćenje i održavanje platforme ML STAR može dovesti do unakrsne kontaminacije i lošeg učinka analize.

Kontrola kvaliteta

Kontrolni materijal sa poznatim karakteristikama učinka može biti testiran kako bi se procenile razlike u obradi i tehničkim postupcima u laboratoriji.



NAPOMENA

Obrada kontrolnog uzorka ili kontrole bez predloška (no template control, NTC) smanjuje ukupan broj nepoznatih majčinih 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.

Uputstvo za korišćenje

Saveti i tehnike

Ukoliko u protokolu nije navedena tačka bezbednog zaustavljanja, odmah pređite na sledeći korak.

Označavanje pločica bar-kodovima

- Bar-kodovi za pločice pune širine (full-skirt plate) počinju sa PL.
- Bar-kodovi za pločice sa dubokim otvorima počinju sa DW.
- Nalepite bar-kodove na pločice pune širine i pločice sa dubokim otvorima sa strane, pored kolone 12.
- Postavite pločice tako da bar-kod bude okrenut udesno da biste omogućili automatsko skeniranje.

Zatvaranje i otvaranje pločica


- ▶ Uvek zatvorite pločicu sa 96 otvora pre prelaska na sledeće korake u protokolu:
 - ▶ korake centrifuge
 - ▶ korake termičkog cikliranja
- ▶ Da biste zatvorili pločicu, stavite lepljivi poklopac na pločicu i zatim je hermetički zatvorite.
- ▶ Pre otvaranja:
 - ▶ Kratko centrifugirajte pločicu sa 96 otvora brzinom od 1000 × g u trajanju od 20 sekundi.
 - ▶ Stavite pločicu na ravnu površinu pre nego što polako skinete poklopac.

VeriSeq NIPT Microlab STAR

- ▶ Pre korišćenja obavite i dokumentujte obavezno održavanje u skladu s uputstvima proizvođača.
- ▶ Nadgledajte ML STAR tokom automatskih koraka. Pratite interfejs softvera VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 da biste videli upite i uputstva za laboranta.
- ▶ Tokom rada prednji poklopac treba da ostane na mestu.
- ▶ Platforma treba da bude prazna tokom rada.
- ▶ Tokom koraka vakuumiranja pločice, ako to zatraži VeriSeq NIPT Workflow Manager v2, ručno formirajte hermetičko zatvaranje između pločice i vakuumnog razdelnika.
- ▶ Sačekajte da sistem automatski baci u otpad nastavke sa adaptera. Nemojte ručno uklanjati nastavke ako to softver ne zatraži.
- ▶ Uklonite potrošene reagense i potrošni materijal kada to Workflow Manager zatraži.
- ▶ Svakodnevno praznite velike staklene boce vakuumnog otpada. Prva velika staklena boca nikada ne sme biti puna više od polovine. Prelivanje vakuumnog otpada može oštetiti vakuumsku pumpu i oslabiti vakuum koji sistem primenjuje.

Obrada uzoraka

Postupak

- 1 Obavite sledeće korake za svaku alikvotu:
 - a Centrifugirajte uzorke označene bar-kodom pri brzini od 1600 × g u trajanju od 10 minuta na temperaturi od 4 °C sa isključenom opcijom kočenja.
 - b Kada se centrifuga potpuno zaustavi, uklonite epruvete sa uzorcima. Nakon centrifugiranja, započnite izolovanje plazme u roku od 15 minuta. Ako prođe više od 15 minuta, ponovite centrifugiranje.
 - 2 Proverite svaku epruvetu radi utvrđivanja prikladnosti uzorka i potvrdite sledeće:
 - ▶ Zapremina uzorka je u skladu sa očekivanom.
 - ▶ Uzorak se pravilno razdvojio tokom centrifugiranja.
 - ▶ Nivo plazme je najmanje 1,5 ml iznad puferske obloge.
 - ▶ Uzorak nije izražen hemolizovan (tj. plazma nema jaku crvenu boju).
 - ▶ Uzorak nije lipemičan (npr. plazma nije mutna i beličasta ili neprozirna).
 - ▶ Uzorak ne sadrži zgrušane delove.
-  **OPREZ**
Uzorci koji su nepravilno skladišteni ili je njima nepravilno rukovano mogu biti neprikladni. Ako neprikladni uzorci budu obrađeni u toku rada, oni mogu začepiti pločicu za vezivanje tokom ekstrakovanja, što dovodi do događaja prelivanja uzorka u susedne otvore.
- 3 Skinite poklopce sa epruveta i stavite epruvete u nosače epruveta. Stavite sve uzorke i sve kontrole za plazmu za seriju.

Izolovanje plazme

Priprema

- 1 Označite 1 pločicu sa dubokim otvorima za prelaznu plazmu (Intermediate Plasma) i stavite bar-kod.
- 2 Označite 1 pločicu sa dubokim otvorima za krajnju plazmu (Final Plasma) i stavite bar-kod.



OPREZ

Uverite se da koristite odgovarajući tip pločice za „Intermediate Plasma“ i „Final Plasma“ pločice. Ako umesto pločice sa dubokim otvorima koristite rezervoar sa dubokim otvorima, to će dovesti do amalgamacije uzorka i može dati netačne rezultate.

Postupak

- 1 Otvorite AppLauncher, pa izaberite **VeriSeq NIPT Method**.
 - 2 Unesite ID serije i korisničko ime, pa izaberite **OK** (U redu).
ID serije ima ograničenje od 26 znakova. Koristite isključivo brojeve, slova, donje crte (_) ili crtice (-). Na primer: 2025-10-16_Serija3.
 - 3 Izaberite **New Batch** (Nova serija).
 - 4 Nakon pokretanja izaberite **OK** (U redu) da biste započeli izolovanje plazme.
 - 5 Obavite jedan od sledećih koraka:
 - Da biste učitali postojeći list sa uzorcima koji ste ranije napravili, odaberite list sa uzorcima povezan sa serijom, pa izaberite **OK** (U redu).
 - Da biste nastavili bez izbora lista sa uzorcima, izaberite **No Sample Sheet** (Bez lista sa uzorcima).
- Više informacija o pravljenju lista sa uzorcima ili podešavanju podrazumevanih vrednosti potražite u *Vodiču za softver VeriSeq NIPT Solution v2 (br. dokumenta 100000067940)*.

**NAPOMENA**

Tip uzorka, jednoplodni ili blizanački, mora biti tačno zabeležen za svaki uzorak da bi se osigurala tačna analiza podataka.

Ako izaberete „No Sample Sheet“ (Bez lista sa uzorcima), proverite da li ste u servisnim alatkama softvera Workflow Manager podesili podrazumevane vrednosti uzoraka.

- 6 Izaberite veličinu serije, pa izaberite **OK** (U redu).
- 7 Izaberite broj kontrola bez predloška (NTC), pa izaberite **OK** (U redu).

**NAPOMENA**

NTC otvori se uvek poslednji biraju. Na primer, ako u ciklusu od 24 uzorka postoje dva NTC-a, oni će biti na položajima 23 i 24.

- 8 Potvrdite da su svi bar-kodovi nalepljeni, pa zatim stavite uzorke, nastavke i pločice na nosač (tako da bar-kod bude okrenut udesno). Izaberite **OK** (U redu) svaki put kada to bude zatraženo pri postavljanju.

Veličina serije uzorka	Tip nosača	Traka	Stavka	Pozicija
24, 48, 96	Nastavak	7–12	Nastavci od 1000 µl	5
			Nastavci od 1000 µl (samo serija 96)	4, 5
	Epruveta	15	Pripremljene epruvete sa uzorcima krvi 1–24 (za serije svih veličina)	1–24
	Epruveta	16	Pripremljene epruvete sa uzorcima krvi 25–48 (samo za serije veličine 48 i 96)	25–48
	Epruveta	17	Pripremljene epruvete sa uzorcima krvi 49–72 (samo za serije veličine 96)	49–72
	Epruveta	18	Pripremljene epruvete sa uzorcima krvi 73–96 (samo za serije veličine 96)	73–96
	Multiflex	19–24	Prazna pločica sa dubokim otvorima za krajnju plazmu, sa bar-kodom	4
	Multiflex	19–24	Prazna pločica sa dubokim otvorima za prelaznu plazmu, sa bar-kodom	5
	Reagens	47	[Opcionalno] Dulbecco fosfatni pufer rastvor (DPBS) za kontrolu bez predloška	5

- 9 Proverite da li su nosači, laboratorijska oprema i reagensi pravilno postavljeni, pa izaberite **OK** (U redu) na ekranu „Pre-Spin Deck Verification“ (Verifikacija platforme za predcentrifugu).
- 10 Nadgledajte ML STAR dok obavlja automatske korake.
- 11 Kada softver Workflow Manager to zatraži, uverite se da na ML STAR platformi za postavljanje nema nikakvih prepreka kako bi ML STAR mogao da isprazni nosače.
- 12 Izaberite **Unload** (Isprazni) da biste ispraznili platformu.
- 13 Uklonite pločicu sa dubokim otvorima za prelaznu plazmu.
 - a Pregledajte pločicu da biste videli da li su zapremine ujednačene u svim otvorima (da nema grešaka pri pipetiranju). Očekivana zapremina je 1000 µl.
 - b Obratite pažnju na sve nedoslednosti i zapišite ih po završetku postupka izolovanja plazme.
 - c Zatvorite pločicu, postavite tako da bude balansirana i centrifugirajte brzinom od 5600 × g u trajanju od 10 minuta, sa isključenom opcijom kočenja ili na najnižem podešavanju.
- 14 Izaberite **Yes** (Da) da biste prešli na završnu pripremu plazme.
- 15 Skinite poklopac pločice i ponovo postavite pločicu na nosač.

Veličina serije uzorka	Tip nosača	Traka	Stavka	Pozicija
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Pločica sa dubokim otvorima za prelaznu plazmu	5

- 16 Označite polje za potvrdu **Intermediate Plasma plate has been spun** (Pločica za prelaznu plazmu je centrifugirana), pa izaberite **OK** (U redu).

- 17 Nadgledajte ML STAR dok obavlja automatske korake.
- 18 Kada softver Workflow Manager to zatraži, uverite se da na ML STAR platformi za postavljanje nema nikakvih prepreka kako bi ML STAR mogao da isprazni nosače.
- 19 Izaberite **Unload** (Isprazni) da biste ispraznili platformu.
- 20 Kada Workflow Manager (Upravljač tokom rada) to zatraži, ispraznite nosače i platformu.
- 21 Uklonite pločicu sa dubokim otvorima za krajnju plazmu.
- 22 Pregledajte pločicu da biste potvrdili:
 - ▶ Da su zapremine u svim otvorima ujednačene. Očekivana zapremina je 900 µl.
 - ▶ Da nema vidljivog ćelijskog peleta.
 - ▶ Da nema prekomerne hemolize.

Ako primetite vidljiv ćelijski pelet ili prekomernu hemolizu koji odstupaju od normalnih vrednosti, uzorak o kojem je reč označite kao nevažeći na kraju metoda izolovanja plazme ili koristite Batch Manager (Upravljač serijom). Više informacija o alatki Batch Manager (Upravljač serijom) potražite u *Vodiču za softver VeriSeq NIPT Solution v2 (br. dokumenta 100000067940)*.
- 23 Kada softver Workflow Manager to zatraži, izaberite **OK** (U redu).
- 24 Unesite komentare u vezi sa zahvaćenim otvorima, pa izaberite **OK** (U redu).
- 25 Obavite jedan od sledećih koraka:
 - Da biste nastavili sa ekstrahovanjem cfDNK, izaberite **Yes** (Da).
 - Da biste zaustavili proces, izaberite **Exit** (Napusti).

TAČKA BEZBEDNOG ZAUSTAVLJANJA

Ako zaustavljate proces, zatvorite pločicu za krajnju plazmu i skladištite je na temperaturi od 2 °C do 8 °C najduže 7 dana.

Ekstrahovanje cfDNK

Priprema

- 1 Vizualno pregledajte kutije za ekstrahovanje i kutije sa dodatnom opremom da biste se uverili da kompletu nije istekao rok trajanja.
- 2 Pripremite sledeće reagense. Označite posude rezervoara i rezervoare dubokih otvora nazivima reagensa.

Stavka	Skladištenje	Uputstva
Pločica sa dubokim otvorima za krajnju plazmu (Final Plasma)	Od 2 °C do 8 °C	Ukoliko je prethodno skladištena, ostavite je 30 minuta da dostigne sobnu temperaturu. Centrifugirajte brzinom od 1000 × g u trajanju od 20 sekundi. Pre upotrebe otvorite pločicu sa dubokim otvorima za krajnju plazmu (Final Plasma).

- 3 Polako dodajte 3,75 ml pufera sa proteinazom u svaku bočicu sa reagensom proteinaza K.
 - ▶ Pripremite 3 bočice za 24 i 48 uzoraka.
 - ▶ Pripremite 4 bočice za 96 uzoraka.
- 4 Zatvorite čepovima bočice sa proteinazom K i vorteksujte dok se ponovo ne suspenduju.



OPREZ

Nemojte da kontaminirate gumeni čep. Ako na gumeni čep dospeju druge supstance, kontaminiraće se budući uzorci.

- 5 Sipajte pripremljenu proteinazu K iz svih bočica u posudu za reagens i označite je sa proteinaza K.
- 6 Dodajte 100 ml 100% etanola u svaku bocu s reagensom koja sadrži pufer za ispiranje Wash Buffer II.
 - ▶ Pripremite 1 bočicu za 24 i 48 uzoraka.
 - ▶ Pripremite 2 bočice za 96 uzoraka.
- 7 Okrenite bočice sa puferom za ispiranje Wash Buffer II naopako da biste promešali sadržaj.
- 8 Označite polja za potvrdu na bočicama sa puferom za ispiranje Wash Buffer II.

- 9 Označite 1 novu pločicu pune širine (full-skirt plate) sa „Prelazna“ (Intermediate) i stavite bar-kod pločice.
- 10 Označite 1 novu pločicu pune širine (full-skirt plate) sa „Ispiranje cfDNK“ (cfDNA Elution) i stavite bar-kod pločice.
- 11 Označite 1 novu pločicu sa dubokim otvorima sa „Prelazno ekstrahovanje“ (Extraction Intermediate) i stavite bar-kod pločice sa dubokim otvorima.
- 12 Stavite bar-kod pločice na pločicu za vezivanje DNK.
- 13 Pripremite rastvor 70% etanola (70% EtOH, 30% vode bez DNaze/RNaze) za čišćenje vakuumnog sistema.
- 14 Pripremite vakuumski sistem.
 - a Uklonite vakuumski razdelnik i očistite ga 70% etanolom.
 - b Ispraznite vakuumski otpad.
 - c Proverite da li je vakuumski sistem platforme ML STAR uključen.

Ne čistite zaptivku koristeći etanol jer će postati krta.

Postupak

- 1 Izaberite **OK** (U redu) da biste pokrenuli ekstrahovanje cfDNK.
- 2 Ako metod VeriSeq NIPT Method nije već otvoren:
 - a Otvorite AppLauncher, pa izaberite **VeriSeq NIPT Method**.
 - b Unesite ID serije i korisničko ime, pa izaberite **OK** (U redu).
- 3 Postavite nastavke na nosače nastavaka na sledeći način, pa izaberite **OK** (U redu).

Veličina serije uzorka	Tip nosača	Traka	Stavka	Pozicija
24	Nastavak	1-6	Nastavci od 1000 µl	1
		7-12	Nastavci od 300 µl	1
48	Nastavak	1-6	Nastavci od 1000 µl	1, 2
		7-12	Nastavci od 300 µl	1
96	Nastavak	1-6	Nastavci od 1000 µl	1, 2, 3, 4
		7-12	Nastavci od 300 µl	1

- 4 Postavite prebrojane nastavke na nosače nastavaka na sledeći način.

Veličina serije uzorka	Tip nosača	Traka	Stavka	Pozicija
24, 48, 96	Nastavak	49-54	Nastavci od 1000 µl	1
			Nastavci od 300 µl	2
			Nastavci od 50 µl	3

- 5 Unesite lokaciju prvog i poslednjeg nastavka za svaki stalak za nastavke, pa izaberite **OK** (U redu).

- 6 Skenirajte bar-kodove kutije za ekstrahovanje.
- 7 Unesite korisničko ime ili inicijale lica koje priprema reagens, pa izaberite **OK** (U redu).
- 8 Skenirajte bar-kodove kutije sa dodatnim priborom.
- 9 Unesite korisničko ime ili inicijale lica koje priprema reagens, pa izaberite **OK** (U redu).
- 10 Potvrdite da su bar-kodovi nalepljeni.
- 11 Otvorite pločicu sa dubokim otvorima za krajnju plazmu (Final Plasma) i postavite pločice (tako da bar-kod bude okrenut udesno) na nosač pločica na sledeći način, pa izaberite **OK** (U redu).

Veličina serije uzorka	Tip nosača	Traka	Stavka	Pozicija
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Nova pločica pune širine (full-skirt plate), „Prelazna“ (Intermediate) sa bar-kodom	1
			Nova pločica pune širine (full-skirt plate), „Ispiranje cfDNK“ (cfDNA Elution) sa bar-kodom	2
			Nova pločica sa dubokim otvorima, „Prelazno ekstrahovanje“ (Extraction Intermediate) sa bar-kodom	4
			Pločica sa dubokim otvorima za krajnju plazmu (Final Plasma) sa bar-kodom	5

- 12 Potvrdite da pločica za vezivanje DNK ima bar-kod, pa izaberite **OK** (U redu).
- 13 Kod parcijalnih serija pločica, postavite isečeni poklopac za pločice preko neiskorišćenih otvora (kolone 4–12 za 24 serije uzoraka i kolone 7–12 za 48 serija uzoraka).
- 14 Postavite pločicu za vezivanje DNK na vakuumski razdelnik tako da bar-kod bude okrenut udesno.
- 15 Označite polje za potvrdu **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (Da li su kolone pločice za vezivanje DNK zatvorene?), pa izaberite **OK** (U redu).
- 16 Postavite posude za reagense na nosač reagensa na sledeći način, pa izaberite **OK** (U redu).

Veličina serije uzorka	Tip nosača	Traka	Stavka	Pozicija
24, 48	Reagens	47	16 ml pufera za ispiranje Elution Buffer	1
			11 ml proteinaze K	2
96	Reagens	47	16 ml pufera za ispiranje Elution Buffer	1
			15 ml proteinaze K	2

- 17 Prenesite navedene reagense u rezervoare sa dubokim otvorima, a zatim rezervoare stavite na nosače sa dubokim otvorima na sledeći način.
- 18 Izaberite **OK** (U redu).

Veličina serije uzorka	Tip nosača	Traka	Stavka	Pozicija
24, 48	Sa dubokim otvorima	39–44	125 ml pufera za ispiranje Wash Buffer II	1
			125 ml pufera za ispiranje Wash Buffer I	2
			60 ml 100% etanola	3
			100 ml pufera za liziranje	4
			60 ml vode bez DNaze/RNaze	5
96	Sa dubokim otvorima	39–44	200 ml pufera za ispiranje Wash Buffer II	1
			125 ml pufera za ispiranje Wash Buffer I	2
			100 ml 100% etanola	3
			100 ml pufera za liziranje	4
			100 ml vode bez DNaze/RNaze	5

- 19 Sačekajte da se završi automatska provera zapremine reagensa.
- 20 Potvrdite da je vakuumski otpad pun najviše dopola (preporučuje se da bude prazan), pa izaberite **OK** (U redu).
- 21 Potvrdite da su postavljeni svi nosači, laboratorijska oprema i reagensi, pa na ekranu „Extraction Deck Verification“ (Verifikacija platforme za ekstrakovanje) izaberite **OK** (U redu).
- 22 Nadgledajte ML STAR tokom automatskih koraka.

**OPREZ**

Morate ručno da proglasite nevažećim prelivanje uzoraka koje sistem nije otkrio pre kontaminacije obližnjih otvora.

- 23 Nakon završnog koraka vakuumiranja uklonite pločicu za vezivanje DNK i očistite donju površinu 70% etanolom.
- 24 Zatvorite sve nepokrivene otvore na pločici za vezivanje DNK i stavite je na praznu pločicu sa dubokim otvorima za krajnju plazmu.
- 25 Centrifugirajte sklop pločice za vezivanje DNK i pločice za krajnju plazmu brzinom od 5600 × g u trajanju od 10 minuta, sa uključenom opcijom kočenja.
- 26 Izaberite **OK** (U redu).
- 27 Tokom centrifugiranja pločice za vezivanje DNK završite vakuumsko čišćenje:
 - a Uklonite vakuumski razdelnik, pa izaberite **OK** (U redu).
 - b Sačekajte da se završi automatsko uklanjanje otpada.
 - c Očistite vakuumski razdelnik i unutrašnjost vakuumskog sistema 70% etanolom, pa vratite vakuumski razdelnik.
 - d Označite polje za potvrdu **Manifold is on Vacuum** (Razdelnik je pod vakuumom) da biste pokrenuli prenos pločice za ispiranje na vakuumski razdelnik, pa izaberite **OK** (U redu).
- 28 Nakon centrifugiranja otvorite otvore sa uzorcima na pločici za vezivanje DNK i stavite je na pločicu za ispiranje cfDNK.
Pločica za ispiranje cfDNK nalazi se na vakuumskom razdelniku.
- 29 Postavite pločicu za vezivanje DNK tako da bar-kod bude okrenut udesno, pa izaberite **OK** (U redu).
- 30 Nadgledajte ML STAR tokom automatskih koraka.
- 31 Nakon inkubacije označite polje za potvrdu **Plates are assembled as indicated** (Pločice su sklopljene prema uputstvu) da biste potvrdili da je sklop pločice za vezivanje DNK i pločice za ispiranje cfDNK na potpornoj bazi (ako se tako zahteva za centrifugiranje).
- 32 Zatvorite nepokrivene otvore na pločici za vezivanje DNK.
- 33 Centrifugirajte brzinom od 5600 × g u trajanju od 2 minuta, sa uključenom opcijom kočenja, pa izaberite **OK** (U redu).
- 34 Pregledajte pločicu za ispiranje cfDNK da biste videli da li su zapremine ujednačene u svim otvorima.
Očekivana zapremina je približno 55 µl.
- 35 Zatvorite i zadržite pločicu za ispiranje cfDNK za pripremu biblioteke.
- 36 Kada softver Workflow Manager to zatraži, uverite se da na ML STAR platformi za postavljanje nema nikakvih prepreka kako bi ML STAR mogao da isprazni nosače.
- 37 Izaberite **Unload** (Isprazni) da biste ispraznili platformu.
- 38 Ispraznite sve nosače i očistite ML STAR platformu, pa izaberite **OK** (U redu).
- 39 Unesite komentare u vezi sa zahvaćenim otvorima, pa izaberite **OK** (U redu).
- 40 Obavite jedan od sledećih koraka:
 - Da biste nastavili sa pripremom biblioteka, izaberite **Yes** (Da).
 - Da biste zaustavili proces, izaberite **Exit** (Napusti).

TAČKA BEZBEDNOG ZAUSTAVLJANJA

Ako zaustavljate proces, zatvorite pločicu za ispiranje cfDNK (cfDNA Elution) i skladištite na temperaturi od -25 °C do -15 °C u periodu od 7 dana.

Priprema biblioteka

Priprema

- 1 Vizualno pregledajte kutiju za pripremu biblioteke i kutiju sa dodatnom opremom da biste se uverili da kompletima nije istekao rok trajanja.
- 2 Pripremite sledeće reagense. Označite posude rezervoara i rezervoare dubokih otvora nazivima reagensa.

Stavka	Skladištenje	Uputstva
End Repair Mix	-25 °C do -15 °C	Odmrznite na sobnoj temperaturi. Vorteksujte radi mešanja.
A-Tailing Mix	-25 °C do -15 °C	Odmrznite na sobnoj temperaturi. Vorteksujte radi mešanja, a potom nakratko centrifugirajte.
Ligation Mix	-25 °C do -15 °C	Odmrznite na sobnoj temperaturi. Vorteksujte radi mešanja, a potom nakratko centrifugirajte.
Pufer za ponovnu suspenziju	Od 2 °C do 8 °C	Vorteksujte radi mešanja. Nakon korišćenja vratite u skladište.
Pufer za hibridizaciju	-25 °C do -15 °C	Odmrznite na sobnoj temperaturi. Vorteksujte radi mešanja. Nakon korišćenja vratite u skladište.
Pločica VeriSeq NIPT DNA Adapter Plate	-25 °C do -15 °C	Odmrznite na sobnoj temperaturi. Vorteksujte radi mešanja. Centrifugirajte brzinom od 1000 × g u trajanju od 20 sekundi. Stavite bar-kod pločice.
Zrnca za prečišćavanje uzorka	Od 2 °C do 8 °C	Ostavite 30 minuta da dostigne sobnu temperaturu. Energično vorteksujte pre svake upotrebe. Promešajte u vorteksu ili okretanjem dok sva zrnca ne budu u suspenziji i mešavina ne postane homogena.
Pločica za ispiranje cfDNK (cfDNA Elution)	-25 °C do -15 °C	Ukoliko je prethodno skladištena, potvrdite da pločica nije skladištena duže od 7 dana i odmrzavajte na sobnoj temperaturi. Vorteksujte brzinom od 1500 obrtaja u minuti u trajanju od 1 minuta. Centrifugirajte brzinom od 1000 × g u trajanju od 20 sekundi.

- 3 Pripremite svežih 50 ml 80% etanola mešanjem 40 ml 100% etanola i 10 ml vode bez DNaze/RNaze. Okrenite bocu sa etanolom naopako da biste je promešali.
- 4 Označite 1 novu pločicu pune širine (full-skirt plate) sa „Biblioteke“ (Libraries) i stavite bar-kod pločice.
- 5 Uverite se da je termalna kontrola platforme ML STAR uključena.

Razređivanje enzima

- 1 Kombinujte A-Tailing Mix i pufer za ponovnu suspenziju u epruveti sa čepom sa navojem. Vorteksujte radi mešanja, a potom nakratko centrifugirajte.

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

- 2 Kombinujte Ligation Mix i pufer za ponovnu suspenziju u epruveti sa čepom sa navojem. Vorteksujte radi mešanja, a potom nakratko centrifugirajte.

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

Postupak

- 1 Izaberite **OK** (U redu) da biste počeli sa pripremom biblioteke. Ako metod VeriSeq NIPT Method nije već otvoren:
 - a Otvorite AppLauncher, pa izaberite **VeriSeq NIPT Method**.
 - b Unesite ID serije i korisničko ime, pa izaberite **OK** (U redu).
- 2 Potvrdite da je sledeći potrošni materijal pripremljen kao što je navedeno na ekranu „Reagent Preparation“ (Priprema reagensa):
 - ▶ A-Tailing Mix, Ligation Mix i 80% etanol.
 - ▶ Zrnca za prečišćavanje uzorka, End Repair Mix i pločica VeriSeq NIPT DNA Adapter Plate.
- 3 Označite polja za potvrdu, pa izaberite **OK** (U redu).
- 4 Skenirajte bar-kodove kutije za pripremu biblioteke.
- 5 Unesite korisničko ime ili inicijale lica koje priprema reagens, pa izaberite **OK** (U redu).
- 6 Skenirajte bar-kodove kutije sa dodatnim priborom.
- 7 Unesite korisničko ime ili inicijale lica koje priprema reagens, pa izaberite **OK** (U redu).
- 8 Postavite nastavke na nosače nastavaka na sledeći način, pa izaberite **OK** (U redu) za svaki nosač.

Veličina serije uzorka	Tip nosača	Traka	Stavka	Pozicija
24	Nastavak	1–6	Nastavci od 50 µl	1
		7–12	Nastavci od 300 µl	1, 2
48	Nastavak	1–6	Nastavci od 50 µl	1, 2
		7–12	Nastavci od 300 µl	1, 2, 3, 4
96	Nastavak	1–6	Nastavci od 50 µl	1, 2, 3, 4
		7–12	Nastavci od 300 µl	1, 2, 3, 4, 5

- 9 Ako ste zaustavili protokol nakon postupka ekstrahovanja cfDNK, postavite prebrojane nastavke na nosače nastavaka na sledeći način.

Veličina serije uzorka	Tip nosača	Traka	Stavka	Pozicija
24, 48, 96	Nastavak	49–54	Nastavci od 1000 µl	1
			Nastavci od 300 µl	2
			Nastavci od 50 µl	3

- 10 Unesite lokaciju prvog nastavka za svaki stalak za nastavke, pa izaberite **OK** (U redu).
- 11 Potvrdite da su bar-kodovi nalepljeni, pa zatim stavite pločice (tako da bar-kod bude okrenut udesno) na nosač pločica na sledeći način, pa izaberite **OK** (U redu).

Veličina serije uzorka	Tip nosača	Traka	Stavka	Pozicija
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Pločica za ispiranje cfDNK (cfDNA Elution), sa bar-kodom	1
			Pločica DNA Adapter Plate, sa bar-kodom	2
			Nova pločica pune širine (full-skirt plate) sa 96 otvora, biblioteke, sa bar-kodom	3
			Nove pločice pune širine (full-skirt plate) sa 96 otvora	4, 5

- 12 Postavite nosač pločica sa dubokim otvorima na sledeći način, pa izaberite **OK** (U redu).

Veličina serije uzorka	Tip nosača	Traka	Stavka	Pozicija
24, 48, 96	Sa dubokim otvorima	39–44	50 ml 80% etanola u rezervoaru sa dubokim otvorima	1
			Nove pločice pune širine (full-skirt plate) sa 96 otvora	2, 3, 4, 5

- 13 Postavite posude za reagense na nosač reagensa na sledeći način, pa izaberite **OK** (U redu).

Veličina serije uzorka	Tip nosača	Traka	Stavka	Pozicija
24, 48, 96	Reagens	47	2,5 ml proizvoda End Repair Mix	1
			Pripremljeni A-Tailing Mix (ukupna zapremina)	2
			Pripremljeni Ligation Mix (ukupna zapremina)	3
			10 ml zrnaca za prečišćavanje uzorka	4
			12 ml pufera za hibridizaciju	5

- 14 Proverite da li su nosači, laboratorijska oprema i reagensi postavljeni kao što je naznačeno, pa izaberite **OK** (U redu) na ekranu „Library Deck Verification“ (Verifikacija platforme za biblioteku).
- 15 Sačekajte da se završi automatska provera zapremine reagensa.
- 16 Nadgledajte ML STAR tokom automatskih koraka.
- 17 Kada softver Workflow Manager to zatraži, uverite se da na ML STAR platformi za postavljanje nema nikakvih prepreka kako bi ML STAR mogao da isprazni nosače, pa izaberite **Unload** (Isprazni) da biste ispraznili platformu.
- 18 Pregledajte pločicu biblioteka da biste videli da li su zapremine ujednačene u svim otvorima.



OPREZ

Ako su zapremine u otvorima neujednačene, uzorci mogu da pruže netačne rezultate.

- 19 Ukoliko je skladištite, zatvorite i zadržite pločicu biblioteka.
- 20 Ispraznite nosače, očistite platformu, pa izaberite **OK** (U redu).
- 21 Unesite komentare u vezi sa zahvaćenim otvorima, pa izaberite **OK** (U redu).
- 22 Obavite jedan od sledećih koraka:
- ▶ Da biste nastavili sa kvantifikacijom biblioteka, izaberite **Yes** (Da).
 - ▶ Da biste zaustavili proces, izaberite **Exit** (Napusti).
- 23 Ukoliko ne zaustavljate proces, odmah pređite na kvantifikaciju.

TAČKA BEZBEDNOG ZAUSTAVLJANJA

Ako zaustavljate proces, zatvorite pločicu biblioteka pre skladištenja. Pločica biblioteka je stabilna do 7 dana od datuma pripreme pri temperaturi od -25 °C do -15 °C.

Kvantifikacija biblioteka

Priprema

- 1 Pripremite sledeće reagense:

Stavka	Skladištenje	Uputstva
Reagens za kvantifikaciju DNK	Od 2 °C do 8 °C	Zaštite od svetlosti. Odmrzavajte na sobnoj temperaturi 30–150 minuta. (Preporučuje se uklanjanje reagensa na početku postupka pripreme biblioteka.) Vorteksujte radi mešanja, a potom nakratko centrifugirajte.
Standard kvantifikacije DNK	Od 2 °C do 8 °C	Vorteksujte radi mešanja, a potom nakratko centrifugirajte.
Pločica biblioteka	Od -25 °C do -15 °C	Ukoliko je prethodno skladištena, potvrdite da pločica nije skladištena duže od 7 dana i odmrzavajte na sobnoj temperaturi. Vorteksujte radi mešanja. Centrifugirajte brzinom od 1000 × g u trajanju od 20 sekundi.
Pufer za ponovnu suspenziju	Od 2 °C do 8 °C	Vorteksujte radi mešanja.

- 2 Uključite fluorometar 10 minuta pre korišćenja.
- 3 Stavite bar-kod pločice na novu pločicu sa 384 otvora.
- 4 Stavite bar-kod pločice na novu pločicu pune širine (full-skirt plate).

Postupak

- 1 Izaberite **OK** (U redu) da biste pokrenuli kvantifikaciju.
- 2 Ako metod VeriSeq NIPT Method nije već otvoren:
 - a Otvorite AppLauncher, pa izaberite **VeriSeq NIPT Method**.
 - b Unesite ID serije i korisničko ime, pa izaberite **OK** (U redu).
- 3 Skenirajte bar-kodove kutije sa dodatnim priborom.
- 4 Unesite korisničko ime ili inicijale lica koje priprema reagens, pa izaberite **OK** (U redu).
- 5 Postavite nastavke na nosač nastavaka na sledeći način, pa izaberite **OK** (U redu).

Veličina serije uzorka	Tip nosača	Traka	Stavka	Pozicija
24, 48	Nastavak	1–6	Stalak za nastavke od 300 µl	1
			Stalak za nastavke od 50 µl	2
96	Nastavak	1–6	Stalak za nastavke od 300 µl	1
			Stalak za nastavke od 50 µl	2, 3

- 6 Potvrdite da su bar-kodovi nalepljeni, a zatim, ako je potrebno, otvorite pločicu biblioteka.
- 7 Postavite pločice (tako da bar-kod bude okrenut udesno) na Multiflex nosač na sledeći način, pa izaberite **OK** (U redu).

Veličina serije uzorka	Tip nosača	Traka	Stavka	Pozicija
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Nove pločice pune širine (full-skirt), sa bar-kodom	1
			Nova pločica sa 384 otvora, sa bar-kodom	2
			Pločica biblioteka, sa bar-kodom	3
			Nove pločice pune širine (full-skirt plate) sa 96 otvora	4, 5

- 8 Postavite epruvete sa reagensima bez poklopaca na nosač epruveta na sledeći način, pa izaberite **OK** (U redu).

Veličina serije uzorka	Tip nosača	Traka	Stavka	Pozicija
24, 48, 96	Epruveta	46	Standard kvantifikacije DNK	1
			Reagens za kvantifikaciju DNK	2

- 9 Postavite posude za reagense na nosač reagensa na sledeći način, pa izaberite **OK** (U redu).

Veličina serije uzorka	Tip nosača	Traka	Stavka	Pozicija
24, 48, 96	Reagens	47	Nova posuda za reagense (prazna)	1
			16 ml pufera za ponovnu suspenziju	2

- 10 Ako ste zaustavili protokol nakon postupka pripreme biblioteka, postavite prebrojane nastavke na nosače nastavaka na sledeći način.

Veličina serije uzorka	Tip nosača	Traka	Stavka	Pozicija
24, 48, 96	Nastavak	49–54	Nastavci od 1000 µl	1
			Nastavci od 300 µl	2
			Nastavci od 50 µl	3

- 11 Unesite lokaciju prvog i poslednjeg nastavka za svaki stalak za nastavke, pa izaberite **OK** (U redu).
- 12 Proverite da li su nosači, laboratorijska oprema i reagensi postavljeni kao što je naznačeno, pa izaberite **OK** (U redu) na ekranu „Quant Deck Verification“ (Verifikacija platforme za kvantifikaciju).
- 13 Sačekajte da se završi automatska provera zapremine reagensa.
- 14 Nadgledajte ML STAR tokom automatskih koraka.
- 15 Kada softver Workflow Manager to zatraži, uverite se da na ML STAR platformi za postavljanje nema nikakvih prepreka kako bi ML STAR mogao da isprazni nosače.
- 16 Izaberite **Unload** (Isprazni) da biste ispraznili platformu.
- 17 Skinite pločicu biblioteka.
- Pregledajte pločicu da biste videli da li su zapremine ujednačene u svim otvorima.
 - Zatvorite pločicu biblioteka i skladištite na sobnoj temperaturi do završetka analize fluorometrijskih podataka.
- 18 Skinite preostale pločice sa 96 otvora i proverite da li su zapremine ujednačene u svim otvorima. Velike greške u zapremini mogu da ukazuju na problem sa koracima pipetiranja.
- 19 Skinite pločicu sa 384 otvora i proverite da li postoji tačnost u odgovarajućim otvorima.
- 20 Zatvorite pločicu folijom.
- 21 Centrifugirajte brzinom od 1000 × g u trajanju od 20 sekundi.
- 22 Inkubirajte na sobnoj temperaturi 10 minuta, zaštićeno od svetlosti.
- 23 Ispraznite sve nosače i očistite ML STAR platformu, pa izaberite **OK** (U redu).



NAPOMENA

Nemojte da bacate reagens za kvantifikaciju dok ne dobijete podatke. Reagensi će vam i dalje biti neophodni ako bude potrebno da obavite ponovnu kvantifikaciju.

- 24 Nakon inkubacije, skinite foliju i stavite pločicu sa 384 otvora na čitač mikropločica. Uverite se da je prilikom umetanja A1 u gornjem levom uglu.
- 25 Dvaput kliknite na šablon VeriSeq NIPT da biste ga otvorili u SoftMax Pro.
- 26 Izaberite **New Experiment** (Novi eksperiment) na kartici „Home“ (Početak).
- 27 Izaberite **Read** (Očitavanje).

28 Izvezite podatke u XML formatu na sledeći način.

- a Kliknite desnim tasterom miša na **Plate** (Pločica), pa izaberite **Rename** (Promeni naziv).
- b Skenirajte bar-kod pločice za kvantifikaciju, pa izaberite **OK** (U redu).
- c U gornjem levom uglu ekrana izaberite ikonu pločice, pa u meniju izaberite **Export** (Izvoz).
- d Označite polje za potvrdu **Expt name** (Naziv izvoza), podesite opciju datuma pločice na neobrađeno, podesite izlazni format na XML, pa izaberite **OK** (U redu).
- e Podesite putanju i naziv izlazne datoteke, pa izaberite **Save** (Sačuvaj).

Hamilton računar mora da ima pristup lokaciji datoteke. Nemojte da koristite razmake u nazivu ili putanji datoteke.

Analiza

- 1 U alatki Workflow Manager na ekranu „Scanner Information“ (Podaci o skeneru) unesite ID fluorometra.
- 2 Unesite komentare o obradi pomoću fluorometra, pa izaberite **OK** (U redu).
- 3 Pronađite XML datoteku kvantifikacije koja sadrži fluorometrijske podatke, pa izaberite **OK** (U redu).
- 4 Pregledajte rezultate analize standardne krive i koncentracije uzoraka, pa izaberite **OK** (U redu).
- 5 Ako je potrebno ponovo skenirati pločicu, izaberite **Rescan** (Ponovno skeniraj).
Uzorci su osetljivi na vreme i svetlost. Kada je to potrebno, odmah obavite ponovno skeniranje.
- 6 Unesite komentare u vezi sa zahvaćenim otvorima, pa izaberite **OK** (U redu).
- 7 Procenite rezultate i nastavite na sledeći način.
 - Ukoliko su rezultati u skladu sa specifikacijom, pređite na formiranje skupova biblioteka. Da biste videli specifikacije, pogledajte tabelu sa pokazateljima i granicama za kvantifikaciju kontrole kvaliteta u *Vodiču za softver VeriSeq NIPT Solution v2 (br. dokumenta 100000067940)*.
 - Ukoliko rezultati ne prođu specifikaciju, sistem će prekinuti metod. Ponovite postupke kvantifikacije počev od *Priprema na stranici 23*.
- 8 Obavite jedan od sledećih koraka:
 - Da biste nastavili sa formiranjem skupova biblioteka, izaberite **Yes** (Da).
 - Da biste zaustavili proces, izaberite **Exit** (Napusti).

TAČKA BEZBEDNOG ZAUSTAVLJANJA

Ako zaustavljate proces, zatvorite pločicu biblioteka pre skladištenja. Pločica biblioteka je stabilna do 7 dana ukupne dužine skladištenja pri temperaturi od -25 °C do -15 °C.

Biblioteka skupova

Priprema

1 Pripremite sledeće reagense:

Stavka	Skladištenje	Uputstva
Pufer za hibridizaciju	-25 °C do -15 °C	Odmrznite na sobnoj temperaturi. Vorteksujte radi mešanja. Nakon korišćenja vratite u skladište.
Pločica biblioteka	-25 °C do -15 °C	Ukoliko su prethodno bile skladištene, odmrznite ih na sobnoj temperaturi. Vorteksujte brzinom od 1500 obrtaja u minuti u trajanju od 1 minuta. Centrifugirajte brzinom od 1000 × g u trajanju od 20 sekundi.

2 Označite praznu epruvetu za formiranje skupa sa „Skup A“. Za 96 uzoraka označite drugu praznu epruvetu za formiranje skupa sa „Skup B“.

- 3 Sačuvajte sledeći program za denaturaciju na termičkom cikleru sa poklopcem koji se zagreva.
 - a Izaberite opciju unapred zagrejanog poklopca i podesite ga na 102 °C.
 - b Podesite reakcionu zapreminu na 50 µl.
 - c Podesite korak pojačavanja na maksimum (≥ 2 °C u sekundi).
 - d Inkubirajte na 96 °C u trajanju od 10 minuta, a zatim na 4 °C u trajanju od 5 sekundi.
 - e Držite na 4 °C.

Postupak

- 1 Postavite pločicu biblioteka na unapred programirani termički cikler i pokrenite program denaturacije.



NAPOMENA

Nemojte da denaturišete pločice biblioteka pre nego što kvantifikacija prođe kontrolu kvaliteta u skladu sa pokazateljima, jer će možda biti potrebno da obavite ponovnu kvantifikaciju.

- 2 Centrifugirajte pločicu biblioteka brzinom od 1000 × g u trajanju od 20 sekundi.
- 3 U Workflow Manager-u izaberite **OK** (U redu) da biste pokrenuli formiranje skupova biblioteka.
- 4 Ako metod VeriSeq NIPT Method nije već otvoren:
 - a Otvorite AppLauncher, pa izaberite **VeriSeq NIPT Method**.
 - b Unesite ID serije i korisničko ime, pa izaberite **OK** (U redu).
- 5 Izaberite koncentraciju skupa, pa izaberite **OK** (U redu).
Ukoliko je potrebno, podesite koncentraciju formiranja skupova da biste postigli ciljnu gustinu klastera od 220–260 k/mm².
- 6 Ako Workflow Manager to zatraži, obavite jedan od sledećih koraka:
 - ▶ Da biste učitali list sa uzorcima, odaberite list sa uzorcima povezan sa serijom, pa izaberite **OK** (U redu).
 - ▶ Da biste koristili podrazumevane vrednosti sistema za ostale tipove uzoraka, izveštavanje o polu ili tip skringinga, za svako podešavanje izaberite **Use Default** (Koristi podrazumevanu vrednost).
Više informacija o pravljenju lista sa uzorcima potražite u *Vodiču za softver VeriSeq NIPT Solution v2* (br. dokumenta 1000000067940).



OPREZ

Pre nego što izaberete opciju „Use Default“ (Koristi podrazumevanu vrednost), uverite se da ste podesili podrazumevane vrednosti u servisnim alatcima softvera Workflow Manager. Ako to ne uradite, analiza uzoraka može biti nepotpuna.

- 7 Izaberite **Start** (Pokreni) da biste počeli sa merenjem vremena za pločicu za denaturaciju.
- 8 Postavite nastavke na nosače nastavaka na sledeći način.

Veličina serije uzorka	Tip nosača	Traka	Stavka	Pozicija
24, 48, 96	Nastavak	7–12	Nastavci sa filterom od 50 µl	1

- 9 Postavite pločicu denaturisane biblioteka (tako da bar-kod bude okrenut udesno) na Multiflex nosač na sledeći način, pa izaberite **OK** (U redu).

Veličina serije uzorka	Tip nosača	Traka	Stavka	Pozicija
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Pločica denaturisane biblioteka (sa bar-kodom)	1

- 10 Postavite epruvete za skupove na nosač epruveta na sledeći način, pa izaberite **OK** (U redu).

Veličina serije uzorka	Tip nosača	Traka	Stavka	Pozicija
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 Postavite posude za reagense na nosač reagensa na sledeći način, pa izaberite **OK** (U redu).

Veličina serije uzorka	Tip nosača	Traka	Stavka	Pozicija
24, 48, 96	Reagens	47	3 ml pufera za hibridizaciju	1

- 12 Postavite nastavke na nosače nastavaka na sledeći način.

Veličina serije uzorka	Tip nosača	Traka	Stavka	Pozicija
24, 48, 96	Nastavak	49–54	Nastavci sa filterom od 1000 µl	1
			Nastavci sa filterom od 300 µl	2
			Nastavci sa filterom od 50 µl	3

- 13 Unesite lokaciju prvog i poslednjeg nastavka za svaki stalak za nastavke, pa izaberite **OK** (U redu).
- 14 Proverite da li su nosači, laboratorijska oprema i reagensi postavljeni kao što je naznačeno, pa izaberite **OK** (U redu) na ekranu „Pooling Deck Verification“ (Verifikacija platforme za formiranje skupova).
- 15 Nadgledajte ML STAR tokom automatskih koraka.
- 16 Unesite komentare u vezi sa zahvaćenim otvorima, pa izaberite **OK** (U redu).
- 17 Kada softver Workflow Manager to zatraži, uverite se da na ML STAR platformi za postavljanje nema nikakvih prepreka kako bi ML STAR mogao da isprazni nosače.
- 18 Izaberite **Unload** (Isprazni) da biste ispraznili platformu.
- 19 Skinite nosač epruveta.
- 20 Zatvorite čepom svaku epruvetu za formiranje skupova, vorteksujte i kratko centrifugirajte.
- 21 Izaberite **OK** (U redu).
- 22 Sekvencirajte biblioteke što pre nakon formiranja skupova. Ukoliko je potrebno, zatvorite pločicu biblioteka i skladištite je na temperaturi od -25 °C do -15 °C najduže 7 dana da bi se omogućilo ponovno formiranje skupova.

TAČKA BEZBEDNOG ZAUSTAVLJANJA

Ako zaustavljate proces, zatvorite epruvete za formiranje skupova i skladištite ih na temperaturi od -25 °C do -15 °C najduže 7 dana.

Priprema skupova biblioteka za sekvenciranje

Priprema

- 1 Pripremite sledeće reagense:

Stavka	Skladištenje	Uputstva
Epruvete skupova	Od -25 °C do -15 °C	Ukoliko su prethodno bile skladištene, odmrznite ih na sobnoj temperaturi. Kratko vorteksujte. Kratko centrifugirajte.

- 2 Pripremite sistem sekvenciranja nove generacije tako što ćete popuniti sledeća polja modula Local Run Manager VeriSeq NIPT:
 - a Run Name (Naziv obrade)
 - b Run Description (Opis obrade) (opcionarno)
 - c Pool Barcode (Bar-kod skupa)

Više informacija o korišćenju modula Local Run Manager VeriSeq NIP potražite u *Vodiču za softver VeriSeq NIPT Solution v2 (br. dokumenta 1000000067940)*.



OPREZ

Bar-kod skupa koji ste uneli u modul Local Run Manager mora da se podudara sa bar-kodom skupa koji ste uneli u alatku Workflow Manager. Softver za analizu odbija nepravilne konfiguracije obrade i može da zahteva ponovno sekvenciranje.

Sledeći postupak opisuje pravilno postavljanje skupova biblioteka u instrument za sekvenciranje nove generacije koji koristi kertridže.

Postupak

- 1 Dodajte sledeći potrošni materijal u kertridž za reagense, pa pipetirajte da biste izmešali.
 - ▶ 900 µl pufera za hibridizaciju
 - ▶ 450 µl skupa A
- 2 Nastavite sa sekvenciranjem na sistemu za sekvenciranje nove generacije. Uputstva o sekvenciranju potražite u referentnom vodiču za instrument za sekvenciranje nove generacije. Za NextSeq 550Dx, pogledajte *referentni vodič za instrument NextSeq 550Dx (br. dokumenta 1000000009513)* ili *uputstvo u pakovanju za instrument NextSeq 550Dx (br. dokumenta 1000000043133)*.
- 3 Ukoliko je potrebno, ponovite ovaj postupak za skup B.
 - ▶ Da biste dostigli ciljni opseg gustine klastera, za pločicu biblioteke možete ponovo da formirate skup pomoću druge koncentracije za formiranje skupa na uređaju Hamilton. Ponovno formiranje skupa čini prvobitni skup nevažećim.
 - ▶ Druga mogućnost je modifikovanje odnosa skupa prema HT1 (450 + 900 ul) radi postizanja ciljnog opsega gustine klastera.

Sekvenciranje nove generacije

VeriSeq NIPT Solution v2 može se koristiti sa sekvencerom nove generacije sledećih specifikacija:

- ▶ očitavanja 2x36 uparenih krajeva
- ▶ kompatibilnost sa indeksiranim adapterima u VeriSeq NIPT kompletu za pripremu uzoraka
- ▶ dvokanalna hemija
- ▶ automatsko generisanje .BCL datoteka (neobrađeni podaci instrumenta za sekvenciranje)
- ▶ 400 miliona očitavanja uparenih krajeva po obradi
- ▶ kompatibilnost sa softverom VeriSeq NIPT Assay Software v2

NextSeq 550Dx je kompatibilan sa softverom VeriSeq NIPT Solution v2.

Analiza podataka dobijenih sekvenciranjem

Nakon završetka sekvenciranja, podaci dobijeni sekvenciranjem se automatski šalju u softver VeriSeq NIPT Assay Software v2 radi analize i generisanja izveštaja. Izveštaj obuhvata klasifikaciju svakog uzorka u seriji, kao i procenu svih pokazatelja kontrole kvaliteta za obradu. Postupak analize od završetka sekvenciranja do krajnjih rezultata traje otprilike 4 sata za seriju sa 48 uzoraka. Detaljne informacije o analizi podataka i izlaznoj datoteci potražite u *Vodiču za softver VeriSeq NIPT Solution v2 (br. dokumenta 1000000067940)*.

Tumačenje rezultata

Algoritam softvera VeriSeq NIPT Solution v2 koristi složeni statistički model koji kombinuje nekoliko različitih vrsta informacija dobijenih prikupljanjem fragmenata biblioteke sekvenciranja sa uparenim krajevima. Ovaj model se koristi za otkrivanje regiona genoma koji su malo ili mnogo zastupljeni u biblioteci svakog uzorka. Važno je da taj model uzima u obzir da li je stepen male ili velike zastupljenosti kvantitativno dosledan sa nekim događajem aneuploidije u fetalnom genomu na nivou fetalne frakcije procenjene za tu biblioteku.

Za sve hromosome, podaci o uparenim krajevima dobijeni sekvenciranjem poravnavaju se na referentni genom (HG19). Jedinstvena neduplirana poravnata očitavanja prikupljaju se u skladišta od 100 Kb. Odgovarajući broj skladišta prilagođava se GC uticaju i u skladu s prethodno utvrđenom genomskom pokrivenošću specifičnom za region. Uz korišćenje takvih normalizovanih brojeva skladišta, statistički rezultati se izvode za svaki autozom poređenjem regiona pokrivenosti koji mogu biti zahvaćeni aneuploidijom sa ostatkom autozoma. Logaritamski odnos verovatnoće (LLR) izračunava se za svaki uzorak uz uzimanje u obzir tih rezultata zasnovanih na pokrivenosti i procenjenoj fetalnoj frakciji. LLR je verovatnoća da je uzorak zahvaćen uz uočenu pokrivenost i fetalnu frakciju u odnosu na verovatnoću da je uzorak nezahvaćen uz istu uočenu pokrivenost. Prilikom izračunavanja tog odnosa uzima se u obzir i procenjena nesigurnost fetalne frakcije. Za sledeća izračunavanja se koristi prirodni logaritam odnosa. Softver za analizu određuje LLR za svaki ciljni hromozom i svaki uzorak kako bi se odredila aneuploidija.

Tokom formiranja serije korisnik mora definisati tip uzorka (jednoplodan ili blizanački), tip skrininga (osnovni ili ceo genom) i izveštavanje o polnim hromozomima (Da, Ne ili SCA) za svaki uzorak. Ove opcije zajedno određuju koji će se podaci dobiti za svaki uzorak.

Kod svih tipova uzoraka, tip skrininga određuje o kojim autozomnim anomalijama će se izveštavati. Kod osnovnog tipa skrininga, izveštava se samo o događajima trizomije na celom hromozomu, koji uključuju hromosome 13, 18 i 21. Kod skrininga celog genoma, izveštava se o celim ili delimičnim delecijama hromozoma ili duplikacijama bilo kog autozomnog hromozoma. Dužina najmanje delimične delecije ili duplikacije hromozoma koja se može evidentirati iznosi 7 Mb.

Kod jednoplodnih uzoraka možete da onemogućite izveštavanje o polnim hromozomima. Pored toga, može se konfigurisati izveštavanje o aneuploidijama polnih hromozoma uz izveštavanje o polu euploidnih uzoraka ili bez izveštavanja.

Kod blizanačkih uzoraka, ako se za izveštavanje o polnim hromozomima izabere „Yes“ (Da), rezultat je ograničen na izveštavanje o prisutnosti ili odsutnosti hromozoma Y u biblioteci. Za blizanačke uzorke se ne može izveštavati o aneuploidiji polnih hromozoma.

Rezultat „ANOMALY DETECTED“ (ANOMALIJA OTKRIVENA) ukazuje na to da je rezultat skrininga za uzorak pozitivan na jednu anomaliju ili više njih, u skladu sa izabranim tipom skrininga i opcijom izveštavanja o polnim hromozomima. Kada se otkrije anomalija, u izveštaju je naveden opis anomalije u citogenetskoj notaciji.

VeriSeq NIPT Assay Software v2 koristi statističke podatke generisane tokom sekvenciranja da bi pružio procenu fetalne frakcije (fetal fraction estimation, FFE) za svaki uzorak. FFE je procenjena komponenta fetalne cfDNK koja se dobija analizom i izražava kao zaokruženi procenat za svaki uzorak. Prosečna standardna devijacija ove procene za sve uzorke iznosi 1,3%. FFE se ne sme koristiti zasebno za potrebe izuzimanja uzoraka pri izveštavanju o rezultatima.

Za otkrivanje hromozomske predstavljenosti, VeriSeq NIPT Assay Software v2 koristi pojedinačni test pouzdanosti fetalne aneuploidije (Fetal Aneuploidy Confidence Test, iFACT) – pokazatelj sa dinamičkim pragom koji pokazuje da li je sistem generisao dovoljnu pokrivenost sekvenciranja, uzimajući u obzir procenu fetalne frakcije za svaki uzorak. Negativna otkrivanja se evidentiraju samo ako uzorak prelazi iFACT prag. Ako uzorak ne dosegne taj prag, procena kontrole kvaliteta prikazuje „FAILED iFACT“ (NEUSPEO iFACT) i sistem ne generiše rezultat.

Osim iFACT-a, VeriSeq NIPT Assay Software v2 tokom analize procenjuje još nekoliko pokazatelja kontrole kvaliteta. Dodatni pokazatelji obuhvataju procenu uniformnosti pokrivenosti u referentnim genomskim regionima i raspodelu dužina fragmenata cfDNK. Procena kontrole kvaliteta prikazuje zastavicu kontrole kvaliteta ili neuspelu kontrolu kvaliteta za sve pokazatelje izvan prihvatljivog opsega. U slučaju neuspele kontrole kvaliteta, sistem ne generiše rezultat za uzorak. Ako kontrola kvaliteta uzorka nije uspeła, on se može ponovno obraditi pod uslovom da je zapremina plazme u epruveti za prikupljanje krvi dovoljna.

VeriSeq NIPT Solution v2 generiše podatke koji se koriste u završnom izveštaju. Ne generiše završni izveštaj za pacijenta. Korisnici su odgovorni za pripremu završnog izveštaja i njegov sadržaj, kao i za njegovo dostavljanje odgovarajućem lekaru. Illumina nije odgovorna za tačnost teksta završnog izveštaja namenjenog korisnicima.



OPREZ

Proverite procenjene fetalne frakcije za sve uzorke. Ako su procenjene fetalne frakcije slične za sve uzorke u obradi, možda je došlo do amalgamacije uzoraka koja je uticala na rezultate. Obratite se tehničkoj podršci kompanije Illumina za pomoć pri rešavanju problema.

Karakteristike učinka

Sledeći podaci navedeni u odeljcima o kliničkom i analitičkom učinku generisani su upotrebom protokola i materijala navedenih u uputstvima za upotrebu počevši od plazme. Svi podaci dobijeni sekvenciranjem navedeni u ovom odeljku generisani su na sistemu za sekvenciranje NextSeq 500/550 ili sistemu za sekvenciranje NextSeq 550Dx sa sledećim konfiguracijama:

	NextSeq 500/550	NextSeq 550Dx
Softver u instrumentu	NextSeq Control Software 4.0	NextSeq Operating Software 1.3
Verzija kompleta reagensa	Komplet reagensa NextSeq 500/550 High Output v2.5 (75 ciklusa)	Komplet reagensa NextSeq 550Dx High Output v2.5 (75 ciklusa)
Metod sekvenciranja	obrada sekvenciranjem 2x36 uparenih krajeva u režimu rada visoke snage	obrada sekvenciranjem 2x36 uparenih krajeva u režimu rada visoke snage

Klinička studija

Klinička tačnost softvera VeriSeq NIPT Solution v2 pokazana je obradom uzoraka plazme trudnih žena sa jednoplođnim i blizanačkim trudnoćama. Uzorci su dobijeni iz deidentifikovanih uzoraka plazme iz banki plazme koji su prethodno obrađeni iz uzoraka periferne pune krvi. Više od 45.000 uzoraka je razmotreno za uključivanje u ispitivanje. Ti su uzorci prethodno prošli prenatalni skrining za aneuploidije hromozoma kod fetusa i delimične delecije i duplikacije veličine 7 Mb ili veće. Svi uzorci zahvaćenih trudnoća i podskup uzastopnih uzoraka nezahvaćenih trudnoća ispunjavali su uslove za testiranje ukoliko su klinički ishodi bili dostupni i kriterijumi za uzorke ispunjeni. U skupu za analizu testa bilo je ukupno 2335 uzoraka. U tom skupu je 2328 uzoraka bilo iz jednoplođnih trudnoća, a sedam iz blizanačkih trudnoća.

28 od tih uzoraka (1,2%, 28/2335) palo je na kontroli kvaliteta analize pri prvom prolazu tokom analize obrađenih podataka dobijenih sekvenciranjem:

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

Demografski podaci i karakteristike trudnoće

Tabela 7 prikazuje rezime podataka o starosti majke, gestacijskoj starosti i trimestru trudnoće za uzorke u skriningu celog genoma, uključujući uzorke sa poznatim mozaicima.

Upoređeni su demografski podaci za kohorte osnovnog skrininga i za kohorte skrininga celog genoma i nisu uočene statističke razlike. Demografski podaci i karakteristike trudnoće bili su slični bez obzira na to da li su poznati mozaici bili uključeni ili izuzeti.

Tabela 7 Demografski podaci i karakteristike trudnoće

Rezime statističkih podataka	Ceo genom (uključujući poznate mozaike)
Broj uzoraka	2307*
Starost majke – godine	
Srednja vrednost	35,08
Standardna devijacija	4,04
Medijana	34,95
25. percentil, 75. percentil	32,31, 37,79
Minimum, maksimum	20,22, 53,02
Gestacijska starost pri vađenju krvi – u nedeljama	
Srednja vrednost	10,93
Standardna devijacija	1,20
Medijana	10,57
25. percentil, 75. percentil	10,29, 11,14
Minimum, maksimum	10,00, 27,86
Trimester trudnoće – n (%)	
< prvi (<14 nedelja)	2252 (98%)
Drugi	54 (2%)
Treći (≥ 27 nedelja)	1 (0%)

* Predstavljani završni uzorci obuhvatali su 7 blizanaca.

Klinički učinak

Rezultati koje daje VeriSeq NIPT Solution v2 upoređeni su sa ishodima prema kliničkom referentnom standardu. Ishodi prema kliničkom referentnom standardu (klinička saznanja) svih ispitanih uzoraka bili su povezani sa stanjem fetalne hromozomske aneuploidije i delimičnim delecijama i duplikacijama veličine najmanje 7 Mb. Ishodi prema kliničkom referentnom standardu za uzorke u ovom ispitivanju zavisili su od rezultata analize hromozoma ili fizičkog pregleda novorođenčeta uz negativan NIPT skrining test zasnovan na sekvenciranju nove generacije (NGS). Osoblje obučeno za izvođenje studije obavilo je klasifikaciju podataka kliničkog referentnog standarda u skladu sa dokumentom sponzora sa šiframa u medicini.

Metode analize hromozoma uključivale su kariotipsku analizu, fluorescentnu in situ hibridizaciju (fluorescence in situ hybridization, FISH) ili analizu hromozomskih mikronizova (chromosome microarray, CMA) komparativnom genomskom hibridizacijom. Analiza hromozoma obavljena je na perifernoj krvi ili pljuvački novorođenčeta ili bebe, uzorcima proizvoda začeća (products of conception, POC), amniocitima, horionskim resicama, tkivu posteljice ili krvi iz pupčane vrpce nakon porođaja.

Mozaicizam se definiše kao prisustvo dve ili više ćelijskih linija različitog hromozomskog sastava kod pojedinca. Ćelijske linije potiču od istog zigota. Vrsta i nivo mozaicizma su različiti i zavise od vremena mozaičkih slučajeva tokom embriogeneze i fetalnog razvoja. U prenatalnim dijagnozama se pojavljuju različite vrste mozaicizma u zavisnosti od raspodele abnormalnih ćelijskih linija u odnosu na normalne u citotrofoblastu, mezenhimu ili fetusu.¹⁰ lako se mozaicizam može videti kod bilo koje hromozomske anomalije, zastupljeniji je kod retkih trizomija nego kod trizomija hromozoma 21, 18 i 13 (T21, T18 i T13).¹¹ Prilikom procene performansi slučajevi mozaicizma bili su obuhvaćeni analizom na nivou celog genoma jer je svrha ove vrste skrininga za ovu analizu otkrivanje retkih autozomnih aneuploidija (rare autosomal aneuploidies, RAA).

Učinkak osnovnog skrininga

Kod osnovnog skrininga anomalije obuhvataju T21, T18 i T13. Analizom su obuhvaćena ukupno 2243 jednoplodna i blizanačka uzorka. Svih sedam blizanačkih trudnoća je tačno otkriveno kao T21 i one nisu evidentirane u sledećoj tabeli.

Tabela 8 Osetljivost i specifičnost testa VeriSeq NIPT Solution v2 za otkrivanje trizomija 21, 18 i 13 u osnovnom skriningu za jednoplodne trudnoće (bez poznatih mozaicizama)

	T21	T18	T13
Osetljivost	> 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 pri osnovnom skriningu, kao što je prikazano u Tabela 8, računa se uz izuzimanje podskupa od 64 uzorka zahvaćenih retkim autozomnim aneuploidijama, autozomnim delimičnim delecijama ili duplikacijama ili poznatim mozaicizmom. Ta 64 uzorka uključuju osam mozaika T21 i tri mozaika T18. Pet od tih 11 uzoraka identifikovano je kao pogođeno anomalijom koju je otkrio softver za analizu VeriSeq NIPT Assay Software v2.

Učinkak skrininga celog genoma

Kod skrininga celog genoma, pod svim anomalijama podrazumevaju se trizomije, monozomije i delimične delecije ili duplikacije od 7 Mb ili veće. Uzorci za skrining celog genoma sastojali su se od 36 uzoraka s poznatim mozaicizmom. Testirano je ukupno 2307 jednoplodnih i blizanačkih uzoraka. Kod svih sedam blizanačkih trudnoća tačno je otkriveno da se radi o anomaliji hromozoma 21 i one nisu evidentirane u sledećim tabelama.

Učinkak skrininga celog genoma za sve anomalije

Tabela 9 Osetljivost i specifičnost softvera VeriSeq NIPT Solution v2 pri skriningu celog genoma za otkrivanje svih anomalija (uključujući i poznate mozaike)

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

Učinkak skrininga celog genoma za retku autozomnu aneuploidiju

Tabela 10 Osetljivost i specifičnost softvera VeriSeq NIPT Solution v2 pri skriningu celog genoma za retku autozomnu aneuploidiju (uključujući i poznate mozaike)

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

Učinkak skrininga celog genoma za delimične delecije i duplikacije

Tabela 11 Osetljivost i specifičnost softvera VeriSeq NIPT Solution v2 pri skriningu celog genoma za delimične delecije i duplikacije od 7 Mb ili veće (uključujući i poznate mozaike)

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

Razlike u učinku osnovnog skrininga i skrininga celog genoma

Metodologija računanja rezultata za česte trizomije i aneuploidije polnih hromozoma ista je za osnovni skrining i skrining celog genoma. U osnovnom skriningu algoritam se primenjuje samo na T21, T18 i T13. Međutim, kod skrininga celog genoma ta se metodologija proširuje tako da se analiziraju sve trizomije i retke aneuploidije autozoma, kao i delimične duplikacije i delecije.

Postoje dve razlike između opisanog izveštavanja o učinku osnovnog skrininga i učinku skrininga celog genoma. Kao prvo, kod skrininga celog genoma uzorci sa poznatim mozaicizmom za česte trizomije, kao i za retke aneuploidije autozoma i delimične delecije i duplikacije uključeni su u pokazatelje učinka. Kao drugo, kod skrininga celog genoma, po želji se može evidentirati otkrivanje delimične duplikacije ili delecije uz punu trizomiju. Prisutnost pune trizomije, pored delimične duplikacije ili delecije, može se videti pozivanjem na LLR rezultat naveden u dodatnom izveštaju.

Uvrštavanje mozaika u skrining celog genoma

Mozaicizam se navodi kao ograničenje ove analize. Kada je prisutan mozaicizam, smanjen je fetalni signal anomalije, pa može biti teže njeno otkrivanje bez ugrožavanja celokupne specifičnosti analize. Međutim, pošto je mozaicizam važniji za prošireni sadržaj, uzorci sa mozaicizmom su uvršteni u skrining celog genoma.

Od 64 uzorka uvrštena u skrining celog genoma, ali ne i u osnovni skrining, za 36 uzoraka je identifikovano da prema kliničkom referentnom standardu sadrže mozaicizam. Od tih 36 uzoraka, 23 otkrivanja podudarala su se sa kliničkim referentnim standardom.

Delimična delecija ili duplikacija u odnosu na otkrivanje aneuploidije celih hromozoma

VeriSeq NIPT Solution v2 sadrži opcije menija za osnovni skrining i skrining celog genoma. U osnovnom skriningu, rezultat „ANOMALY DETECTED“ (ANOMALIJA OTKRIVENA) prikazuje se samo kada je na hromozomima 21, 18 ili 13 otkrivena potpuna aneuploidija i ako su dostignuti svi pokazatelji kontrole kvaliteta. Kod skrininga celog genoma, sistem prepoznaje aneuploidiju kod svih autozoma i događaje delimične delecije i duplikacije veličine najmanje 7 Mb.

Pri korišćenju skrininga celog genoma, sistem daje prednost izveštavanju o događajima delimične delecije ili duplikacije, a ne otkrivanju celog hromozoma ako veličina delimične delecije ili duplikacije pokriva 75% ili manje hromozoma na kom je događaj otkriven. Ako je region sa delimičnom delecijom i duplikacijom veći od 75% veličine hromozoma, događaj se prijavljuje kao puna trizomija ili monozomija celog hromozoma. Zato delecije i duplikacije značajne veličine koje čine manje od 75% veličine hromozoma mogu biti indikacija za aneuploidiju celog hromozoma.

LLR rezultat za klasifikaciju celog hromozoma je kod svih uzoraka dostupan u dodatnom izveštaju.

Pre tumačenja rezultata treba pregledati LLR rezultat u vezi sa navedenom gornjom granicom na: [Slika 2 na stranici 41](#). LLR rezultati na nivou hromozoma koji premašuju gornju granicu dodatno podržavaju tumačenje koje odgovara aneuploidiji celog hromozoma.

U kliničkom ispitivanju su bila dva uzorka jednoplodne trudnoće sa značajno velikim duplikacijama (jedna na hromozomu 21 i druga na hromozomu 18) koje su bile manje od 75% relativne veličine hromozoma (pogledajte [Tabela 12](#)). Oba događaja bila su navedena kao delimične duplikacije, a ne puna trizomija tog hromozoma.

LLR rezultati za te događaje bili su iznad gornje granice u skladu sa zahvaćenim ishodom za punu trizomiju.

Kod otkrivanja delimične duplikacije ili pune trizomije, postupanje nakon pozitivnog otkrivanja NIPT-om jeste da se pacijentu ponudi testiranje radi potvrde putem prenatalnih dijagnostičkih testova.

Tabela 12 Primeri događaja velike duplikacije identifikovani u skriningu celog genoma

	Klinička saznanja	Ishod sistema za ceo genom	Veličina anomalije (Mb)	% hromozoma	LLR rezultati
Uzorak 1	Jedan plod sa trizomijom 21	Delimična duplikacija na 21	22,50	48,9%	19,43
Uzorak 2	Jedan plod sa trizomijom 18	Delimična duplikacija na 18	47,00	60,2	12,99

Da biste saznali više o pokazateljima kontrole kvaliteta koji se koriste za izveštavanje o rezultatima aneuploidije, pogledajte *Vodič za softver VeriSeq NIPT Solution v2 (br. dokumenta 100000067940)*.

Polni hromozomi

Rezultati koji se odnose na polne hromozome dobijeni testom VeriSeq NIPT Solution v2 upoređeni su sa ishodom prema kliničkom referentnom standardu i rezime je prikazan u sledećoj tabeli. Izračunat je procenat konkordantnosti za svaki polni hromozom u svakom ishodu prema kliničkom referentnom standardu. Procenat konkordantnosti izračunat je kao broj uzoraka kod kojih se otkrivanje polnih hromozoma od strane testa VeriSeq NIPT Solution v2 podudaralo sa klasifikacijom prema kliničkom referentnom standardu, podeljen ukupnim brojem uzoraka sa istom klasifikacijom prema kliničkom referentnom standardu.

Tabela 13 Procenat konkordantnosti za fetalnu klasifikaciju pola*

Fetalna klasifikacija pola		Fenotip prema fizičkom pregledu novorođenčeta		Citogenetski rezultati							
Otkriveno	Kariotip	Ženski pol	Muški pol	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 je otkrivena	XO	0	0	0	0	19	0	0	1	0	0
Anomalija je otkrivena	XXX	0	0	0	0	0	17	0	0	1	0
Anomalija je otkrivena	XXY	0	0	0	0	0	0	23	0	1	0
Anomalija je otkrivena	XYY	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0
Ukupno		997	966	21	15	21	17	23	12	2	1
Procenat konkordantnosti		100	100	100	100	90,5	100	100	91,7	Nije primenjivo	Nije primenjivo

* Pet blizanačkih trudnoća ispravno je klasifikovano kao prisutnost hromozoma Y. Dve trudnoće su ispravno klasifikovane kao nepresutnost hromozoma Y.

** Drugi citogenetski rezultati bili su XXXXX i XYY.

Pozitivna prediktivna vrednost i negativna prediktivna vrednost testa VeriSeq NIPT Solution v2

Pozitivna prediktivna vrednost (PPV) i negativna prediktivna vrednost (NPV) testa daju informaciju o njegovoj sposobnosti da utiče na kliničke odluke na osnovu osetljivosti, specifičnosti i verovatnoće pre testa da je fetus zahvaćen trizomijom (zastupljenost). PPV i NPV zavise od zastupljenosti, a zastupljenost tih aneuploidija može se razlikovati u različitim populacijama ispitanika, pa su PPV i NPV izračunati za niz smislenih vrednosti zastupljenosti na osnovu vrednosti osetljivosti i specifičnosti uočenih u osnovnom skriningu (bez poznatih mozaika) kliničkog ispitivanja tačnosti. **Tabela 17** se zasniva na skriningu celog genoma (sa poznatim mozaicima).

Tabela 14 Zastupljenost trizomije 21, PPV i NPV u osnovnom skriningu (izuzimajući poznate mozaike)

Zastupljenost (%)	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

Tabela 15 Zastupljenost trizomije 18, PPV i NPV u osnovnom skriningu (izuzimajući poznate mozaike)

Zastupljenost (%)	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

Tabela 16 Zastupljenost trizomije 13, PPV i NPV u osnovnom skriningu (izuzimajući poznate mozaike)

Zastupljenost (%)	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

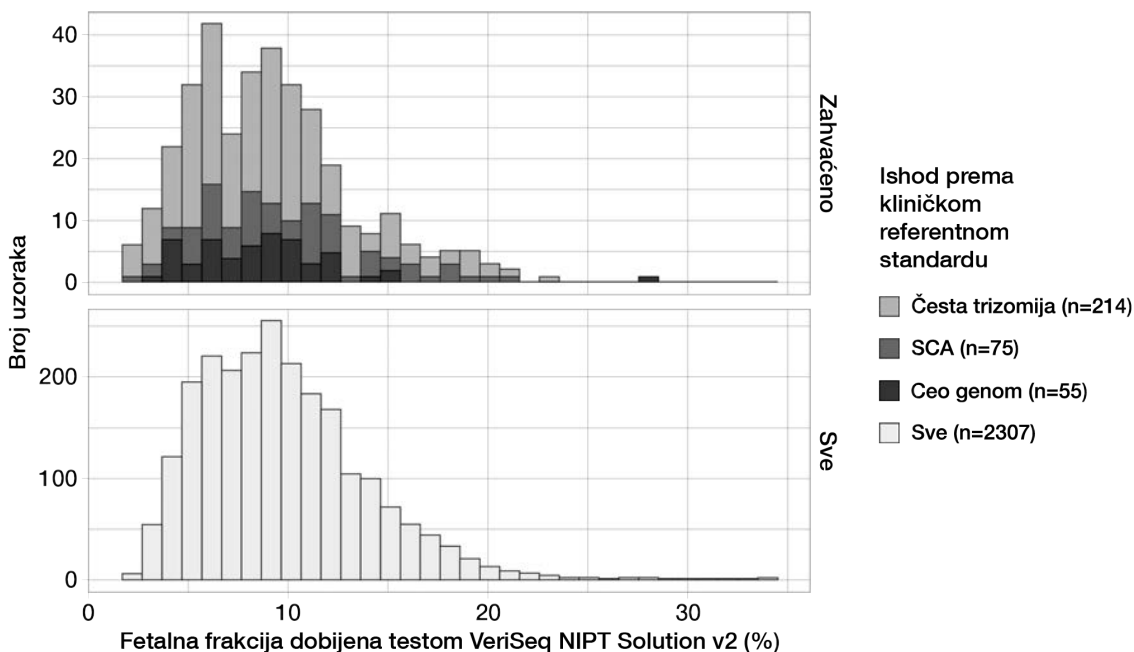
Tabela 17 Zastupljenost bilo koje anomalije, PPV i NPV u skriningu celog genoma (uključujući poznate mozaike)

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

Raspodela fetalne frakcije

Raspodela procena fetalne frakcije (FF) koje su dobijene testom VeriSeq NIPT Solution v2 za skrining celog genoma sa mozaicizmima pokazana je pomoću kategorije ishoda prema Kliničkom referentnom standardu na Slika 1.

Slika 1 Raspodela fetalne frakcije



5 uzoraka je imalo anomalije iz više kategorija.

Česta trizomija obuhvata uzorke sa trizomijom 21, 18 i/ili 13.

Ceo genom obuhvata uzorke sa RAA ili delimičnim delecijama i/ili duplikacijama.

Procene fetalne frakcije su se kretale od 2% do 34% ukupno, sa medijanom od 9% i interkvartilnim rasponom (IQ) od 6% do 12%. Medijana procene fetalne frakcije za česte trizomije i događaje otkrivene skriningom celog genoma iznosi 8%, a za aneuploidije polnih hromozoma (Sex chromosome aneuploidy, SCA) iznosi 9%. Opseg procena fetalne frakcije bio je dosledan za sve ishode. Nema očiglednog pomaka u raspodeli fetalne frakcije među čestim trizomijama, aneuploidijama polnih hromozoma, događajima otkrivenim tokom skrininga celog genoma, kao ni svih uzoraka u analizi celog genoma.

Učinak kod blizanačkih trudnoća

Procena učinka trizomije 13, 18 i 21 i učinka delovanja hromozoma Y u blizanačkim trudnoćama

Zbog male zastupljenosti trizomije 21, 18 i 13 u blizanačkim trudnoćama samo je mali broj zahvaćenih uzoraka blizanaca bio dostupan za kliničko ispitivanje. Da bi se procenio učinak softvera VeriSeq NIPT Solution v2 u blizanačkim trudnoćama, računarski (*in silico*) modeli zasnovani na osmatranjima kliničkih uzoraka korišćeni su za simulaciju populacija blizanačkih trudnoća. Ova simulacija je bila u skladu sa namenskom populacijom. Raspodela fetalne frakcije određena je iz otprilike 4500 uzoraka blizanaca i upoređena sa raspodelom iz oko 120.000 jednoplodnih uzoraka. Raspodela fetalne frakcije koja zavisi od statusa aneuploidije određena je iz pretpostavljenih jednoplodnih otkrivanja (1044 trizomije 21, 307 trizomija 18 i 192 trizomije 13). Kombinovanje ove dve raspodele omogućilo je donošenje zaključka o otkrivanju aneuploidije kod blizanaca. Simulirani su skupovi dizigotnih i monozigotnih blizanaca i uzet je ponderisani prosek koji predstavlja njihovu zastupljenost u namenskoj populaciji (2 dizigotni: 1 monozigotni) radi procene osetljivosti. Radi specifičnosti, simulirani su skupovi nezahvaćenih blizanaca.

Frakcija svakog simuliranog uzorka zahvaćena trizomijom (tj. zahvaćena frakcija) različito je izračunata za svaku kategoriju uzorka:

- ▶ Kod monozigotnih blizanaca zahvaćena frakcija svakog uzorka postavljena je na 1,0 jer u toj situaciji trizomija pogađa oba blizanca.
- ▶ Kod dizigotnih blizanaca pretpostavljeno je da je samo jedan blizanac pogođen (izuzetno su retki slučajevi u kojima su zahvaćena oba dizigotna blizanca). Vrednosti zahvaćene frakcije simulirane su pomoću poznate raspodele odnosa fetalne frakcije utvrđene na osnovu kliničkih uzoraka blizanaca različitog pola. Korišćen je konzervativni pristup prema kom je pretpostavljeno da zahvaćeni blizanac uvek ima najnižu fetalnu frakciju među blizancima. Primenjen je faktor korekcije za fetalne frakcije koje su u proseku niže kod trudnoća sa trizomijom 13 i 18.
- ▶ Kod nezahvaćenih blizanaca zahvaćena frakcija svakog uzorka podešena je na nulu.

Kod blizanaca zahvaćenih ili trizomijom 18 ili trizomijom 13, smanjena je fetalna frakcija koja odgovara zahvaćenoj frakciji uzorka. Smanjenje je bilo proporcionalno prosečnom smanjenju fetalne frakcije uočenom u kliničkim podacima kod jednoplodnih trudnoća sa trizomijom 18 ili 13 u odnosu na euploidne jednoplodne trudnoće.

Ukupna fetalna frakcija i zahvaćena frakcija svakog simuliranog uzorka zatim su korišćene za izračunavanje rezultata aneuploidije pomoću standardnog algoritma softvera VeriSeq NIPT Solution v2. Osetljivost je izračunata određivanjem učestalosti slučajeva u kojima su rezultati aneuploidije za simulirane zahvaćene blizance bili iznad odgovarajuće granične vrednosti za aneuploidiju. U skladu s tim, specifičnost je izračunata određivanjem koliko su često rezultati aneuploidije za simulirane nezahvaćene blizance bili ispod odgovarajuće granične vrednosti za aneuploidiju (Tabela 18). Intervali pouzdanosti (CI) od 95% procenjeni su na osnovu broja stvarnih kliničkih blizanačkih uzoraka u izvornom skupu podataka, koji su bili klasifikovani kao zahvaćeni ili nezahvaćeni relevantnom trizomijom.

Radi procene osetljivosti hromozoma Y u blizanačkim uzorcima simulirani su skupovi blizanaca XY/XY i XX/XY. Uzet je ponderisani prosek koji predstavlja njihovu učestalost u namenskoj populaciji (1 XY/XY: 1 XX/XY). Radi procene specifičnosti hromozoma Y kod blizanaca simuliran je skup blizanaca XX/XX. Ukupne vrednosti fetalne frakcije simulirane su u skladu sa poznatom raspodelom fetalne frakcije u kliničkim uzorcima blizanaca.

Za blizance XY/XY i XX/XY procenjeni su odgovarajući rezultati hromozoma Y pomoću poznatog odnosa između fetalne frakcije i rezultata hromozoma Y u kliničkim jednoplodnim uzorcima koji su klasifikovani kao uzorci muškog pola. Samo u slučaju blizanaca XX/XY simulirane su vrednosti zahvaćene (tj. muške) fetalne frakcije pomoću poznate raspodele odnosa fetalne frakcije uočenih između blizanaca iz iste trudnoće, kao što je utvrđeno kliničkim uzorcima blizanaca različitog pola. Korišćen je konzervativni pristup, pa je odabrana zahvaćena frakcija koja je odgovarala manjem od dva blizanca. Za svaki simulirani uzorak XX/XY, rezultat hromozoma Y pomnožen je zahvaćenom frakcijom.

U slučaju blizanaca XX/XX, rezultati hromozoma Y uzorkovani su iz rezultata uočenih iz kliničkih jednoplodnih uzoraka koji su klasifikovani kao uzorci ženskog pola. Rezultat hromozoma Y i ukupna fetalna frakcija zatim su korišćeni za klasifikaciju svakog simuliranog uzorka kao onog u kom je hromozom Y prisutan ili odsutan pomoću standardnog algoritma softvera VeriSeq NIPT Solution v2.

Osetljivost je izračunata određivanjem učestalosti tačne klasifikacije simuliranih blizanaca XY/XY ili XX/XY kao onih kod kojih je hromozom Y prisutan. Specifičnost je izračunata utvrđivanjem koliko su često simulirani blizanci XX/XX bili tačno klasifikovani kao da ne sadrže hromozom Y. Intervali pouzdanosti (CI) od 95% procenjeni su na osnovu broja stvarnih kliničkih uzoraka blizanaca u izvornom skupu podataka koji su bili klasifikovani kao oni kod kojih je hromozom Y prisutan ili odsutan.

Tabela 18 Procene za trizomiju 21, 18 i 13 u simuliranoj populaciji blizanačkih trudnoća

	Trizomija 21	Trizomija 18	Trizomija 13	Prisutnost hromozoma Y
Osetljivost	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%)
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%)

Tabela 18 prikazuje punktualne procene i procenjene intervale pouzdanosti od 95% za osetljivost i specifičnost softvera VeriSeq NIPT Solution v2 u prepoznavanju trizomije 21, 18, 13 i prisutnosti hromozoma Y u simuliranoj populaciji blizanačkih trudnoća u skladu sa namenskom populacijom. Intervali pouzdanosti su procenjeni na osnovu broja kontrola kvaliteta koje su prošli klinički uzorci blizanaca klasifikovani kao zahvaćeni ili nezahvaćeni relevantnom trizomijom. Proračun osetljivosti podrazumeva da su dve trećine zahvaćenih blizanačkih trudnoća dizigotne sa jednim zahvaćenim blizancem, dok je jedna trećina zahvaćenih blizanačkih trudnoća monozigotna sa zahvaćena oba blizanca.

Procene navedene u **Tabela 18** odnose se samo na blizanačke trudnoće. Zbog još manje zastupljenosti, podaci za višeploidne trudnoće (troplodne ili više) nisu bili dovoljni za utvrđivanje odgovarajućih statističkih modela za procenu tačnosti otkrivanja aneuploidije.

Analitički učinak

Preciznost

Da bi se procenila i kvantifikovala preciznost analize, softver za tok analize VeriSeq NIPT Solution v2 korišćen je za ponovnu analizu podataka iz dve prethodne studije obavljene pomoću sistema VeriSeq NIPT Solution:

- ▶ studije o moći reprodukcije na više mesta koja se sastojala od tri obrade izvedene od strane tri laboranta na tri mesta, uz korišćenje jedne serije reagensa za ukupno devet obrada.
- ▶ studije o preciznosti unutar laboratorije koja se sastojala od 12 obrada na jednom mestu pomoću dve platforme ML STAR, dva sistema instrumenata za sekvenciranje i tri serije reagensa za sekvenciranje.

Cilj studije o preciznosti bio je kvantifikovanje preciznosti analize koja se odnosi na trizomiju 21 (T21) i hromozom Y, kao i procena varijabilnosti između različitih instrumenata, kompleta za pripremu biblioteka i serija reagensa za sekvenciranje.

Stvoren je skup fetalne frakcije T21 od 5% kombinovanjem cfDNK izdvojene iz majčine plazme trudnih žena (sa fetusom koji ima T21) i cfDNK izdvojene iz plazme žena koje nisu trudne. Stvoren je i skup cfDNK majčinog i muškog pola (fetus XY) fetalne frakcije od 10%. Panel uzorka za svaku studiju za svaku obradu obuhvatao je 4 replikata skupa uzoraka sa fetalnom frakcijom od 5% zahvaćenih sa T21 i 20 replikata skupa cfDNK majčinog i muškog pola sa fetalnom frakcijom od 10%. Testiranje je obavljano tokom 10 dana i obavljena je ukupno 21 obrada za kombinaciju dve studije.

Za procenu su odabrani T21 i prisutnost hromozoma Y, na osnovu reprezentativnosti kliničkih uslova i složenosti otkrivanja anomalije. Veličina hromozoma 21, kao najmanjeg ljudskog autozoma, direktno utiče na osetljivost otkrivanja T21, naročito pri niskim vrednostima fetalne frakcije kakve su korišćene u ovoj studiji. Hromozom Y u obliku u kom je prisutan u majčinoj plazmi isključivo je fetalnog porekla, pa ga zato analiza lakše otkriva.

Uočena srednja i standardna devijacija LLR rezultata za hromozom 21 i normalizovane hromozomske vrednosti za hromozom Y (NCV) pokazale su da je standardna devijacija replikata (SD) bila najveći izvor varijabilnosti. Varijacije između mesta, instrumenata i serija reagensa dodale su neznatnu količinu varijabilnosti, kao što pokazuje razlika između ukupne SD i SD replikata u **Tabela 19** i **Tabela 20**.

Tabela 19 Rezime standardne devijacije (SD) odziva sekvenciranja na više mesta (moć reprodukcije)

Odziv	N	Srednja vrednost	SD replikata	Ukupna SD moći reprodukcije*
LLR rezultat za hromozom 21	36	34,43	11,36	11,36
NCV za hromozom Y	180	190,56	7,96	10,20

* Ukupna vrednost obuhvata varijabilnost zbog mesta, laboranta, obrade, dana i replikata.

Tabela 20 Rezime preciznosti odziva sekvenciranja unutar laboratorije

Odziv	N	Srednja vrednost	SD replikata	Ukupna SD unutar laboratorije*
LLR rezultat za hromozom 21	48	36,01	9,07	10,25
NCV za hromozom Y	240	198,68	7,63	7,82

* Ukupna vrednost obuhvata varijabilnost zbog instrumenata za sekvenciranje, serije reagensa, laboranta, obrade, dana i replikata.

Obavljena je dodatna studija radi poređenja preciznosti sekvenciranja sistemom VeriSeq NIPT Solution v2 (ukupna standardna devijacija) uz korišćenje ćelije toka verzije 2.0 u odnosu na ćeliju toka verzije 2.5. Studija je obuhvatala dve vrste ćelija toka (v2.0 i v2.5), tri serije kompleta za sekvenciranje, četiri sistema instrumenata i dve obrade sekvenciranjem po kombinaciji, što je ukupno 48 obrada za jedno mesto. Pripremljen je jedan skup za sekvenciranje iz pločica cfDNK koje su ručno pripremljene. Panel uzorka je obuhvatao 4 replikata skupa uzoraka sa fetalnom frakcijom od 5% zahvaćenih sa T21 i 20 replikata skupa cfDNK majčinog i muškog pola (fetus XY) sa fetalnom frakcijom od 10%. Rezultati ove studije predstavljeni su u **Tabela 21** i podržavaju tezu da nema razlike u preciznosti sekvenciranja kada se koriste ćelije toka v2.0 i ćelije toka v2.5.

Tabela 21 Rezime preciznosti odziva sekvenciranja kada se koriste ćelije toka v2.0 i ćelije toka v2.5

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

* Ukupna vrednost obuhvata varijabilnost zbog instrumenta za sekvenciranje, serije reagensa, obrade, dana, replikata

**Na osnovu F-testa jednakosti varijansi (kvadrat standardne devijacije)

Unakrsna kontaminacija

Unakrsna kontaminacija procenjena je kroz tok rada pripreme uzorka uređaja VeriSeq NIPT Solution. Testirani su skupovi plazme žena koje nisu trudne (XX) i odraslih muškaraca (XY) prema uzorku šahovske table u formatu pločice sa 96 otvora 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 hromozoma Y koja bi bila statistički veća od procenjene pozadine, što znači da nije bilo unakrsne kontaminacije muškim uzorcima sa iste pločice. U softveru VeriSeq NIPT Solution nije otkrivena unakrsna kontaminacija.

Potencijalno ometajuće (interferirajuće) supstance

Uticaj potencijalno ometajućih supstanci na VeriSeq NIPT Solution određen je procenom učinka analize u prisustvu takvih supstanci.

U skupove majčine plazme nezahvaćenih ženskih trudnoća (fetus XX) dodati su albumin, bilirubin, hemoglobin i trigliceridi (endogeni). Skupovi su testirani pri dve koncentracije svake od testnih supstanci (n=16 za svaku). Nisu uočeni ometajući uticaji na učinak analize.

Tabela 22 Potencijalno ometajuće supstance (endogene)

Testna supstanca	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 prisutna genomska DNK (gDNK) majke u plazmi može potencijalno ometati učinak analize jer se može izdvojiti zajedno s fetalnom cfDNK. Genomska DNK u nivoima od 1,6, 3,3 i 4,9 ng po uzorku (što odgovara standardnoj devijaciji 1, 2 i 3 iznad srednje očekivane vrednosti koncentracije gDNK posle 7 dana skladištenja pune krvi¹²) dodata je u cfDNK izdvojenju iz majčine plazme kod nezahvaćenih ženskih (fetus XX) trudnoća. Uzorci su zatim testirani u instrumentu VeriSeq NIPT Solution (n=16 za svaku koncentraciju). Nisu uočeni ometajući uticaji na učinak analize u prisustvu povišenih nivoa gDNK.

Dvadeset potencijalno ometajućih (interferirajućih) supstanci zasnovanih na lekovima (egzogenih) koji se često koriste ili prepisuju tokom trudnoće testirano je prema EP7-A2 (Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline-Second Edition). 20 potencijalnih interferenata kombinovano je u četiri skupa, dodato u majčinu plazmu kod nezahvaćenih ženskih (fetus XX) trudnoća i testirano uređajem VeriSeq NIPT Solution (N=16 za svaki skup). Nisu uočeni ometajući uticaji na učinak analize u prisustvu ovih egzogenih supstanci.

Tabela 23 Potencijalno ometajuće supstance (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	Natrijum fluorid	Nadolol

Granica otkrivanja

Granica otkrivanja (Limit of Detection, LOD) definiše se kao nivo fetalne frakcije koji odgovara 95% verovatnoći otkrivanja stanja koje se posmatra, npr. T21. Da bi se odredila granica otkrivanja uređaja VeriSeq NIPT Solution v2 za razna česta stanja, obavljena su odgovarajuća ispitivanja i statističke analize.

Verovatnoća otkrivanja stanja koje se posmatra u zahvaćenom uzorku koji se obrađuje uređajem VeriSeq NIPT Solution v2 prvenstveno zavisi od tri faktora:

- ▶ fetalne frakcije
- ▶ dubine sekvenciranja
- ▶ veličine i složenosti genomskog regiona koji se posmatra.

Ako pretpostavimo da je dubina sekvenciranja konstantna, određenu aberaciju je lakše otkriti u uzorku sa većim procentom fetalne frakcije nego u uzorku sa manjim procentom fetalne frakcije. I obratno, ako pretpostavimo da je fetalna frakcija konstantna, određenu aberaciju je lakše otkriti u uzorku sa većom dubinom sekvenciranja nego u uzorku sa manjom dubinom sekvenciranja. Na kraju, aberacije u manjim ili složenijim genomskim regionima teže se otkrivaju nego aberacije u većim ili manje složenim genomskim regionima, uz pretpostavku da su fetalna frakcija i dubina sekvenciranja konstantne.

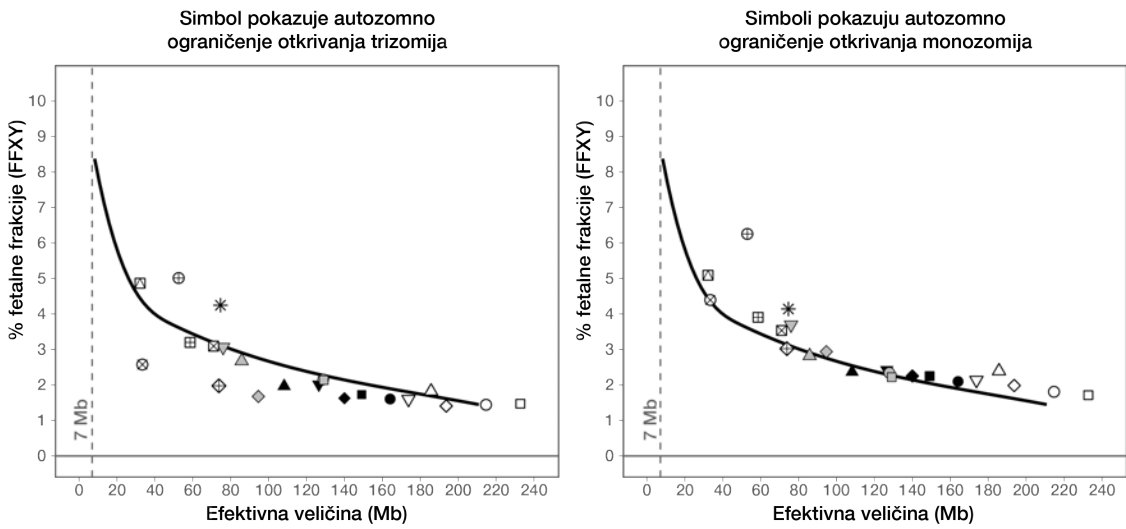
Da bi se odredio LOD za otkrivanje T21, analizirani su uzorci koji se sastoje od mešavine uzoraka iz skupa sa T21 i skupa sa nezahvaćenim uzorcima. Dve vrste analita pomešane su preko titracijske serije radi stvaranja skupa od sedam nivoa fetalne frakcije (0, 2, 3, 4, 5, 6 i 10 %). Svaki nivo je predstavljalo ukupno 10 replikata.

Da bi se dodatno povećala rezolucija rešetke fetalne frakcije za LOD analizu, podaci iz tog ispitivanja pojačani su podacima dobijenim razređivanjem in silico (računarskom simulacijom). Efekti eksperimentalnog razređivanja i titracije simulirani su kontrolisanim mešanjem podataka dobijenih sekvenciranjem. Podaci dobijeni titracijom in silico pokrili su niz od 14 nivoa 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 svaki nivo. Na dobijene podatke primenjena je probit analiza da bi se utvrdio LOD za T21.

Nezavisno od toga, razvijen je statistički model utemeljen na fetalnoj frakciji, dubini sekvenciranja i genomskoj veličini/složenosti, koji predviđa verovatnoću otkrivanja bilo koje aberacije u bilo kom uzorku. Ovaj model je zasnovan na podacima koji odgovaraju skupu od 1405 uzoraka XY. Utvrđeno je da je LOD za T21, kao što je predvideo ovaj model, u skladu sa procenom zasnovanom na goreopisanoj probit analizi. Ovaj statistički model je korišćen za određivanje vrednosti LOD-a za aneuploidije na svim autozomima i za delimične delecije i duplikacije.

Slika 2 prikazuje 95% verovatnoću otkrivanja za regione prosečne veličine i autozomne granice otkrivanja za sve trizomije i monozomije.

Slika 2 Verovatnoća otkrivanja od 95% za regione prosečne veličine za VeriSeq NIPT Solution v2



Hrom.	Simbol	Trizomija		Monozomija	
		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

Hrom.	Simbol	Trizomija		Monozomija	
		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 problema

Otklanjanje problema sa softverom VeriSeq NIPT Solution v2

Režim greške	Mogući rezultat	Tumačenje	Preporučena radnja	Komentari
Nema dovoljno ulazne plazme	Neuspela kontrola kvaliteta uzorka	Nedovoljna zapremina plazme	Ponovo uzmite krv	Na osnovu vizuelne provere zapremine plazme.
Greška epruvete sa krvlju	Krv se nije razdvojila na slojeve	Uzorak nije centrifugiran	Proverite da li je centrifuga pokrenuta i da li je epruveta centrifugirana korišćenjem odgovarajuće sile. Ponovo uzmite uzorak.	
		Nepravilno skladištenje ili transport uzorka (hemoliza uzorka)	Ponovo uzmite uzorak.	Smrznuti uzorci se ne razdvajaju. Nepravilni uslovi transporta ili skladištenja mogu dovesti do hemolize uzorka.

Režim greške	Mogući rezultat	Tumačenje	Preporučena radnja	Komentari
Čep u uzorku/spor protok	Kontaminacija plazme	Pojedinačni uzorci mogu začepiti pločicu za vezivanje ako je uzorak plazme značajno kontaminiran	Proverite uzorak, pa ako je preostala plazma u epruveti crvena ili beličasta, otkazite uzorak i zatražite ponovno uzimanje uzorka. Ako uzorak izgleda normalno, ponovo ga testirajte.	
	Prelivanje uzorka	Neodgovarajuća vizuelna provera svake epruvete radi utvrđivanja prikladnosti uzorka.	Proglasite nevažećim uzorke u obližnjim otvorima koji su zahvaćeni prelivanjem.	Može da ukazuje na nepravilne uslove transporta ili skladištenja uzorka pre obrade. Neprikladne uzorke je potrebno izuzeti iz obrade.
	Kvar hardvera	Neodgovarajuća digestija materijala tokom ekstrahovanja	Ponovo testirajte uzorak. Ako se problem javlja i za otvore sa drugim uzorcima, obratite se tehničkoj podršci kompanije Illumina.	
Neuspela kvantifikacija pri kontroli kvaliteta	Neuspela obrada kvantifikacije – medijana serije je ispod minimuma	Nedovoljan prinos postupka	Ponovite kvantifikaciju. Ako ni ponavljanje ne uspe, obratite se tehničkoj podršci kompanije Illumina.	Prolaz pokazatelja standardne krive ukazuje na probleme s pripremom biblioteke.
	Neuspela obrada kvantifikacije	Neuspela standardna kriva	Ponovite kvantifikaciju. Ako ni ponavljanje ne uspe, obratite se tehničkoj podršci kompanije Illumina.	Česti uzroci neuspeha standardne krive obuhvataju nedovoljno otopljene reagense za kvantifikaciju, nedosledne zapremine u otvorima zbog prosipanja i degradacija reagensa za kvantifikaciju DNK (npr. zbog izlaganja svetlosti).
Greška pri formiranju skupova	Formiranje skupova uzoraka nije uspelo	Analiza formiranja skupova ne može da izračuna tačne zapremine skupova	Ponovo procenite koncentraciju ciljnog skupa, ponovo pokrenite analizu formiranja skupova.	Ova greška se može javiti kada svi uzorci u seriji imaju niske vrednosti kvantifikacije, a vi ste podesili visoku koncentraciju skupa (obično veću od 3–5 pm).
Neuspela kontrola kvaliteta analize pojedinačnog uzorka	Neuspela kontrola kvaliteta sekvenciranja	Nema dovoljno ulaznog genetskog materijala ILLI pogrešan prenos tokom rukovanja uzorcima ILLI greška reagensa za sekvenciranje	Proverite oznake na uzorcima. Pogledajte da li je bilo sličnog učinka kod prethodnih uzoraka na relativnoj poziciji na pločici. Ponovo testirajte uzorak.	Ukazuje na loše ulazne uzorke ili pogrešan prenos na platformi ML STAR. Nedovoljna količina genetskog materijala može biti posledica nedovoljne količine DNK bez ćelija u plazmi ili DNK zasnovane na ćelijama koja dovodi do prekomernog razređivanja uzorka za sekvenciranje.
	Male vrednosti fetalne frakcije ili mali broj mesta koja nisu izuzeta (Low FF or Non-Excluded Sites (NES) count)	Nije generisano dovoljno podataka za precizan izveštaj	Ponovite testiranje na plazmi.	

Otklanjanje problema sa platformom VeriSeq NIPT Microlab STAR

Korak postupka	Kôd greške	Dijalog greške	Opis	Rešenje od strane korisnika
Formiranje serije	EM0044	The Batch ID entered contains forbidden characters. (Uneti ID serije sadrži zabranjene znakove.)	VeriSeq NIPT Solution v2 u svim poljima sa podacima prihvata samo brojeve, slova, donje crte i crte.	Promenite naziv serije tako da ne sadrži specijalne tekstualne znakove.
Formiranje serije	EM0051	The Batch ID is greater than 26 characters in length. (ID serije je duži od 26 znakova.)	VeriSeq NIPT Solution v2 ograničava dužinu naziva serija na najviše 26 znakova.	Promenite naziv serije tako da bude kraći od 26 znakova.
Formiranje 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 zahteve za podatke koje šalje Workflow Manager.	Uverite se: <ol style="list-style-type: none"> 1. Da je ML STAR povezan na mrežu. 2. Da je VeriSeq Onsite Server v2 uključen. 3. Da ML STAR može da se poveže sa serverom VeriSeq Onsite Server v2 (pomoću ping-zahteva). 4. Ako prethodni koraci ne reše problem, napišite e-poruku tehničkoj podršci kompanije Illumina. 5. Proverite da li je vakuumska boca za otpad puna više od polovine zapremine. Ako jeste, ispraznite bocu za otpad.
Formiranje serije	EM0118	This batch has been failed and cannot be further processed. (Ova serija nije ispravna i ne može se dalje obrađivati.)	Za navedenu seriju je već utvrđeno da nije ispravna i njena dalja obrada nije moguća.	Zapis o seriji na serveru VeriSeq Onsite Server v2 ukazuje na to da izabrana serija nije ispravna. Dalja obrada nije dozvoljena. Formirajte drugu seriju sa željenim uzorcima.
Formiranje serije	Nije primenjivo	This batch has already completed processing. (Obrada ove serije je već završena.) Would you like to repool? (Želite li ponovo da formirate skup?)	Navedena serija je obrađena kroz proces formiranja skupova. Jedina obrada koja može da se dozvoli je ponovno formiranje skupova.	Da biste ponovo formirali skup, izaberite Re-Pool (Ponovo formiraj skup). ILI Obustavite metod i proverite naziv skupa.
Izolovanje plazme	WP0087	Duplicate sample barcodes loaded. (Uneti su uzorci sa dupliranim bar-kodovima.)	U sistem su uneti uzorci sa identičnim bar-kodovima.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pratite upite softvera Workflow Manager da biste identifikovali duplikate uzoraka. 2. Uklonite te uzorke i promenite im nalepnicu ili ih zamenite. 3. Ponovo unesite uzorke.
Izolovanje plazme	EP0102	Samples specified in the Sample Sheet were not loaded. (Uzorci navedeni na listu sa uzorcima nisu uneti.)	Uzorci navedeni na listu sa uzorcima nisu uvršteni u unete bar-kodove.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pratite upite softvera Workflow Manager da biste identifikovali uzorke koji nedostaju. 2. Dodajte uzorke koji nedostaju u seriju i ponovo unesite uzorke. ILI Obustavite metod, izmenite list sa uzorcima prema potrebi i ponovo pokrenite metod.

Korak postupka	Kôd greške	Dijalog greške	Opis	Rešenje od strane korisnika
Postavljanje pločica	Nije primenjivo	Venus Barcode Mask Error (Greška maske Venus za bar-kodove)	Workflow Manager nameće ispravno povezivanje pločica sa serijom koristeći maske Venus za bar-kodove.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Proverite kako je postavljena pločica i potvrdite da je raspored pločice pravilan. 2. Uverite se da je postavljena pločica odgovarajuća za navedenu seriju.
Ekstrahovanje cfDNK	WE0150	Pressure in the vacuum chamber is too low. (Pritisak u vakuumskoj komori je prenizak.)	Workflow Manager neće nastaviti sa radom ako je vrednost pritiska vakuumske cevi u mirovanju < 400 Torr.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Proverite ima li zastoja ili drugih prepreka u vakuumskoj cevi. 2. Otvorite stezaljke za oslobađanje cevi za otpad, sačekajte da se pritisak smanji, pa zatvorite sasvim stezaljke za oslobađanje cevi. 3. Proverite da li su vakuumski kontrolor i pumpa uključeni. 4. Ako se problem nastavi, obratite se tehničkoj podršci kompanije Illumina.
	WE0153	Pressure in the vacuum chamber is too high. (Pritisak u vakuumskoj komori je previsok.)	Ako je pre pokretanja kontrole pritiska izmereni pritisak vakuuma previsok, može doći do kvara sistema.	Uverite se da su svi vakuumski spojevi i cevi na zadnjoj strani kontrolora učvršćeni.
Ekstrahovanje cfDNK	WE0996	Vacuum failed to seal. (Vakuumski spoj ne funkcioniše.)	Sistem ne može vakuumski da zatvori pločicu za vezivanje.	<p>NAPOMENA: Nemojte da izaberete „OK“ (U redu) sve dok se problem sa vakuumskim zatvaranjem ne reši.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Uverite se da je pločica za vezivanje u ravni sa vakuumskim razdelnikom. Rukom u rukavici i koristeći silu pritisnite pločicu za vezivanje prema dole. 2. Izaberite OK(U redu) da biste nastavili sa ekstrahovanjem cfDNK. 3. Ako se ova poruka o grešci prikaže više od tri puta tokom obrade, napišite e-poruku tehničkoj podršci kompanije Illumina.
	WM0219	If Vacuum is on, manually rest the pump. (Ako je vakuum uključen, ručno stavite pumpu u stanje mirovanja.)	Vakuum može ostati uključen posle obustavljanja metoda tokom ekstrahovanja.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Na vakuumskom kontroloru pritisnite dugme Power da biste isključili vakuum. 2. Sačekajte 10 sekundi, pa ponovo pritisnite dugme Power da biste uključili vakuum.
	EE0477	An error has occurred while moving a plate. (Došlo je do greške pri premeštanju pločice.) (iSWAP greška)	Ako se javi iSWAP greška (pad pločice, neuspelo podizanje i slično), sistem će od korisnika zatražiti da ručno završi premeštanje pločice.	<p>Uverite se da se pločica može koristiti (nema prosipanja materijala).</p> <p>– Ako to nije slučaj, obustavite obradu.</p> <p>– Ako može da se koristi, pratite prikazana uputstva da biste ručno završili prenos pločice.</p>
	EE0519	Scanned barcode does not match binding plate barcode on record. (Skenirani bar-kod se ne podudara sa bar-kodom pločice za vezivanje u zapisu.)	Postavljena pločica za vezivanje se ne podudara sa bar-kodom uklonjene pločice.	Uverite se da se pločica koja se postavlja podudara sa bar-kodom u zapisu (u evidenciji praćenja pogledajte koji se bar-kod očekuje).

Korak postupka	Kôd greške	Dijalog greške	Opis	Rešenje od strane korisnika
API	EA0372	Unable to connect to the data server. (Nije moguće povezivanje sa serverom podataka.)	VeriSeq Onsite Server v2 ne odgovara na zahteve za podatke koje šalje Workflow Manager.	Uverite se: 1. Da je ML STAR povezan na mrežu. 2. Da ML STAR može da se poveže sa serverom VeriSeq Onsite Server v2 (pomoću ping-zahteva). 3. Da je VeriSeq Onsite Server v2 uključen.
	EA0774	Connection Error. The API server connection failed to validate. (Greška u povezivanju – provera veze sa API serverom nije uspeła.)	VeriSeq Onsite Server v2 je prestao da odgovara na zahteve za podatke koje šalje Workflow Manager.	Uverite se: 1. Da je ML STAR povezan na mrežu. 2. Da ML STAR može da se poveže sa serverom VeriSeq Onsite Server v2 (pomoću ping-zahteva). 3. Da je VeriSeq Onsite Server v2 uključen.
	EA0780	403: Invalid Request. The current transaction is not valid. (403: Nevažeći zahtev. Trenutna transakcija nije važeća.)	Poslati podaci su u suprotnosti sa logikom toka rada sistema.	Pogledajte detalje o grešci da biste saznali više. Uobičajeni uzroci su predugi ulazni podaci ili unosi koji su u suprotnosti sa listom 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. Biochem. 2013;46: 1561–1565. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2013.06.002.
- 13 Bianchi D W, et al. "Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing." Obstet Gynecol 119 (2012): 890-901.
- 14 Ehrich M, et al. "Genome-wide cfDNA screening: clinical laboratory experience with the first 10,000 cases." Genet Med 19 (2017): 1332-1337.
- 15 Fiorentino F, et al. "The clinical utility of genome-wide cfDNA screening." Prenat Diagn 37 (2017): 593-601.
- 16 Pertile, MD, et al. "Rare autosomal trisomies, revealed by maternal plasma DNA sequencing, suggest increased risk of fetoplacental disease." Sci Transl Med 9 (2017): eaan1240.

Istorija revizija

Dokument	Datum	Opis promene
Br. dokumenta 100000079751 v06	Avgusta 2021.	<ul style="list-style-type: none"> • Adresa Illumina Netherlands je ažurirana.
Br. dokumenta 100000079751 v05	Decembar 2020.	<ul style="list-style-type: none"> • Odeljci „Načela postupka“, „Upozorenja i mere predostrožnosti“ i „Oznake proizvoda“ ažurirani su dodatnim razjašnjenjima u vezi sa ispunjavanjem regulatornih zahteva. • Manje promene sadržaja u protokolu radi podudaranja sa Illumina stilom i organizacijom. • Ispravljen je opis hromozoma 21 sa „drugi najmanji ljudski autozom“ na „najmanji ljudski autozom“ u odeljku „Preciznost“ u delu „Analitički učinak“. • Dodate su izjave o oprezi u vezi sa nepravilnom upotrebom rezervoara i opasnostima od amalgamacije uzoraka u odeljke „Izolovanje plazme“, „Priprema“ i „Tumačenje rezultata“. • Dodati su brojevi delova za nov server i softver za objavljivanje nove verzije modela servera i softvera. • Dodate su mere opreza u informacije o protokolu i otklanjanju problema u vezi sa sprečavanjem preliivanja uzoraka i rešavanjem tog problema. • Ažurirana je lista aktivnih sastojaka za kutiju sa dodatnim priborom dodavanjem reagensa Standard kvantifikacije DNK radi usklađenosti sa bezbednosno-tehničkim listom. • Ažuriran je način imenovanja za modul Local Run Manager VeriSeq NIPT radi doslednosti sa drugom dokumentacijom. • Dodata je istorija revizija.
Br. dokumenta 100000079751 v04	Oktobar 2020.	<ul style="list-style-type: none"> • Manje ispravke.
Br. dokumenta 100000079751 v03	Septembar 2020.	<ul style="list-style-type: none"> • Ažurirana je lista materijala kako bi prikazala specifikacije laboratorijske opreme uz poznate opcije kompatibilnosti.
Br. dokumenta 100000079751 v02	Avgusta 2020.	<ul style="list-style-type: none"> • Ažurirane su informacije o kliničkom učinku kako bi bolje prikazale razlike između osnovnog skrininga i skrininga celog genoma. • Dodate su nove razlike u učinku osnovnog skrininga i skrininga celog genoma. • Uklonjene su protivrečne informacije o opcionalnom dodatnom izveštaju iz odeljka „Načela postupka“. • Ažuriran je način imenovanja za softver VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 u dokumentu radi stilske doslednosti. • Ažurirane su adrese kompanije Illumina u Australiji i Holandiji kako bi prikazale nedavne promene.
Br. dokumenta 100000079751 v01	Avgust 2019.	Uklonjen je duplikat koraka u delu „Ekstrahovanje cfDNK“ koji je rezultat greške softvera za objavljivanje.
Br. dokumenta 100000079751 v00	Maj 2019.	Početno izdanje.

Patenti i žigovi

Ovaj dokument i njegov sadržaj su u vlasništvu kompanije Illumina, Inc. i njenih podružnica („Illumina“) i namenjeni su isključivo za ugovorno korišćenje njenih kupaca u vezi sa korišćenjem proizvoda koji su ovde opisani i ni za šta drugo. Ovaj dokument i njegov sadržaj ne smeju se koristiti niti distribuirati ni za koju drugu svrhu niti se smeju prenositi, otkrivati ili reprodukovati ni na koji način bez prethodnog pisanog pristanka kompanije Illumina. Illumina ne prenosi nikakvu licencu pod patentom, robnom markom, autorskim pravom ili javnim pravom niti sličnim pravima bilo kog trećeg lica prema ovom dokumentu.

Stručna i adekvatno obučena lica moraju strogo i izričito da poštuju uputstva u ovom dokumentu kako bi se obezbedila ispravna i bezbedna upotreba ovde opisanih proizvoda. Pre upotrebe tih proizvoda obavezno je u potpunosti pročitati i razumeti celokupnu sadržinu ovog dokumenta.

UKOLIKO NE PROČITATE I IZRIČITO NE PRATITE OVO UPUTSTVO U CELOSTI, TO MOŽE DA DOVEDE DO OŠTEĆENJA PROIZVODA, POVREDA LICA, KAO ŠTO SU KORISNICI ILI DRUGA LICA, I OŠTEĆENJA DRUGE IMOVINE I TIME ĆE SE PONIŠTITI SVAKA GARANCIJA KOJA SE ODNOSI NA PROIZVODE.

KOMPANIJA ILLUMINA NE PREUZIMA NIKAKVU ODGOVORNOST USLED NEADEKVATNE UPOTREBE OVDEOPISANIH PROIZVODA (UKLJUČUJUĆI I NJIHOVE DELOVE ILI SOFTVER).

© 2021. Illumina, Inc. Sva prava zadržana.

Svi žigovi su vlasništvo kompanije Illumina, Inc. ili odgovarajućih vlasnika. Konkretno informacije o žigovima potražite na adresi www.illumina.com/company/legal.html.

Kontakt informacije



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



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

Australijski sponzor

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

Oznake proizvoda

Sveobuhvatno objašnjenje simbola koji se mogu pojaviti na pakovanju i oznakama proizvoda potražite u legendi simbola za svoj komplet na veb-sajtu support.illumina.com.

Rezime bezbednosti i performansi (Summary of Safety and Performance, SSP) dostupan je na adresi <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>, nakon pokretanja evropske baze podataka za medicinska sredstva (Eudamed), gde je povezan sa identifikatorom osnovni UDI-DI (0081627002NIPTRP).