

„VeriSeq NIPT“ sprendimo 2 versija illumina®

Pakuotės lapelis

NAUDOTI „IN VITRO“ DIAGNOSTIKAI.

Numatytoji paskirtis

2 versijos „VeriSeq™ NIPT Solution“ yra *in vitro* diagnostikos tyrimas, naudojamas kaip patikros tyrimas siekiant aptikti vaisiaus viso genomo genetines anomalijas tiriant motinos periferinio visos sudėties kraujo mėginius, paimtus iš nėščiųjų, kai vaisiaus gestacinis amžius siekia ne mažiau nei 10 savaičių. 2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ naudojamas viso genomo sekoskaitos metodas siekiant aptikti dalines duplikacijas ir iškritas visose autosomose ir siekiant nustatyti visų chromosomų aneuploidijos būklę. Atliekant šį tyrimą taip pat galima tirti lytinių chromosomų aneuploidiją (SCA). Nustatant diagnozę ar priimant kitus su nėštumu susijusius sprendimus negalima remtis vien tik rezultatais, gautais naudojant šį gaminį.

2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ sudaro: „VeriSeq NIPT Workflow Manager v2“ (darbo eigos tvarkyklė), skirta „VeriSeq NIPT Microlab STAR“, „VeriSeq NIPT“ mėginių paruošimo rinkinys ir 2 versijos „VeriSeq“ vietinis serveris su 2 versijos „VeriSeq NIPT“ tyrimo programine įranga. 2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ skirtas naudoti su naujos kartos sekoskaitos prietaisu.

Tyrimo santrauka ir paaiškinimas

Vaisiaus chromosomų anomalijos, ypač aneuploidijos, t. y. neįprastas chromosomų skaičius, yra dažnai pasitaikančios priežastys, sukeliančios reprodukcinis sutrikimus, apsigimimus, raidos sutrikimus ir protinę negalią. Aneuploidija nustatoma 1 iš 300 gyvų gimusių kūdikių, bet gerokai didesni rodikliai siejami su persileidimais ir negyvagimiais.^{1,2} Iki šiol tokie sutrikimai tiriami taikant dviejų tipų prenatalinius tyrimus: diagnostinius tyrimus arba patikros tyrimus. Diagnostiniai tyrimai apima invazines procedūras, pvz., amniocentezę arba choriono gaurelių biopsiją. Šie tyrimų metodai laikomi aukščiausio lygio standartu, kalbant apie vaisiaus aneuploidijos nustatymą. Tačiau šie metodai kelia 0,11–0,22 % vaisiaus netekimo riziką.³ Įprasti kelių žymenų patikros tyrimai nekelia pavojaus nėštumui, nes tai yra neinvaziniai tyrimai, bet jų rezultatai ne tokie tikslūs kaip diagnostinių tyrimų. 21 chromosomos trisomijos aptikimo rodiklis siekia 69–96 %, atsižvelgiant į konkretų patikros tyrimą, motinos amžių ir vaisiaus gestacinį amžių tyrimo metu.⁴ Svarbu paminėti, kad tokių tyrimų klaidingai teigiamų rezultatų rodiklis yra maždaug 5 %, todėl gali reikėti atlikti invazinį diagnostinį tyrimą siekiant patvirtinti rezultatą, o tai padidina riziką netekti vaisiaus dėl atliekamos procedūros.⁴ Ultragarsiniai tyrimai taip pat padeda aptikti chromosomų anomalijas, bet rezultatų tikslumas dar mažesnis, nei naudojant kitus minėtus metodus.

Vaisiaus 21, 18, 13, X ir Y chromosomų aneuploidiją galima aptikti užtikrinant aukštą tikslumo lygį naudojant neinvazinį prenatalinį tyrimą (NIPT), kuriame taikomas ekstraląstelinės DNR (cfDNR), gautos iš motinos plazmos, kai gestacinis amžius yra ne mažesnis nei 10 savaičių, viso genomo sekoskaitos metodas. Neseniai atlikus kelių klinikinių tyrimų metaanalizę buvo nustatyti tokie 21 chromosomos trisomijos ir 18 chromosomos trisomijos svertiniai sutelktiniai aptikimo rodikliai ir specifiškumas vienvaisio nėštumo atveju: 21 chromosomos

trisomija – atitinkamai 99,7 % ir 99,96 %, 18 chromosomos trisomija – atitinkamai 97,9 % ir 99,96 %.⁵ Viename tyrime teigiama, kad naudojant NIPT kaip pagrindinės patikros tyrimą tiriant nėščiąsias patvirtinamųjų invazinių procedūrų skaičius gali sumažėti 89 %.⁶

Remiantis informacija apie gerokai mažesnį klaidingai teigiamų rezultatų rodiklį naudojant NIPT, palyginti su įprastais kelių žymenų patikros tyrimais, daugybė medicinos srities organizacijų paskelbė savo nuomones, paremiančias kelias NIPT naudojimo indikacijas.

Konkrečiau, Tarptautinė prenatalinės diagnostikos draugija (angl. „International Society for Prenatal Diagnosis“), Amerikos akušerių ir ginekologų kolegija (angl. „American College of Obstetricians and Gynecologists“, ACOG), Vaisiaus ir motinos medicinos draugija (angl. „Society for Maternal Fetal Medicine“, SMFM), Amerikos medicininės genetikos ir genomikos kolegija (angl. „American College of Medical Genetics and Genomics“, ACMG), Europos žmogaus genetikos draugija (angl. „European Society of Human Genetics“) ir Amerikos žmogaus genetikos draugija (angl. „American Society of Human Genetics“) rekomenduoja siūlyti NIPT visoms nėščiosioms.^{7,8,9} Rekomenduojama prieš atliekant tyrimą pasikonsultuoti, gauti informuoto asmens sutikimą ir atlikti diagnostinį tyrimą siekiant patvirtinti teigimą cfDNR patikros tyrimo rezultata.⁴

2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ yra neinvazinis in vitro diagnostikos (IVD) tyrimas, kuriame naudojami cfDNR fragmentų, gautų iš motinos periferinio visos sudėties kraujo mėginių, paimtų iš nėščiųjų esant bent 10 savaičių gestaciniam amžiui, viso genomo sekoskaitos duomenys. Galimi du patikros tyrimai: pagrindinės patikros ir viso genomo patikros. Pagrindinės patikros tyrimas pateikia informaciją tik apie 21, 18, 13, X ir Y chromosomų aneuploidiją. Viso genomo patikros tyrimas padeda nustatyti visų autosomų dalines duplikacijas ir iškritas ir visų chromosomų aneuploidiją. Atliekant abu tyrimus galima pasirinkti, ar nustatant lytinių chromosomų aneuploidiją (SCA) pateikti informaciją apie nustatytą vaisiaus lytį, ar ne. SCA nustatymo parinktį galima išjungti. Išjungus SCA nustatymo parinktį, duomenys apie vaisiaus lytį taip pat nepateikiami. Daugiau informacijos apie lyties nustatymo parinktį žr. 2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ programinės įrangos vadove (dokumento Nr. 1000000067940).

Procedūros principai

2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ yra automatizuotas laboratorinio NIPT tyrimo sprendimas, apimantis automatizuotą mėginių paruošimą ir sekoskaitos duomenų analizę. „VeriSeq NIPT“ mėginių paruošimo rinkiniai yra specialūs vienkartiniai reagentai, kurie naudojami kartu su „VeriSeq NIPT Microlab STAR“ siekiant paruošti 24, 48 arba 96 mėginių partijas, kad būtų galima taikyti naujos kartos sekoskaitos metodą. Viso genomo pagal galą suporuotų nuskaitymų sekoskaitos duomenys analizuojami naudojant specialią programinę įrangą – 2 versijos „VeriSeq NIPT“ tyrimo programinę įrangą – ir sugeneruojama ataskaita, kurioje pateikiami kokybiniai rezultatai.

Darbo eigą sudaro šios procedūros: mėginių surinkimas, plazmos atskyrimas, cfDNR išskyrimas, bibliotekos paruošimas, bibliotekos kiekybinis nustatymas, bibliotekos telkimas, sekoskaita ir analizė. Išsamesnis šių procedūrų aprašas pateiktas toliau.

- **Mėginių surinkimas.** 7– 10 ml motinos periferinio visos sudėties kraujo paimama iš „Streck“ ekstraląstelinės DNR kraujo mėginio surinkimo mėgintuvėlio (BCT), kuris užkerta kelią ląstelių lizei ir genomo taršai ir stabilizuoja visos sudėties kraują.

- **Plazmos atskyrimas.** Per 5 dienas nuo surinkimo plazma išskiriama iš motinos visos sudėties kraujo naudojant standartinius centrifugavimo metodus. „VeriSeq NIPT Microlab STAR“ įsiurbia ir paskirsto plazmą 96 gilių šulinėlių plokštelėje, kad juos būtų galima apdoroti toliau. Jei reikia pakartoti tyrimą, mėginius, kurie bus apdorojami paskiau, galima iš naujo uždaryti dangteliais ir laikyti 4 °C temperatūroje dar 5 dienas (iš viso iki 10 dienų po kraujo paėmimo).

**DĖMESIO**

Viršijus pirmiau nurodytą laikymo trukmę gali padidėti atskirų mėginių klaidingų rezultatų rodiklis.

- **cfDNR išskyrimas.** cfDNR išgryninama iš plazmos taip: atliekama adsorbicija surišimo plokštelėje, surišimo plokštelė nuplaunama, siekiant pašalinti teršalus, ir atliekamas eliuavimas.
- **Bibliotekos paruošimas.** Išgrynintiems cfDNR fragmentams taikomas grandinės galų taisymo procesas siekiant paversti 5' ir 3' galo iškyšas bukais galais. Tada deoksiadenozino nukleotidas prijungiamas prie 3' galų siekiant sukurti vienos bazės iškyšą. Paskui indeksavimo adapteriai, kuriuose yra vienos bazės 3' deoksitimidino iškyša, liguojami ant apdorotų cfDNR fragmentų. Liguota DNR išgryninama naudojant kietafazės atvirkštinės imobilizacijos granules. Kiekvienas 24, 48 arba 96 mėginių rinkinio mėginys gauna unikalų indeksavimo adapterį. Adapteriai naudojami dviem toliau nurodytais tikslais.

**DĖMESIO**

Būkite ypač atsargūs, kad išvengtumėte kryžminės indeksų taršos, dėl kurios gauti rezultatai gali būti neteisingi.

- Indeksai leidžia identifikuoti mėginius atliekant tolesnę sekoskaitos procedūrą.
- Indeksavimo adapteriuose yra sekos, kurios leidžia užfiksuoti biblioteką sekoskaitos pratekamosios kiuvetės kietame paviršiuje, kad būtų galima generuoti klasterius ir atlikti tolesnę sekoskaitos procedūrą.
- **Kiekybinis nustatymas.** Kiekybinis bibliotekos produkto nustatymas atliekamas naudojant fluorescencinius dažus, kurių koncentracijos lygis nustatomas lyginant su DNR standarto kreive.
- **Bibliotekų telkimas ir sekoskaita.** Mėginių bibliotekos telkiamos į 24 arba 48 mėginių telkinius taikant pakoreguotą kiekį, siekiant sumažinti padengimo variantiškumą. Tada kiekvienas telkinys sekvenuojamas naudojant naujos kartos sekoskaitos sistemą.
- 2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ pateikiamas be sekoskaitos įrangos ir eksploatacinių medžiagų.
- **Analizė.** Kiekvieno mėginio analizę sudaro toliau nurodyti procesai.
 - Bibliotekos fragmentų identifikavimas pagal indekso seką ir atliekant pagal galų suporuotų nuskaitymų prilygiavimą prie žmogaus referentinio genomo.
 - Bibliotekos vaisiaus frakcijos apskaičiavimas sujungiant bibliotekos fragmentų ilgių ir genomo koordinatų pasiskirstymo informaciją.
 - Įvertinus žinomus tendencingumus, statistinis modelis aptinka genomo sritis, kuriose nustatomas trūkumas arba perteklius bibliotekoje, remiantis anomalija, esančia apskaičiuotu vaisiaus frakcijos lygiu.

- NIPT ataskaita pateikia pasirinkto tyrimo suvestinės rezultatus – pateikiamas mėginių, atitinkančių KK reikalavimus, rezultatas ANOMALY DETECTED (aptikta anomalija) arba NO ANOMALY DETECTED (anomalija neaptikta) kartu su vaisiaus frakcijos verte.
- Papildomoje ataskaitoje pateikiama kiekybinio nustatymo metrika, charakterizuojanti kiekvieną aptiktą anomaliją.

Procedūros apribojimai

Tyrimo apribojimai

- Tyrimo jautrumą ir specifiškumą pagrindžiantys įrodymai taikomi vienvaisiam ir dvivaisiam nėštumui. Šiose naudojimo instrukcijose nepateikiami jautrumo ar specifiškumo duomenys, kai nėštumo metu nustatyti daugiau nei du besivystantys vaisiai.
- 2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ neskirtas poliploidijai, pvz., triploidijai, aptikti.
- 2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ neskirtas subalansuotiems chromosomų persitvarkymams (translokacijoms) aptikti.
- Atliekant tyrimą reikia naudoti motinos periferinio visos sudėties kraujo mėginius, paimtus iš nėščiosios esant ne mažesniai nei 10 savaičių vaisiaus gestaciniam amžiui.
- Atliekant pagrindinės patikros tyrimą, 2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ tyrimas ieško konkrečių chromosomų anomalijų. Gautas rezultatas NO ANOMALY DETECTED (anomalija neaptikta) neatmeta tirtų chromosomų anomalijų tikimybės. Neigiamas rezultatas neatmeta kitų vaisiaus chromosomų anomalijų, genetinių ligų ar apsigimimų (pvz., atviro nervinio vamzdelio defekto) tikimybės.
- Atliekant viso genomo patikros tyrimus, didelės iškritos ir duplikacijos, nesiekiančios 75 % chromosomos dydžio, gali reikšti visos chromosomos aneuploidiją.
- Atliekant viso genomo patikros tyrimus, tam tikros sritys neįtraukiamos į analizę. Tokių neįtraukiamų sričių sąrašas pateiktas „Illumina“ pagalbos svetainėje. Genomo anomalijų ieškoma tik įtrauktose srityse.
- Vaisiaus lyties nustatymo funkcija pasiekama ne visuose regionuose dėl vietos valdžios taisyklių, reglamentuojančių vaisiaus lyties nustatymą.
- Remiantis literatūros duomenimis, ekstraląstelinės vaisiaus DNR atrankos rezultatus gali supainioti tam tikri motinos ir vaisiaus veiksniai. Kai kurie iš jų yra išvardyti toliau (bet neapsiribojant):
 - neseniai motinai atliktas kraujo perpylimas;
 - anksčiau atliktas organų persodinimas motinai / kamieninių ląstelių transplantavimas;
 - autoimunine liga serganti motina;
 - motinos navikai (gerybiniai ir piktybiniai);
 - motinos mozaikiškumas;
 - motinos kopijų skaičiaus variantai;
 - vaisiaus placentos mozaikiškumas / ribotas placentos mozaikiškumas

- vaisiaus nykimas / nykstantys dvyniai

2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ nustatymas

- 2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ yra patikros tyrimas ir jo rezultatų negalima vertinti atskirai nuo kitų klinikinių išvadų ir tyrimų rezultatų. Išvados apie vaisiaus būklę ir sprendimai dėl nėštumo eigos negali būti priimti remiantis vien tik NIPT patikros tyrimo rezultatais.⁷
- Naudojant 2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ pateikiama toliau nurodyta informacija:
 - pagrindinės patikros tyrimas tiria 13, 18 ir 21 chromosomų perteklių;
 - viso genomo patikros tyrimas tiria visų autosomų perteklių ir trūkumą, įskaitant ne mažesnes nei 7 Mb dalines iškritas ir duplikacijas;
 - tiriant vienvaisio nėštumo mėginius ir pasirinkus lyties nustatymo parinktį „Yes“ (taip) arba SCA, pateikiama informacija apie šias lytinių chromosomų anomalijas: XO, XXX, XXY ir XYY.
 - tiriant vienvaisio nėštumo mėginius ir pasirinkus lyties nustatymo parinktį „Yes“ (taip), pateikiama informacija apie vaisiaus lytį;
 - Informacija apie Y chromosomos buvimą dvivaisio nėštumo atveju.

Gaminio komponentai

2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ (dalies Nr. 20030577) sudaro toliau nurodyti komponentai.

- „VeriSeq NIPT“ mėginių paruošimo rinkinys (24 mėginiai) (dalies Nr. 20025895)
- „VeriSeq NIPT“ mėginių paruošimo rinkinys (48 mėginiai) (dalies Nr. 15066801)
- „VeriSeq NIPT“ mėginių paruošimo rinkinys (96 mėginiai) (dalies Nr. 15066802)

2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ (dalies Nr. 20030577) sudaro toliau nurodyti komponentai.

- 2 versijos „VeriSeq NIPT“ tyrimo programinė įranga (dalies Nr. 20047024), iš anksto įdiegta 2 versijos „VeriSeq“ vietiniame serveryje.
 - 2 versijos „VeriSeq“ vietinis serveris (dalies Nr. 20028403, 20047000, 20101927) arba esamas „VeriSeq“ vietinis serveris (dalies Nr. 15076164 arba 20016240), kuris atnaujintas į 2 versiją.
- „VeriSeq NIPT Workflow Manager“ (darbo eigos tvarkyklė) (dalies Nr. 20044988), iš anksto įdiegta „VeriSeq NIPT Microlab STAR“.
 - „VeriSeq NIPT Microlab STAR“ (dalies Nr. „Hamilton Company Reno“: 95475-01 (115 V) ir 95475-02 (230 V), „Hamilton Company Bonaduz“: 806288)
- „Local Run Manager“ „VeriSeq NIPT“ modulis (dalies Nr. 20044989)

Reagentai

Pateikti reagentai

„Illumina“ pateikia šiuos reagentus: „VeriSeq NIPT“ mėginių paruošimo rinkinys (24 mėginiai) (dalis Nr. 20025895), „VeriSeq NIPT“ mėginių paruošimo rinkinys (48 mėginiai) (dalis Nr. 15066801) ir „VeriSeq NIPT“ mėginių paruošimo rinkinys (96 mėginiai) (dalis Nr. 15066802). „VeriSeq NIPT“ mėginių paruošimo rinkiniai yra sukonfigūruoti naudoti sistemoje „VeriSeq NIPT Microlab STAR“(dalis Nr. 95475-01, 95475-02 arba 806288), kurią pateikia „Hamilton Company“.

„VeriSeq NIPT“ mėginių paruošimo rinkinys, išskyrimo dėžutė

1 lentelė „VeriSeq NIPT“ išskyrimo dėžutė (24) ir (48), dalies Nr. 20025869 ir 15066803

Reagento pavadinimas etiketėje	Talpyklų skaičius rinkinyje	Veikliosios medžiagos	Laikymas
Lizės buferinis tirpalas	1	Guanidino hidrochloridas buferiniame vandeniniame tirpale	Nuo 15 iki 30 °C
I plovimo buferinis tirpalas	1	Guanidino hidrochloridas ir 2-propanolis buferiniame vandeniniame tirpale	Nuo 15 iki 30 °C
II plovimo buferinis tirpalas	1	Buferinis vandeninis tirpalas, kuriame yra druskų	Nuo 15 iki 30 °C
Eliuavimo buferinis tirpalas	1	Buferinis vandeninis tirpalas	Nuo 15 iki 30 °C
Proteinazės buferinis tirpalas	1	Glicerolis buferiniame vandeniniame tirpale	Nuo 15 iki 30 °C
Proteinazė K	3	Liofilizuota proteinazė K	Nuo 15 iki 30 °C

2 lentelė „VeriSeq NIPT“ išskyrimo dėžutė (96), dalies Nr. 15066807

Reagento pavadinimas etiketėje	Talpyklų skaičius rinkinyje	Veikliosios medžiagos	Laikymas
Lizės buferinis tirpalas	1	Guanidino hidrochloridas buferiniame vandeniniame tirpale	Nuo 15 iki 30 °C
I plovimo buferinis tirpalas	1	Guanidino hidrochloridas ir 2-propanolis buferiniame vandeniniame tirpale	Nuo 15 iki 30 °C
II plovimo buferinis tirpalas	2	Buferinis vandeninis tirpalas, kuriame yra druskų	Nuo 15 iki 30 °C
Eliuavimo buferinis tirpalas	1	Buferinis vandeninis tirpalas	Nuo 15 iki 30 °C
Proteinazės buferinis tirpalas	1	Glicerolis buferiniame vandeniniame tirpale	Nuo 15 iki 30 °C
Proteinazė K	4	Liofilizuota proteinazė K	Nuo 15 iki 30 °C

„VeriSeq NIPT“ mėginių paruošimo rinkinys, bibliotekos paruošimo dėžutė

3 lentelė „VeriSeq NIPT“ bibliotekos paruošimo dėžutė (24) ir (48), dalies Nr. 20026030 ir 15066809

Reagento pavadinimas etiketėje	Talpyklų skaičius rinkinyje	Veikliosios medžiagos	Laikymas
Grandinės galų taisymo mišinys	1	DNR polimerazė ir dNTP buferiniame vandeniniame tirpale	Nuo -25 °C iki -15 °C
Poliadenilavimo mišinys	1	DNR polimerazė ir dATP buferiniame vandeniniame tirpale	Nuo -25 °C iki -15 °C
Ligavimo mišinys	1	DNR ligazė buferiniame vandeniniame tirpale	Nuo -25 °C iki -15 °C
Hibridizacijos buferinis tirpalas	1	Buferinis vandeninis tirpalas	Nuo -25 °C iki -15 °C
NIPT DNR adapterio plokštelė	1	Oligonukleotidai buferiniame vandeniniame tirpale	Nuo -25 °C iki -15 °C

4 lentelė „VeriSeq NIPT“ bibliotekos paruošimo dėžutė (96), dalies Nr. 15066810

Reagento pavadinimas etiketėje	Talpyklų skaičius rinkinyje	Veikliosios medžiagos	Laikymas
Grandinės galų taisymo mišinys	1	DNR polimerazė ir dNTP buferiniame vandeniniame tirpale	Nuo -25 °C iki -15 °C
Poliadenilavimo mišinys	2	DNR polimerazė ir dATP buferiniame vandeniniame tirpale	Nuo -25 °C iki -15 °C
Ligavimo mišinys	2	DNR ligazė buferiniame vandeniniame tirpale	Nuo -25 °C iki -15 °C
Hibridizacijos buferinis tirpalas	1	Buferinis vandeninis tirpalas	Nuo -25 °C iki -15 °C
NIPT DNR adapterio plokštelė	1	Oligonukleotidai buferiniame vandeniniame tirpale	Nuo -25 °C iki -15 °C

„VeriSeq NIPT“ mėginių paruošimo rinkinys, priedų dėžutė

5 lentelė „VeriSeq NIPT“ priedų dėžutė, dalies Nr. 15066811

Reagento pavadinimas etiketėje	Talpyklų skaičius rinkinyje	Veikliosios medžiagos	Laikymas
DNR surišimo plokštelė	1	Propileno mikroplokštelė su modifikuoto silikono membrana	Nuo 2 °C iki 8 °C
Resuspensijos buferinis tirpalas	1	Buferinis vandeninis tirpalas	Nuo 2 °C iki 8 °C
Mėginio gryninimo granulės	1	Kietafazės paramagnetinės granulės buferiniame vandeniniame tirpale	Nuo 2 °C iki 8 °C
DNR kiekybinio nustatymo reagentas	1	Į DNR interkaluojami dažai dimetilsulfoksido (DMSO)	Nuo 2 °C iki 8 °C
DNR kiekybinio nustatymo standartas	1	dsDNR standartas, nespecifinis DNR ir natrio azidas buferiniame vandeniniame tirpale	Nuo 2 °C iki 8 °C

„VeriSeq NIPT“ mėginių paruošimo rinkinys, darbo eigos mėgintuvėliai ir etiketės

6 lentelė Darbo eigos mėgintuvėliai ir etiketės, dalies Nr. 15071543

Elemento pavadinimas etiketėje	Elementų kiekis rinkinyje	Laikymas
„Label (LBL)–Plate Barcode“ (etiketė (LBL) – plokštelės brūkšninis kodas)	9	Nuo 15 iki 30 °C
„Label (LBL)–Deep-well Plate Barcode“ (etiketė (LBL) – gilių šulinėlių plokštelės brūkšninis kodas)	12	Nuo 15 iki 30 °C
„Tube (TB)–Empty Pooling Tube“ (mėgintuvėlis (TB) – tuščias telkimo mėgintuvėlis)	5	Nuo 15 iki 30 °C

Reagentai (nepateikti)**Reikalingi reagentai (nepateikti)**

- Sekoskaitos reagentai ir eksploatacinės medžiagos, reikalingi naujos kartos sekoskaitos (NGS) sistemai
- Sertifikuotas vanduo be ribonukleazių ir deoksiribonukleazių – molekulinės biologijos reikmėms
- Etanolis, 100 % (200 stiprumo), molekulinės biologijos

PASTABA Naudojant molekulinės biologijos reikmėms nepritaikytą etanolį gali būti neigiamai paveiktas tyrimo veiksmingumas.

Pasirinktiniai reagentai (nepateikti)

- Dulbecco fiziologinis tirpalas fosfatiniame buferiniame tirpale (DPBS) neigiamam kontroliniam mėginiui (NTC)

Laikymas ir naudojimas

1. Kambario temperatūra apibrėžiama kaip 15–30 °C temperatūra.
2. Visus reagentus galima naudoti tik vieną kartą. Paruoštus naudoti reagentus reikia naudoti iš karto.
3. Jei kokios nors „VeriSeq NIPT Solution“ pakuotės ar komponentai yra pažeisti ar sugadinti, kreipkitės į „Illumina“ klientų aptarnavimo skyrių.
4. Reagentai išlieka stabilūs, jei jie laikomi nurodytomis sąlygomis, iki nurodytos galiojimo pabaigos datos, nurodytos ant rinkinių etikečių. Apie laikymo sąlygas žr. stulpelį „Laikymas“ lentelėse skyriuje [Reagentai](#). Nenaudokite reagentų, jei jų galiojimo laikas pasibaigęs.

5. Reagentų išoriniai pokyčiai gali reikšti, kad medžiagos yra sugadintos. Jei atsiranda išorinių pokyčių (pvz., atsiranda akivaizdžių reagentų spalvos pokyčių arba drumzlių dėl mikrobinės taršos), reagentų nenaudokite.
6. Kai tvarkote mėginio gryninimo granules, laikykitės toliau nurodytų geriausios praktikos taisyklių.
 - Niekada neužšaldykite granulių.
 - Prieš naudodami palaukite, kol granulės pasieks kambario temperatūrą.
 - Prieš naudodami išmaišykite granules, kol gausite tinkamą suspensiją ir vienalytę spalvą.
7. Lizės buferiniame tirpale, I plovimo buferiniame tirpale, II plovimo buferiniame tirpale, eliuavimo buferiniame tirpale ir proteinazės buferiniame tirpale gali susidaryti matomų nuosėdų ar kristalų. Prieš naudodami gerai išmaišykite, tada apžiūrėkite ir įsitikinkite, kad nėra nuosėdų.
8. Niekada neužšaldykite surinkto visos sudėties kraujo.
9. Baigę telkimo procedūrą, kiek įmanoma greičiau sekvenuokite bibliotekas. Sutelktos bibliotekos išlieka stabilios iki septynių dienų laikant nuo 25°C iki 15°C. Papildomas denatūravimas nereikalingas, jei nurodytu laikotarpiu laikomasi nurodytų sąlygų.

Įranga ir medžiagos

Reikalinga įranga ir medžiagos – nepridėta

Reikalinga, bet nepateikta įranga

Įranga	Tiekėjas
Naujos kartos sekoskaitos (NKS) sistema, turinti toliau nurodytas charakteristikas: <ul style="list-style-type: none"> • 2 x 36 bp suporuotų-pagal galą nuskaitymų sekoskaita; • suderinamumas su „VeriSeq NIPT“ mėginių paruošimo rinkinio dvigubo indeksavimo adapteriais; • automatinis BCL failų kūrimas; • du cheminių medžiagų kanalai; • 400 mln. suporuotų-pagal galą nuskaitymų per seriją; • suderinama su „VeriSeq NIPT“ tyrimo 2 versijos programinė įranga arba „NextSeq 550Dx“ sekvenavimo sistema. 	Prietaiso tiekėjas arba „illumina“, dalies Nr. 20005715
Šaldiklis, nuo -25 °C iki -15 °C	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
Mikrocentrifuga	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
Automatinė pipetė	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
Šaldytuvas, nuo 2 iki 8 °C	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas

Įranga	Tiekėjas
20 µl vieno-kanalo pipetės	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
200 µl vieno-kanalo pipetės	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
1000 µl vieno-kanalo pipetės	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
Sūkurinis maišytuvas	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
Centrifugos ir rotorijų įrenginys kraujo surinkimo mėgintuvėliams	
Atitikmenys.	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
<ul style="list-style-type: none"> Šaldoma centrifuga, 1600 × g, su parinktimi be stabdymo Sukamasis krepšelių rotorius su krepšeliais Krepšelių įdėklai, mažiausiai 76 mm gylio Įdėklai adapteriai, palaikantys 16 mm x 100 mm kraujo surinkimo mėgintuvėlių 	
Rekomenduojama:	
<ul style="list-style-type: none"> „Allegra X12R“ serijos centrifuga, 1600 g „Allegra“ centrifugos GH-3.8 rotorius su krepšeliais „Allegra“ centrifugos krepšelių dangteliai, dviejų dangtelių rinkinys „Allegra“ centrifugos adapterio prietaisas, 16 mm, keturių prietaisų rinkinys 	<p>„Beckman Coulter“, prekės Nr. 392304 (120 V arba 230 V)</p> <p>„Beckman Coulter“, prekės Nr. 369704</p> <p>„Beckman Coulter“, prekės Nr. 392805</p> <p>„Beckman Coulter“, prekės Nr. 359150</p>
Centrifugos ir rotoriaus prietaisas mikroplokštelėms	
Atitikmenys.	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
<ul style="list-style-type: none"> Centrifuga, 5600 × g Sukamasis plokštelių rotorius su 96 šulinėlių plokštelių laikikliais, mažiausiai 76,5 mm gylio. „Multifuge X4 Pro-MD 120V TX-1000BT“ „Sorvall Legend XTR“ centrifuga 	<p>„Thermo Fisher Scientific“, katalogo Nr. 75016034</p> <p>„Thermo Fisher Scientific“, katalogo Nr. 75004521 (120 V) arba katalogo Nr. 75004520 (230 V)</p>

Įranga	Tiekėjas
<ul style="list-style-type: none"> • „HIGHPlate 6000“ mikroplokštelių rotorius • Sukamasis plokštelių rotorius 6000 <p>Mikroplokštelių atraminis pagrindas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Rekomenduojama: <ul style="list-style-type: none"> • „MicroAmp“ 96-šulinėlių atraminis pagrindas • 96-šulinėlių PGR plokštelių laikiklis 	<p>„Thermo Fisher Scientific“, katalogo Nr. 75003606</p> <p>„Thermo Scientific VWR“, katalogo Nr. 97040-244</p> <p>„Thermo Fisher Scientific“, katalogo Nr. 4379590</p> <p>„Thermo Fisher Scientific“, katalogo Nr. AB-0563/1000</p>
<p>Vienas iš šių mikroplokštelių skaitytuvų ar jų atitikmenų, (fluorimetras) su „SoftMax Pro“ 6.2.2–7.1.2 arba naujesne versija:</p> <ul style="list-style-type: none"> • „Gemini XPS“ • „SpectraMax“ M2, M3, M4, ir M5. <ul style="list-style-type: none"> • Violetinis įdėklas reikalingas su mikroplokštelių skaitytuvu, kad būtų naudojamas darbo eigoje. 	<p>„Molecular Devices“, dalies Nr. XPS</p> <p>„Molecular Devices“, dalies Nr. M2, M3, M4 ir M5</p>
<p>„SpectraMax“ spartusis USB, serijos adapteris</p>	<p>„Molecular Devices“, dalies Nr. 9000-0938</p>
<p>Toliau nurodytų specifikacijų termocikleris.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Šildomas dangtis • Temperatūros intervalas – 4–98 °C • ±2 °C temperatūros tikslumas • Kitimo greitis mažiausiai 2 °C per sekundę • Suderinamas su „Twin.tec“ 96-šulinėlių viso pločio PGR padėklų 	<p>Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas</p>
<p>„VeriSeq NIPT Microlab STAR“</p>	<p>„Hamilton“, dalies Nr. 95475-01 (115 V), dalies Nr. 95475-02 (230 V) arba dalies Nr. 806288 („Hamilton Company Bonaduz“)</p>
<p>2 versijos „VeriSeq“ vietinis serveris arba atnaujintos versijos „VeriSeq“ vietinis serveris</p>	<p>„Illumina“, dalies Nr. 20028403 arba 20047000 (2 v.) arba 20101927 arba Nr. 15076164 arba Nr. 20016240 (atnaujinta versija)</p>
<p>Jei naudojama „NextSeq 550Dx“ sekoskaitos sistema:</p> <ul style="list-style-type: none"> • „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkinys, 2.5 versija, 75 ciklų 	<p>„Illumina“, dalies Nr. 20028870</p>

Neprivaloma įranga (nepateikta)

Įranga	Tiekėjas
„Pluggo“ dangtelių nuėmimo sistema	„LGP Consulting“, dalies Nr. 4600 4450
„SpectraMax SpectraTest FL1“ fluorescencijos tikrinimo plokštelė	„Molecular Devices“, dalies Nr. 0200-5060
Mėgintuvėlių būgnas / suktuvas, 15 ml mėgintuvėliai, 40 suk./min., 100–240 V	„Thermo Scientific“, katalogo Nr. 88881001 (JAV) arba katalogo Nr. 88881002 (ES)

Reikalingos medžiagos (nepateiktos)

Eksploatacinė medžiaga	Tiekėjas
1000 µl laidūs nesterilūs filtrų antgaliai	„Hamilton“, dalies Nr. 235905
300 µl laidūs nesterilūs filtrų antgaliai	„Hamilton“, dalies Nr. 235903
50 µl laidūs nesterilūs filtrų antgaliai	„Hamilton“, dalies Nr. 235948
Gilių šulinėlių rezervuaras, atitinkantis toliau nurodytas specifikacijas: <ul style="list-style-type: none"> • SLAS 1–2004 mikroplokštelė su 96 piramidiniais arba kūginiais šulinėliais, ne mažesnės nei 240 talpos; • polipropileninis, užtikrinantis žemo lygio DNR surišimą su visais mėginio sąlyčio paviršiais; • vidiniai matmenys (skysčio lygis) suderinami su automatizuotomis „VeriSeq NIPT Microlab STAR“ įsiurbimo ir paskirstymo operacijomis; • aukščio matmenys suderinami su automatizuotais „VeriSeq NIPT Microlab STAR“ judesiais. 	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas Suderinami rezervuarai: <ul style="list-style-type: none"> • „Corning Axygen“, gaminio Nr. RES-SW96-HP-SI • „Agilent“, gaminio Nr. 201246-100
Reagentų vonelė, atitinkanti toliau nurodytas specifikacijas: <ul style="list-style-type: none"> • vonelė, kurią galima tinkamai įstatyti į „VeriSeq NIPT Microlab STAR“ laikiklį, su kūginiu dugnu, ne mažesnės nei 20 ml talpos; • polipropileninė, be ribonukleazų / deoksiribonukleazų; • vidiniai rezervuaro matmenys (skysčio lygis) generuoja skysčio lygį naudojant tyrimo reagentus, kurie suderinami su automatizuotomis „VeriSeq NIPT Microlab STAR“ įsiurbimo ir paskirstymo operacijomis; • aukščio matmenys suderinami su automatizuotais „VeriSeq NIPT Microlab STAR“ judesiais. 	Suderinamos vonelės: <ul style="list-style-type: none"> • „Illumina“ reagentų vonelė, dalies Nr. 20095418

Eksploatacinė medžiaga	Tiekėjas
<p>Gilių šulinėlių plokštelės, atitinkančios toliau nurodytas specifikacijas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • SLAS 1–2004, 3–2004 ir 4–2004 mikroplokštelė su 96 piramidiniais arba kūginiais šulinėliais, ne mažesnės nei 2 ml talpos; • skaidrus, polipropileninis, užtikrinantis žemo lygio DNR surišimo medžiagą su visais mėginio sąlyčio paviršiais; • šulinėlio matmenys generuoja skysčio lygį, kuris suderinamas su automatizuotomis „VeriSeq NIPT Microlab STAR“ įsiurbimo ir paskirstymo operacijomis; • plokštelių padėklas sudaro galimybę išdėstyti plokštelių brūkšninius kodus, kuriems reikalinga vieta su saugiu, lygaus paviršiaus sukibimu; • sukimo momentui atsparus rėmas gali išlaikyti mažiausiai 5600 x g; • plokštelės aukščio matmenys suderinami su automatizuotais „VeriSeq NIPT Microlab STAR“. 	<p>Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas</p> <p>Suderinamos plokštelės:</p> <ul style="list-style-type: none"> • „Eppendorf“, dalies Nr. 0030505301 • „Eppendorf“, dalies Nr. 30502302 • „USA Scientific“, dalies Nr. 1896-2000
<p>384 šulinėlių plokštelė, atitinkanti toliau nurodytas specifikacijas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • mikroplokštelė su 384 šulinėliais, optimizuota mažiems tūriams, ne mažesnės nei 50 µl šulinėlio talpos; • juodas, matinis, polistireninis, nepraleidžiantis šviesos ir užtikrinantis žemo lygio DNR surišimą su visais mėginio sąlyčio paviršiais; • šulinėlio matmenys generuoja skysčio lygius, kurie suderinami su automatizuotomis „VeriSeq NIPT Microlab STAR“ įsiurbimo ir paskirstymo operacijomis; • plokštelės aukščio matmenys suderinami su automatizuotais „VeriSeq NIPT Microlab STAR“ judesiais. • plokštelių padėklas sudaro galimybę išdėstyti plokštelių brūkšninius kodus, kuriems reikalinga vieta su saugiu, lygaus paviršiaus sukibimu. 	<p>Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas</p> <p>Suderinamos plokštelės:</p> <ul style="list-style-type: none"> • „Corning“, gaminio Nr. 3820

Eksploatacinė medžiaga	Tiekėjas
<p>96 šulinėlių plokštelė, atitinkanti toliau nurodytas specifikacijas:</p> <ul style="list-style-type: none"> sukimo momentui atsparios konstrukcijos mikroplokštelė gali išlaikyti mažiausiai 5600 x g ir 96 skaidrius kūginius šulinėlius, pakeltais kraštais, ne mažesnės nei 150 µl šulinėlio talpos; polipropilėninė, be ribonukleazijų / deoksiribonukleazijų ir užtikrinanti žemo lygio DNR surišimą su visais mėginio sąlyčio paviršiais; šulinėlio matmenys (skysčio lygis) suderinami su automatizuotomis „VeriSeq NIPT Microlab STAR“ įsiurbimo ir paskirstymo operacijomis; plokštelės aukščio matmenys suderinami su automatizuotais „VeriSeq NIPT Microlab STAR“ judesiais. <p>PASTABA. Suderinami plastikiniai gaminiai su skirtingais dalių numeriais, pavyzdžiui, suderinamos skirtingų gamintojų 96 šulinėlių plokštelės, gali būti tiesiogiai nekeičiami, jei „VeriSeq NIPT Microlab STAR“ sistemos dalių konkrečiai nesukalibravo „Illumina“ techninės priežiūros ir pagalbiniai darbuotojai. Norėdami pakeisti plastikinius gaminius, kreipkitės į „Illumina“ palaikymo komandą.</p> <ul style="list-style-type: none"> Plokštelių padėklas sudaro galimybę išdėstyti plokštelių brūkšninius kodus, kuriems reikalinga vieta su saugiu, lygaus paviršiaus sukibimu. Suderinami su termocikleriais, skirtais denatūracijai. 	<p>Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas</p> <p>Suderinamos plokštelės:</p> <ul style="list-style-type: none"> „Eppendorf“, dalies Nr. 0030129512 „Eppendorf“, dalies Nr. 30129580 „Eppendorf“, dalies Nr. 30129598 „Eppendorf“, dalies Nr. 30129660 „Eppendorf“, dalies Nr. 30129679 „Bio-Rad“, dalies Nr. HSP9601
<p>Vienas iš toliau nurodytų sandariklių.</p> <ul style="list-style-type: none"> „Microseal“ F folija Folijos sandarikliai 	<p>„Bio-Rad“, katalogo Nr. MSF1001 „Beckman Coulter“, prekės Nr. 538619</p>
<p>Neląstelinio DNR BCT CE</p>	<p>„Streck“, katalogo Nr. 218997</p>
<p>Užspaudžiamieji dangteliai</p>	<p>„Sarstedt“, užsakymo Nr. 65.802</p>
<p>2 ml mėgintuvėliai užsukamaisiais dangteliais</p>	<p>Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas</p>
<p>20 µl filtro galiukai 20 µl pipetei</p>	<p>Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas</p>
<p>200 µl filtro galiukai 200 µl pipetei</p>	<p>Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas</p>
<p>1000 µl filtro galiukai 1000 µl pipetei</p>	<p>Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas</p>

Eksploatacinė medžiaga	Tiekėjas
Atitikmenys. <ul style="list-style-type: none"> Greito dezinfekavimo purškiklis alkoholio pagrindu Dezinfekuojamojo ploviklio tirpalas Rekomenduojama: <ul style="list-style-type: none"> Dejonizuotas vanduo ir 70 % etanolis 	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas

Papildomos medžiagos (nepateiktos)

Eksploatacinė medžiaga	Tiekėjas
Dulbecco fiziologinis tirpalas fosfatiniame buferiniame tirpale (DPBS) neigiamam kontroliniam mėginiui (NTC)	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
Mėgintuvėlis, užsukamas dangtelis, 10 ml (tik kontroliniams mėginiams)	„Sarstedt“, užsakymo Nr. 60.551
Mėgintuvėlis, užsukamas dangtelis, 50 ml	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
25 ml serologinės pipetės	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
10 ml serologinės pipetės	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas

Mėginių surinkimas, transportavimas ir laikymas



DĖMESIO

Su visais mėginiais elkitės taip, tarsi jie būtų potencialios infekcinės medžiagos.

- 7–10 ml visos sudėties kraujo mėginius reikia surinkti į „Streck“ ekstraląstelinės DNR BCT kraujo surinkimo mėgintuvėlius. Neužšaldyti.
- Visos sudėties kraujo transportavimo procedūra turi atitikti visus taikomus valdžios institucijų reikalavimus, reglamentuojančius etiologinių medžiagų transportavimą. Rekomenduojama rinktis greito pristatymo / transportavimo būdus.
- Gabendami laikykite temperatūroje nuo 4°C iki 30°C. Gavę mėginius laikykite temperatūroje nuo 2°C iki 8°C, kol būsite pasiruošę tęsti. Laikas nuo kraujo surinkimo iki pradinės plazmos atskyrimo neturi viršyti 5 dienų.
- Jei reikia pakartoti tyrimą, mėginius, kurie bus apdorojami paskiau, galima iš naujo uždaryti dangteliais ir laikyti 4 °C temperatūroje dar 5 dienas (iš viso iki 10 dienų po kraujo paėmimo).



DĖMESIO

Padidėjusi temperatūra, viršijanti pirmiau minėtus diapazonus, gali neigiamai paveikti atskirų mėginių gedimų dažnį ir (arba) mėginio veikimą.

Įspėjimai ir atsargumo priemonės

- Šiame tyrime yra proteinazės K. Įkvėpus, nurijus, patekus ant odos ir į akis kyla asmens sužalojimo rizika. Naudokite gerai vėdinamoje vietoje, dėvėkite apsauginius drabužius ir stenkitės neįkvėpti dulkių. Bet kokias nepanaudotas talpyklas ir nepanaudotą turinį išmeskite / išpilkite vadovaudamiesi taikomais valdžios institucijų pateiktais saugos standartais.
- Šiame tyrime yra guanidino chlorido. Pavojus žmogui kyla įkvėpus, nurijus, patekus ant odos ir į akis. Naudokite gerai vėdinamoje vietoje ir dėvėkite apsauginius drabužius. Bet kokias nepanaudotas talpyklas ir nepanaudotą turinį išmeskite / išpilkite vadovaudamiesi taikomais vietos valdžios institucijų pateiktais saugos standartais.
- Šiame tyrime yra degiosios cheminės medžiagos 2-propanolio. Laikykite atokiau nuo šilumos šaltinių ir atviros liepsnos. Pavojus žmogui kyla įkvėpus, nurijus, patekus ant odos ir į akis. Naudokite gerai vėdinamoje vietoje ir dėvėkite apsauginius drabužius. Bet kokias nepanaudotas talpyklas ir nepanaudotą turinį išmeskite / išpilkite vadovaudamiesi taikomais vietos valdžios institucijų pateiktais saugos standartais.
- Šiame tyrime yra dimetilsulfoksido – korozinio ir degiojo skysčio. Pavojus žmogui kyla įkvėpus, nurijus, patekus ant odos ir į akis. Naudokite gerai vėdinamoje vietoje ir dėvėkite apsauginius drabužius. Bet kokias nepanaudotas talpyklas ir nepanaudotą turinį išmeskite / išpilkite vadovaudamiesi taikomais vietos valdžios institucijų pateiktais saugos standartais.
- Siekiant išvengti kenksmingų dujų susidarymo, neišmeskite cfDNR išskyrimo proceso atliekų (kuriose yra guanidino hidroklorido) su atliekomis, kuriose yra baliklio (natrio hipochlorito).
- Su visais mėginiais elkitės taip, tarsi juose būtų galimai infekcinių medžiagų.
- Laikykitės įprastų laboratorinių atsargumo priemonių. Nesiurbkite pipetės burna. Darbo vietoje nevalgykite, negerkite ir nerūkykite. Dirbdami su mėginiais ir tyrimo reagentais, mūvėkite vienkartinės pirštines ir dėvėkite laboratorinius chalatus. Baigę dirbti su mėginiais ir tyrimo reagentais kruopščiai nusiplaukite rankas.
- Nenaudokite jokių tyrimo komponentų, jei jų galiojimo laikas, nurodytas tyrimo dėžutės etiketėje, pasibaigęs. Nenaudokite tyrimo komponentų iš kitų tyrimo partijų. Tyrimo partijos nurodytos tyrimo dėžutės etiketėje. Tyrimo komponentus laikykite nurodytoje temperatūroje.
- Kad nepakenktumėte mėginių ar reagentų kokybei, prieš pradėdami vykdyti protokolą įsitikinkite, kad visi natrio hipochlorito garai, susidarę valant, visiškai išsiskleidė.
- Nesilaikant nurodytų procedūrų gali būti gauti klaidingi rezultatai arba smarkiai suprastėti mėginio kokybė.
- Apie rimtus nelaimingus atsitikimus, susijusius su šia medžiaga, nedelsdami praneškite įmonei „Illumina“ bei šalių narių, kuriose gyvena naudotojas ir pacientas, kompetentingoms institucijoms.
- Su aplinkosauga, sveikatos apsauga ir saugumu susijusios informacijos ieškokite saugos duomenų lapuose (SDL) adresu support.illumina.com/sds.html.

Procedūros pastabos

Stenkitės išvengti taršos

- Naudokite švarius antgalius ir švarias eksploatacines laboratorines medžiagas.
- Naudokite aerozolio poveikiui atsparius antgalius, kad sumažintumėte pernašos ir mėginių kryžminės taršos riziką.
- Siekiant išvengti taršos, itin svarbu pasirūpinti, kad visas šulinėlio turinys būtų šulinėlyje. Būkite atsargūs, kad turinys neišsilietų. Centrifuguokite atlikę bet kokį išmaišymo sukuriniu maišytuvu veiksmą.
- Tvarkydami kraują ir kraujo produktus laikykitės taikomų tinkamos laboratorinės praktikos ir higienos taisyklių.
- Ruošdami biblioteką nenaudokite aerozolinių purškiamų baliklių. Dėl baliklio pėdsakų sukeltos taršos gali būti gautas netinkamas tyrimo rezultatas.
- Atidarydami plokšteles, plokštelę padėkite ant tvirto, lygaus paviršiaus ir tvirtai ją suimkite. Lėtai nuimkite sandariklį taip, kad jis nesiliestų su atvirais šulinėliais. Stenkitės neliesti atvirų šulinėlių ir netrikdyti jų turinio. Dėl kryžminės šulinėlių taršos rezultatai gali būti neteisingi.

„VeriSeq NIPT Microlab STAR“ platformos valymas

- Prieš naudodami apžiūrėkite, ar platforma švari. Bent kartą per savaitę atlikite kas savaitinius priežiūros darbus ir laikykitės toliau nurodytų valymo instrukcijų.
- Nuimkite visus išimamus laikiklius ir nuvalykite naudodami greito dezinfekavimo purškiklį alkoholio pagrindu, dejonizuotu vandeniu ir 70 % etanoliumi ir palikite išdžiūti. Jei yra daug nešvarumų, paskui pamirkykite dezinfekuojančio ploviklio tirpale, praskalaukite alkoholiniu-dezinfekantu ir palikite išdžiūti.
- Atidarykite priekinį dangtį ir nuvalykite denį dejonizuoto vandens ir 70 % etanolio prisotintu audiniu. Itin svarbu patikrinti, ar švarūs stumdomi blokai.
- Išimkite bazinės vakuuminės sistemos (BVS) kolektorių ir šluoste nuvalykite kolektorių, tarpiklį ir vidines BVS ertmes. Nevalykite tarpiklio etanoliumi, kad medžiaga neįtrūktų.
- Ištuštinkite CORE 96 zondų galvutės ir nepriklausomo kanalo antgalių atliekų dėžę.
- Išimkite antgalių atliekų stoties nepriklausomo kanalo antgalių išstūmimo plokštelę ir nuvalykite ją: užpurškite dejonizuoto vandens ir 70 % etanolio tiesiai ant paviršiaus ir nuvalykite. Uždėkite ant korpuso naują plastikinį maišelį ir pritvirtinkite jį. Įdėkite švarią antgalių išstūmimo plokštelę atgal į vietą.
- Užpurškite -dejonizuoto vandens ir 70 % etanolio tiesiai ant CORE 96-galvutės atliekų dėžutės paviršiaus bei latako ir nuvalykite.

- Jei sunku pašalinti susikaupusius nešvarumus nuo antgalių atliekų dėžės ir latako, valykite juos šluoste, sudrėkinta vandeniu be ribonukleazijų ir deoksiribonukleazijų, kol pašalinsite susikaupusius nešvarumus. Šluostę išmeskite laikydamiesi atitinkamų reikalavimų. Toliau atlikite sterilizavimą alkoholiniu dezinfekantu.
- Sudrėkinkite nesipūkuojančią šluostę ar medvilninį tamponą 70 % etanoliu. Nuvalykite brūkšninių kodų skaitytuvo lazerinio skaitytuvo langelį. Ta pačia šluoste ar tamponu išvalykite kiekvieną CPAC plokštelės adapterio šulinėlį. Jei valote šluoste, įkiškite šluostę į kiekvieną adapterio šulinėlį rašiklio galu, kad tinkamai išvalytumėte šulinėlio vidų.
- Išvalykite nepriklausomus kanalus, kaip nurodyta toliau.
 - Nepriklausomuose kanaluose nuvalykite antgalių išstūmimo vamzdelį (išorinę pipetavimo kanalų dalį) nesipūkuojančia šluoste, sudrėkinta dejonizuoto vandens ir 70 % etanolio. (Žr. „Hamilton Microlab STAR“ informacinį vadovą, dokumento Nr. 15070074.)
 - Nuvalykite pipetavimo galvutės stabdymo diskus ir žiedinius tarpiklius (išorinę pipetavimo kanalų dalį) nesipūkuojančia šluoste, sudrėkinta dejonizuotu vandeniu ir 70 % etanoliu.
- Nuvalykite CORE 96 zondų galvutę, kaip nurodyta toliau.
 - Naudodami tą pačią nesipūkuojančią šluostę, sudrėkintą dejonizuotu vandeniu ir 70 % etanoliu, nuvalykite 96 zondų galvutės korpusą ir stabdymo diskų apačią.
 - Valydami ta pačia šluoste arba šluostės atraiža, sudrėkinta dejonizuotu vandeniu ir 70 % etanoliu, apjuoskite 96 zondų galvutės pipetavimo kanalus, kad nuvalytumėte žiedinius tarpiklius. Pakartokite šią procedūrą su kiekvienu 96 zondų galvutės pipetavimo kanalu.
- Priekinį ir galinį dangtį nupurkškite dejonizuotu vandeniu ir 70 % etanoliu, o tada nusauskite.
- Apsauginę automatinio įkėlimo juostą valykite dejonizuotu vandeniu ir 70 % etanoliu sudrėkintu audiniu ir nuvalykite stipriai nespausdami.
- Kai platforma ir komponentai yra visiškai sausi, padėkite laikiklius atgal.

PASTABA Netinkamai valant ir prižiūrint ML STAR kyla kryžminės taršos pavojus ir gali būti neigiamai paveiktas tyrimo veiksmingumas.

Kokybės kontrolė

Gali būti naudojamas žinomų veikimo charakteristikų teigiamas kontrolinis mėginys siekiant aptikti apdoravimo ir techninių procedūrų skirtumus laboratorijoje.

Naudojant teigiamą kontrolinį mėginį arba neigiamą kontrolinį mėginį, sumažėja bendras nežinomų motinos mėginių, kuriuos galima apdoroti naudojant kiekvieną mėginių paruošimo rinkinį, skaičius.

24 ir 48 mėginių partijoje naudokite ne daugiau nei du neigiamus kontrolinius mėginius, o 96 mėginių partijoje – ne daugiau nei keturis neigiamus kontrolinius mėginius.

Naudojimo instrukcijos

Patarimai ir darbo metodai

Jei protokole nenurodytas saugaus sustojimo taškas, nedelsdami pereikite prie kito veiksmo.

Brūkšinių kodų uždėjimas ant plokštelių

- Viso pločio plokštelių brūkšniniai kodai prasideda raidėmis PL.
- Gilių šulinėlių plokštelių brūkšniniai kodai prasideda raidėmis DW.
- Uždėkite brūkšninius kodus ant viso pločio plokštelių ir gilių šulinėlių plokštelių šono, šalia 12 stulpelio.
- Įdėkite plokšteles taip, kad brūkšninis kodas būtų dešinėje ir kad jį būtų galima nuskaityti automatiškai.

Plokštelės uždarymas ir atidarymas

- Būkite ypač atsargūs, kad išvengtumėte kryžminio užteršimo – apatinėje sandariklio pusėje neturi matytis skysčio.
 - Įsitikinkite, kad atvira sandariklio apatinė dalis nesiliestų su atvirais šulinėliais.
 - Stenkitės neliesti atvirų šulinėlių.
- Visada sandariai uždarykite 96 šulinėlių plokštelę prieš atlikdami šiuos protokolo veiksmus:
 - prieš atlikdami centrifugavimo veiksmus;
 - prieš atlikdami apdorojimo termocikleryje veiksmus.
- Norėdami sandariai uždaryti plokštelę, ant jos uždėkite folijos sandariklį. Įsitikinkite, kad slėgis taikomas visoje plokštelėje, o sandariklis yra sandarus kiekviename atskirame šulinėlyje.
- Prieš atidarydami plokštelę atlikite šiuos veiksmus:
 - Trumpai centrifuguokite 96 šulinių plokštelę 1000 × g jėga 20 sekundžių.
 - Plokštelę padėkite ant lygaus paviršiaus, o tada lėtai nuimkite sandariklį.

„VeriSeq NIPT Microlab STAR“

- Prieš naudodami atlikite ir užregistruokite reikiamus techninės priežiūros darbus pagal gamintojo instrukcijas.
- Stebėkite ML STAR, kai atliekami automatizuoti veiksmai. Stebėkite 2 versijos „VeriSeq NIPT Workflow Manager“ (darbo eigos tvarkyklė) programinės įrangos sąsajoje pateikiamus raginimus ir operatoriaus instrukcijas.
- Naudojant priekinis dangtis turi būti savo vietoje.
- Naudojant platforma turi būti tuščia.
- Jei tvarkant klaidą matomas parinkties mygtukas **Exclude (Neįtraukti)**, jokiais būdais stenkitės nesirinkti šios parinkties. Jei metodas negali būti taikomas prieš klaidų apdorojimo įvykį arba turi ribotas klaidų apdorojimo parinktis, nutraukite seriją.

- Atliekant plokštelės vakuumavimo veiksmus, jei 2 versijos „VeriSeq NIPT Workflow Manager“ (darbo eigos tvarkyklė) pateikia raginimą, rankiniu būdu padėkite suformuoti sandarų uždengimą tarp plokštelės ir vakuuminės sistemos kolektoriaus.
- Leiskite sistemai automatiškai pašalinti antgalius iš adapterio. Nebandykite patys išimti antgalių, nebent tai ragina padaryti programinė įranga.
- Išimkite išnaudotus reagentus ir panaudotas eksploatacines medžiagas, kai tai padaryti paragins „Workflow Manager“ (darbo eigos tvarkyklė).
- Kasdien ištuštinkite vakuuminės sistemos atliekų didbutelius. Pirmasis didbutelis niekada negali būti pripildytas daugiau nei iki pusės. Perpildžius vakuuminės sistemos atliekų talpyklas gali būti pažeistas vakuuminis siurblys ir sumažėti sistemos taikoma vakuomo galia.
- Prieš pradėdami taikyti metodą, 24, 48 ir 96 mėginių partijų atveju visą stovą užpildykite atskirai suskaičiuotais 8 kanalų antgaliais.

Mėginių apdorojimas

Procedūra

1. Su kiekviena alikvotine dalimi atlikite toliau nurodytus veiksmus.
 - a. Centrifuguokite brūkšninio kodu pažymėtus mėginius 1600 × g jėga 10 minučių 4 °C temperatūroje išjungę priverstinio stabdymo funkciją.
 - b. Kai centrifuga visiškai sustoja, išimkite mėginių mėgintuvėlius.
Baigę centrifuguoti per 15 minučių pradėkite plazmos atskyrimo procedūrą. Jei praėjo daugiau nei 15 minučių, centrifuguokite dar kartą.
2. Patikrinkite, ar visų mėgintuvėlių mėginiai yra tinkami, atlikdami toliau nurodytas patikras.
 - Mėginių tūris yra toks, koks numatytas.
 - Po centrifugavimo mėginiuose matomas aiškus atskyrimas tarp raudonųjų kraujo kūnelių ir plazmos sluoksnių.
 - Plazmos lygis yra mažiausiai 1,5 ml didesnis už buferinio tirpalo dangą.
 - Mėginys nėra labai hemolizuotas (t. y., plazma neatrodo tamsiai raudona).
 - Mėginys nėra lipeminis (t. y., plazma nėra drumzlinos baltos ar balsvos nepermatomos spalvos).
 - Mėginyje nėra krešulių.



DĖMESIO

Netinkamai laikyti ar apdoroti mėginiai gali būti netinkami naudoti. Jei darbo eigos metu apdorojami netinkami mėginiai, jie išskiriant gali užkimšti surišimo plokštelę, todėl greta esantys mėginių šulinėliai gali persipildyti.

3. Atidarykite mėgintuvėlius ir įdėkite juos į mėgintuvėlių laikiklius. Įdėkite visus mėginius ir visus reikiamus plazmos kontrolinius mėginius, skirtus partijai.

**DĖMESIO**

Jei apdorojant klaidas pateikiama parinktis „Exclude“ (Neįtraukti), jos nepasirinkite. Jei metodas negali būti taikomas prieš klaidų apdorojimo įvykį ir turite ribotas klaidų apdorojimo parinktis, nutraukite seriją.

Plazmos atskyrimas

Paruošimas

1. Pažymėkite 1 naują gilių šulinėlių plokštelę kaip „Intermediate Plasma“ (tarpinė plazma) ir uždėkite brūkšninį kodą.
2. Pažymėkite 1 naują gilių šulinėlių plokštelę kaip „Final Plasma“ (galutinė plazma) ir uždėkite brūkšninį kodą.
3. Prieš pradėdami taikyti metodą, 24, 48 ir 96 mėginių partijų atveju visą stovą užpildykite atskirai suskaičiuotais 8 kanalų antgaliais.

**DĖMESIO**

Įsitikinkite, kad naudojate tinkamo tipo tarpinės plazmos ir galutinės plazmos plokšteles. Vietoj gilių šulinėlių plokštelės naudojant gilių šulinių rezervuarą, susimaišo mėginiai ir galima gauti neteisingų rezultatų.

Procedūra

1. Atidarykite „AppLauncher“ (programų paleidyklė) ir pasirinkite **VeriSeq NIPT Method** („VeriSeq NIPT“ metodas).
2. Įveskite unikalų partijos ID ir naudotojo vardą, tada pasirinkite **OK** (gerai).
Partijos ID gali sudaryti ≤ 26 simboliai. Galima naudoti skaitmenis, raides, pabraukimo brūkšnius (_) ir brūkšnius (-). Pavyzdžiai pateikti toliau: 2025-10-16_Batch3.
Partijos ID didžiosios ir mažosios raidės neskiriamos. Didžiosioms ir mažosioms raidėms jautrūs partijos ID nelaikomi unikaliais.
Partijos pavadinimai turi būti unikalūs ir turi skirtis ne tik didžiosiomis ir mažosiomis raidėmis. Pavyzdžiui, partijos pavadinimai „Batch01“ ir „batch01“ nėra unikalūs. Ta pati taisyklė taikoma mėginių ID pavadinimams.
3. Pasirinkite **New Batch** (nauja partija).
4. Atlikę inicijavimą pasirinkite **OK** (gerai), kad pradėtumėte plazmos atskyrimą.
5. Pasirinkite partijos dydį, tada – **OK** (gerai).
6. Pasirinkite bešablonių kontrolinių mėginių (angl. „no template control“, NTC) skaičių, tada – **OK** (gerai).
NTC lizdai visada yra paskutiniai pasirinkti lizdai. Pavyzdžiui, jei 24 mėginių serijoje yra du NTC, NTC skiriamos 23 ir 24 pozicijos.
7. Atlikite vieną iš toliau nurodytų veiksmų.

- Norėdami įkelti esamą mėginių lapą, pasirinkite mėginių lapą, susietą su partija, tada pasirinkite **OK** (gerai).
- Norėdami tęsti nepasirinkę mėginių lapo, pasirinkite **No Sample Sheet** (be mėginių lapo).

Informacijos apie mėginių lapo kūrimą žr. 2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ programinės įrangos vadove (dokumento Nr. 1000000067940).

PASTABA Siekiant užtikrinti tinkamą duomenų analizę, būtina tiksliai nurodyti mėginio tipą ir vienvaisio arba dvivaisio nėštumo parinktį. Jei pasirinkote parinktį **No Sample Sheet** (be mėginių lapo), įsitikinkite, kad nustatėte numatytąsias mėginio vertes dalyje „Workflow Manager Service Tools“ (darbo eigos tvarkyklės paslaugų įrankiai). Daugiau informacijos ieškokite „VeriSeq“ NIPT sprendimo 2 versijos programinės įrangos vadove (dokumento Nr. 1000000067940).

- Įsitikinkite, kad uždėti visi brūkšniniai kodai, tada įdėkite mėginius, antgalius ir plokšteles (brūkšninis kodas turi būti dešinėje) į laikiklį.
- Gavę kiekvieną raginimą įdėti, pasirinkite **OK** (gerai).

Mėginių partijos dydis	Laikiklio tipas	Takelis	Elementas	Vietos padėtis
24, 48, 96	Patarimas	7–12	1000 µl antgaliai	5
			1000 µl antgaliai (tik 96 mėginių partijai)	4, 5
	Mėgintuvėlių	15	1–24 paruošti kraujo mėginių mėgintuvėliai (visų dydžių partijoms)	1–24
	Mėgintuvėlių	16	25–48 paruošti kraujo mėginių mėgintuvėliai (tik 48 ir 96 mėginių partijoms)	25–48
	Mėgintuvėlių	17	49–72 paruošti kraujo mėginių mėgintuvėliai (tik 96 dydžio partijai)	49–72
	Mėgintuvėlių	18	73–96 paruošti kraujo mėginių mėgintuvėliai (tik 96 mėginių partijai)	73–96
	„Multiflex“	19–24	Tuščia gilių šulinėlių plokštelė, galutinė plazma – su brūkšniniu kodu	4
	„Multiflex“	19–24	Tuščia gilių šulinėlių plokštelė, tarpinė plazma – su brūkšniniu kodu	5
	Reagentų	47	[Pasirinktinai] Dulbecco fiziologinis tirpalas fosfatiniame buferiniame tirpale (DPBS) – naudojamas neigiamam kontroliniam mėginiui (NTC)	5

- Įsitikinkite, kad laikikliai, laboratoriniai įrankiai ir reagentai įkelti teisingai.
- Ekrane „Pre-Spin Deck Verification“ (patvirtinimas prieš sukimąsi) pasirinkite **OK** (gerai).

12. Stebėkite ML STAR, kai atliekami automatizuoti veiksmai.
13. Kai „Workflow Manager“ (darbo eigos tvarkyklė) bus pateiktas raginimas, įsitikinkite, kad niekas netrukdo ML STAR įkėlimo platformai, kad ML STAR galėtų ištuštinti laikiklius.
14. Pasirinkite **Unload** (išimti), kad ištuštintumėte platformą.
15. Išimkite tarpinės plazmos gilių šulinėlių plokštelę, kaip nurodyta.
 - a. Apžiūrėkite plokštelę ir įsitikinkite, kad tūris vienodas visuose šulinėliuose (nėra pipetavimo klaidų). Numatomas tūris yra 1000 µl.
 - b. Užregistruokite neatitikimus, kai plazmos atskyrimo procedūra bus baigta.
 - c. Sandariai uždarykite plokštelę, subalansuokite ir centrifuguokite 5600 × g jėga 10 minučių išjungę priverstinio stabdymo funkciją arba nustatę žemiausią nuostatą.
16. Pasirinkite **Yes** (taip), kad pereitumėte prie galutinės plazmos paruošimo proceso.
17. Nuimkite nuo plokštelės plėvelę ir įdėkite ją į laikiklį.

Mėginių partijos dydis	Laikiklio tipas	Takelis	Elementas	Vietos padėtis
24, 48, 96	„Multiflex“	19–24	Tarpinės plazmos gilių šulinėlių plokštelė	5

18. Pažymėkite žymimąjį langelį **Intermediate Plasma plate has been spun** (buvo sukama tarpinės plazmos plokštelė), tada pasirinkite **OK** (gerai).
19. Stebėkite ML STAR, kai atliekami automatizuoti veiksmai.
20. Kai „Workflow Manager“ (darbo eigos tvarkyklė) paragins, įsitikinkite, kad niekas netrukdo ML STAR įkėlimo platformai, kad ML STAR galėtų ištuštinti laikiklius.
21. Pasirinkite **Unload** (išimti), kad ištuštintumėte platformą.
22. Kai „Workflow Manager“ (darbo eigos tvarkyklė) bus pateiktas raginimas, ištuštinkite laikiklius ir platformą.
23. Išimkite galutinės plazmos gilių šulinėlių plokštelę.
24. Patikrinkite, ar plokštelėje nėra šių klaidų:
 - nevienodas tūris visuose šulinėliuose. Numatomas tūris yra 900 µl;
 - ar yra matomų ląstelių granulių;
 - ar nėra per didelės hemolizės.

Jei pastebite neįprastų matomų ląstelių granulių ar per didelę hemolizę, panaikinkite paveiktą pavyzdį plazmos atskyrimo metodo pabaigoje arba naudodami „Batch Manager“ (partijos tvarkyklė). Daugiau informacijos apie „Batch Manager“ (partijos tvarkyklė) žr. 2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ programinės įrangos vadove (dokumento Nr. 1000000067940).
25. Kai „Workflow Manager“ (darbo eigos tvarkyklė) paragins, pasirinkite **OK** (gerai).
26. Įveskite komentarus apie paveiktus šulinėlius, tada pasirinkite **OK** (gerai).
27. Atlikite vieną iš toliau nurodytų veiksmų.

- Norėdami pereiti prie cfDNR išskyrimo procedūros, pasirinkite **Yes** (taip).
- Norėdami sustoti, pasirinkite **Exit** (išeiti).

SAUGAUS SUSTOJIMO TAŠKAS

Jei norite sustabdyti, sandariai uždarykite galutinės plazmos plokštelę ir laikykite ją nuo 2 °C iki 8 °C temperatūroje iki 7 dienų.

cfDNR išskyrimas

Paruošimas

1. Vizualiai apžiūrėkite išskyrimo ir priedų dėžutes ir įsitikinkite, kad rinkinio galiojimo laikas nepasibaigęs.
2. Paruoškite toliau nurodytus reagentus. Pažymėkite rezervuarų voneles ir gilių šulinėlių rezervuarus nurodydami reagentų pavadinimus.

Reagentas	Laikymas	Instrukcijos
Galutinės plazmos gilių šulinėlių plokštelė	Nuo 2 °C iki 8 °C	Jei plokštelė anksčiau buvo padėta saugoti, palikite ją 30 minučių, kol pasieks kambario temperatūrą. Centrifuguokite 1 000 × g jėga 20 sekundžių. Prieš naudodami atidarykite galutinės plazmos gilių šulinėlių plokštelę.

3. Lėtai įpilkite 3,75 ml proteinazės buferinio tirpalo į kiekvieną proteinazės K reagento buteliuką.
 - 24 ir 48 mėginių rinkiniams reikia paruošti 3 buteliukus.
 - 96 mėginių rinkiniams reikia paruošti 4 buteliukus.
4. Uždarykite proteinazės K buteliukus dangteliu ir išmaišykite sukuriniu maišytuvu, kol bus resuspenduota.



DĖMESIO

Neužterškite guminio kamščio. Jei ant guminio kamščio patenka kitų medžiagų, gali būti užteršti paskesni mėginiai.

5. Paruoštą proteinazę iš visų buteliukų sutelkite į reagentų vonele ir ją pažymėkite „Proteinazė K“.
6. Į kiekvieną reagento buteliuką su II plovimo buferiniu tirpalu įpilkite 100 ml 100 % etanolio.
 - 24 ir 48 mėginių rinkiniams paruoškite 1 buteliuką.
 - 96 mėginių rinkiniams reikia paruošti 2 buteliukus.
7. II plovimo buferinio tirpalo buteliukus apverskite, kad susimaišytų.
8. Pažymėkite ant II plovimo buferio tirpalo buteliukų esančius žymimuosius langelius.
9. Pažymėkite 1 naują viso pločio plokštelę kaip „Intermediate“ (tarpinė) ir uždėkite plokštelės brūkšninį kodą.
10. Pažymėkite 1 naują viso pločio plokštelę kaip „cfDNA Elution“ (cfDNR eliuavimas) ir uždėkite plokštelės brūkšninį kodą.

11. Pažymėkite 1 naują gilių šulinėlių plokštelę kaip „Extraction Intermediate“ (tarpinis išskyrimas) ir uždėkite gilių šulinėlių plokštelės brūkšninį kodą.
12. Ant DNR surišimo plokštelės uždėkite plokštelės brūkšninį kodą.
13. Nenaudojamus 24 ir 48 mėginių partijų šulinėlius uždenkite folija.
14. Paruoškite 70 % etanolio valymo tirpalą (70 % etanolio, 30 % vandens be ribonukleazijų ir deoksiribonukleazijų), skirtą vakuuminei sistemai valyti.
15. Paruoškite vakuuminę sistemą.
 - a. Išimkite vakuuminės sistemos kolektorių ir nuvalykite 70 % etanoliumi. Nevalykite tarpiklio etanoliumi, kad medžiaga neįtrūktų.
 - b. Ištuštinkite vakuuminės sistemos atliekų dėžę.
 - c. Įsitikinkite, kad ML STAR vakuuminė sistema įjungta.

Procedūra

1. Pasirinkite **OK** (gerai), kad pradėtumėte cfDNR išskyrimo procedūrą.
2. Jei **VeriSeq NIPT Method** neatidarytas, atlikite toliau nurodytus veiksmus.
 - a. Atidarykite „AppLauncher“ (programų paleidyklė) ir pasirinkite **VeriSeq NIPT Method** („VeriSeq NIPT“ metodas).
 - b. Įveskite partijos ID ir naudotojo vardą, tada pasirinkite **OK** (gerai).
3. Įdėkite antgalius į antgalių laikiklius, kaip nurodyta toliau, tada pasirinkite **OK** (gerai).



DĖMESIO

Prieš pradėdami taikyti šį metodą 24, 48 ir 96 mėginių partijoms, pridėkite visą 8 kanalų antgalių stovą.

Mėginių partijos dydis	Laikiklio tipas	Takelis	Elementas	Vietos padėtis
24	Patarimas	1–6	1000 µl antgaliai	1
		7–12	300 µl antgaliai	1
48	Patarimas	1–6	1000 µl antgaliai	1, 2
		7–12	300 µl antgaliai	1
96	Patarimas	1–6	1000 µl antgaliai	1, 2, 3, 4
		7–12	300 µl antgaliai	1

4. Įdėkite suskaičiuotus antgalius į antgalių laikiklius, kaip nurodyta toliau.

Mėginių partijos dydis	Laikiklio tipas	Takelis	Elementas	Vietos padėtis
24, 48, 96	Patarimas	49–54	1000 µl antgaliai	1
			300 µl antgaliai	2
			50 µl antgaliai	3

- Įveskite kiekvieno antgalių stovo pirmojo ir paskutiniojo antgalių vietas, tada pasirinkite **OK** (gerai).
- Nuskaitykite išskyrimo dėžutės brūkšninius kodus.
- Įveskite naudotojo vardą arba reagentą paruošusio asmens inicialus, tada pasirinkite **OK** (gerai).
- Nuskaitykite priedų dėžutės brūkšninius kodus.
- Įveskite naudotojo vardą arba reagentą paruošusio asmens inicialus, tada pasirinkite **OK** (gerai).
- Įsitikinkite, kad brūkšniniai kodai uždėti.
- Jei reikia, atidarykite galutinės plazmos gilių šulinėlių plokštelę.
- Įdėkite plokšteles (brūkšninis kodas turi būti dešinėje) į plokštelių laikiklį kaip nurodyta, o tada pasirinkite **OK** (gerai).

Mėginių partijos dydis	Laikiklio tipas	Takelis	Elementas	Vietos padėtis
24, 48, 96	„Multiflex“	19–24	Nauja viso pločio plokštelė, „Intermediate“ (tarpinė), su brūkšniniu kodu	1
			Nauja viso pločio plokštelė, „cfDNA Elution“ (cfDNR eliuavimas), su brūkšniniu kodu	2
			Nauja gilių šulinėlių plokštelė, „Extraction Intermediate“ (tarpinis išskyrimas), su brūkšniniu kodu	4
			Galutinės plazmos gilių šulinėlių plokštelė, su brūkšniniu kodu	5

- Įsitikinkite, kad ant DNR surišimo plokštelės uždėtas brūkšninis kodas, tada pasirinkite **OK** (gerai).
- Jei naudojate dalines plokštelių partijas, ant nenaudojamų šulinėlių uždėkite atkirptą plokštelės plėvelę (24 mėginių partijose – 4–12 stulpeliai, 48 mėginių partijose – 7–12 stulpeliai).
- Įdėkite DNR surišimo plokštelę į vakuuminės sistemos kolektorių taip, kad brūkšninis kodas būtų dešinėje.
- Prieš dėdami surišimo plokštę ant BVS kolektoriaus, vizualiai apžiūrėkite šulinėlius, ar niekas jų netrukdo. Tai gali sutrukdyti reagentams tekėti esant vakuume.

17. Jei naudojamos 24 arba 48 mėginių partijos, nenaudojamus šulinėlius uždenkite ir sandarinkite folijos sandarikliu. Pažymėkite žymimąjį langelį **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (Ar DNR surišimo plokštelės stulpeliai sandariai uždaryti?) ir pasirinkite **OK** (gerai).
18. Įdėkite reagentų voneles į reagentų laikiklį, kaip nurodyta toliau, tada pasirinkite **OK** (gerai).

Mėginių partijos dydis	Laikiklio tipas	Takelis	Elementas	Vietos padėtis
24, 48	Reagentų	47	16 ml eliuavimo buferinio tirpalo	1
			11 ml proteinazės K	2
96	Reagentų	47	16 ml eliuavimo buferinio tirpalo	1
			15 ml proteinazės K	2

19. Perkelkite nurodytus reagentus į gilių šulinėlių rezervuarus ir įdėkite rezervuarus į gilių šulinėlių laikiklius, kaip nurodyta toliau.
20. Pasirinkite **OK** (gerai).

Mėginių partijos dydis	Laikiklio tipas	Takelis	Elementas	Vietos padėtis
24, 48	Gilių šulinėlių	39–44	125 ml II plovimo buferinio tirpalo	1
			125 ml I plovimo buferinio tirpalo	2
			60 ml 100 % etanolio	3
			100 ml lizės buferinio tirpalo	4
			60 ml vandens be ribonukleazių ir deoksiribonukleazių	5
96	Gilių šulinėlių	39–44	200 ml II plovimo buferinio tirpalo	1
			125 ml I plovimo buferinio tirpalo	2
			100 ml 100 % etanolio	3
			100 ml lizės buferinio tirpalo	4
			100 ml vandens be ribonukleazių ir deoksiribonukleazių	5

21. Palaukite, kol bus atlikta automatizuota reagentų tūrio patikra.
22. Įsitinkite, kad vakuuminės sistemos atliekų dėžė tuščia (rekomenduojama, kad dėžė būtų pripildyta iki pusės), tada pasirinkite **OK** (gerai).
23. Įsitinkite, kad tinkamai padėti visi laikikliai, eksploatacinės laboratorinės medžiagos ir reagentai, tada ekrane „Extraction Deck Verification“ (išskyrimo platformos patvirtinimas) pasirinkite **OK** (gerai).
24. Stebėkite ML STAR, kai atliekami automatizuoti veiksmai.

**DĖMESIO**

Turite rankiniu būdu panaikinti mėginių perpildas, kurių sistema neaptiko prieš gretimų šulinėlių.

25. Baigę paskutinį vakuuminės sistemos veiksmą, išimkite DNR surišimo plokštelę ir nuvalykite apatinį paviršių 70 % etanoliu.
26. Sandariai uždarykite visus neuždengtus DNR surišimo plokštelės šulinėlius ir padėkite DNR surišimo plokštelę ant tuščios galutinės plazmos gilių šulinėlių plokštelės.
27. Centrifuguokite DNR surišimo plokštelę ir galutinės plazmos plokštelę 5600 × g jėga 10 minučių įjungę priverstinio stabdymo funkciją.
28. Pasirinkite **OK** (gerai).
29. Kol vykdomas DNR surišimo plokštelės centrifugavimas, baikite išvalyti vakuuminę sistemą, atlikdami toliau nurodytus veiksmus.
 - a. Išimkite vakuuminės sistemos kolektorių ir pasirinkite **OK** (gerai).
 - b. Palaukite, kol bus baigta automatizuota atliekų pašalinimo procedūra.
 - c. Išvalykite vakuuminės sistemos kolektorių ir vakuuminės sistemos vidų 70 % etanoliu, tada įdėkite vakuuminės sistemos kolektorių atgal.
 - d. Pažymėkite žymimąjį langelį **Manifold is on Vacuum** (kolektorius yra vakuuminėje sistemoje), kad inicijuotumėte eliuavimo plokštelės perkėlimą į vakuuminę sistemą, tada pasirinkite **OK** (gerai).
30. Atlikę centrifugavimą, atidenkite DNR surišimo plokštelės šulinėlius, kuriuose yra mėginių.
31. DNR surišimo plokštelę uždėkite ant cfDNR eliuavimo plokštelės, esančios ant vakuuminio kolektoriaus.
32. Įdėkite DNR surišimo plokštelę taip, kad brūkšninis kodas būtų dešinėje, tada pasirinkite **OK** (gerai).
33. Stebėkite ML STAR, kai atliekami automatizuoti veiksmai.
34. Po inkubavimo pažymėkite žymės langelį **Plates are assembled as indicated** (Plokštelės surinktos taip, kaip nurodyta). Įsitikinkite, kad DNR surišimo / cfDNA eliuavimo plokštelės prietaisas yra ant atraminio pagrindo (jei jo reikia centrifuguojant).
35. Sandariai uždarykite neuždengtus DNR surišimo plokštelės šulinėlius.
36. Centrifuguokite 5600 × g jėga 2 minutes įjungę priverstinio stabdymo funkciją, tada pasirinkite **OK** (gerai).
37. Apžiūrėkite cfDNR eliuavimo plokštelę ir įsitikinkite, kad tūris vienodas visuose šulinėliuose. Juose turi būti apytiksliai 55 µl.
38. Sandariai uždarykite cfDNR eliuavimo plokštelę ir atidėkite ją bibliotekos paruošimo procedūrai.
39. Kai „Workflow Manager“ (darbo eigos tvarkyklė) paragins, įsitikinkite, kad niekas netrukdo ML STAR įkėlimo platformai, kad ML STAR galėtų ištuštinti laikiklius.
40. Pasirinkite **Unload** (išimti), kad ištuštintumėte platformą.
41. Išimkite visus laikiklius ir nuvalykite ML STAR platformą, tada pasirinkite **OK** (gerai).
42. Įveskite komentarus apie paveiktus šulinėlius, tada pasirinkite **OK** (gerai).
43. Atlikite vieną iš toliau nurodytų veiksmų.
 - Norėdami pereiti prie bibliotekų ruošimo procedūros, pasirinkite **Yes** (taip).

- Norėdami sustoti, pasirinkite **Exit** (išeiti).

SAUGAUS SUSTOJIMO TAŠKAS

Jei norite sustoti, sandariai uždarykite cfDNR eliuavimo plokštelę ir ne daugiau kaip 7 dienas laikykite ją nuo -25 °C iki -15 °C temperatūroje.

Bibliotekų paruošimas

Paruošimas

- Vizualiai apžiūrėkite bibliotekos paruošimo ir priedų dėžutes ir įsitikinkite, kad rinkinių galiojimo laikas nepasibaigęs.
- Paruoškite toliau nurodytus reagentus. Pažymėkite rezervuarų voneles ir gilių šulinėlių rezervuarus nurodydami reagentų pavadinimus.

Reagentas	Laikymas	Instrukcijos
Poliadenilino mišinys	Nuo -25 °C iki -15 °C	Atšildykite kambario temperatūroje. Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
cfDNR eliuavimo plokštelė	Nuo -25 °C iki -15 °C	Jei plokštelė anksčiau buvo padėta saugoti, patikrinkite, ar ji buvo laikoma ne daugiau kaip 7 dienas, ir atšildykite ją kambario temperatūroje. Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu 1 500 sūk./min. greičiu 1 minutę. Centrifuguokite 1 000 × g jėga 20 sekundžių.
Grandinės galų taisymo mišinys	Nuo -25 °C iki -15 °C	Atšildykite kambario temperatūroje. Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu.
Hibridizacijos buferinis tirpalas	Nuo -25 °C iki -15 °C	Atšildykite kambario temperatūroje. Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu. Panaudoję padėkite atgal į laikymo vietą.
Ligavimo mišinys	Nuo -25 °C iki -15 °C	Atšildykite kambario temperatūroje. Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
NIPT DNR adapterio plokštelė	Nuo -25 °C iki -15 °C	Atšildykite kambario temperatūroje. Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu. Centrifuguokite 1 000 × g jėga 20 sekundžių.
Resuspensijos buferinis tirpalas	Nuo 2 °C iki 8 °C	Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu. Panaudoję padėkite atgal į laikymo vietą.
Mėginio gryninimo granulės	Nuo 2 °C iki 8 °C	Palikite 30 minučių, kol pasieks kambario temperatūrą. Prieš naudodami kiekvieną kartą gerai išmaišykite sūkuriniu maišytuvu. Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu arba apversdami, kol iš granulių bus paruošta suspensija ir mišinys taps vienalytis.

**DĖMESIO**

Atidarydami NIPT DNA adapterio plokštelę būkite itin atsargūs, kad išvengtumėte kryžminio šulinėlių užteršimo aerozoliu, nes taip galite gauti neteisingus rezultatus.

3. Jei cfDNA eliuavimo plokštelė buvo laikoma užšaldyta, paruoškite ją kaip nurodyta.
 - a. Atšildykite kambario temperatūroje.
 - b. Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu 1 500 sūk./min. greičiu 1 minutę.
 - c. Centrifuguokite 1000 × g jėga 20 sekundžių.
4. Pažymėkite vieną naują viso pločio plokštelę kaip „Libraries“ (bibliotekos) ir uždėkite plokštelės brūkšninį kodą.
5. Paruoškite 80 % etanolio iš absoliutaus etanolio. Įpilkite 40 ml 100 % etanolio ir 10 ml vandens be ribonukleazijų ir deoksiribonukleazijų. Apverskite, kad sumaišytumėte.
6. Įsitikinkite, kad ML STAR šiluminis valdiklis įjungtas.

Fermentų praskiedimas

1. Įpilkite poliadenilino mišinio ir resuspensijos buferinio tirpalo į mėgintuvėlį užsukamu dangteliu. Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.

Mėginių partijos dydis	Poliadenilino mišinys (μl)	Resuspensijos buferinis tirpalas (μl)
24, 48	900	1200
96	1800	2400

2. Įpilkite ligavimo mišinio ir resuspensijos buferinio tirpalo į mėgintuvėlį užsukamu dangteliu. Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.

Mėginių partijos dydis	Ligavimo mišinys (μl)	Resuspensijos buferinis tirpalas (μl)
24, 48	230	1713
96	440	3278

Procedūra

1. Pasirinkite **OK** (gerai), kad pradėtumėte bibliotekos paruošimo procedūrą. Jei „VeriSeq NIPT Method“ dar neatidarytas, atlikite toliau nurodytus veiksmus.
 - a. Atidarykite „AppLauncher“ (programų paleidyklė) ir pasirinkite **VeriSeq NIPT Method** („VeriSeq NIPT“ metodas).
 - b. Įveskite partijos ID ir naudotojo vardą, tada pasirinkite **OK** (gerai).
2. Įsitikinkite, kad paruoštos toliau nurodytos eksploatacinės medžiagos, kaip nurodyta ekrane „Reagent Preparation“ (reagentų paruošimas):
 - „A-Tailing Mix“ (poliadenilino mišinys), „Ligation Mix“ (ligavimo mišinys) ir 80 % EtOH;

- „Sample Purification Beads“ (mėginio gryninimo granulės), „End Repair Mix“ (grandinės galų taisymo mišinys) ir „NIPT DNA Adapter Plate“ (NIPT DNR adapterio plokštelė)
- Pažymėkite žymimuosius langelius, tada pasirinkite **OK** (gerai).
 - Nuskaitykite bibliotekos paruošimo dėžutės brūkšninius kodus.
 - Įveskite naudotojo vardą arba reagentą paruošusio asmens inicialus, tada pasirinkite **OK** (gerai).
 - Nuskaitykite priedų dėžutės brūkšninius kodus.
 - Įveskite naudotojo vardą arba reagentą paruošusio asmens inicialus, tada pasirinkite **OK** (gerai).
 - Įdėkite antgalius į antgalių laikiklius, kaip nurodyta toliau, tada patvirtinkite kiekvieną laikiklį pasirinkdami **OK** (gerai).

Mėginių partijos dydis	Laikiklio tipas	Takelis	Elementas	Vietos padėtis
24	Patarimas	1–6	50 µl antgaliai	1
		7–12	300 µl antgaliai	1, 2
48	Patarimas	1–6	50 µl antgaliai	1, 2
		7–12	300 µl antgaliai	1, 2, 3, 4
96	Patarimas	1–6	50 µl antgaliai	1, 2, 3, 4
		7–12	300 µl antgaliai	1, 2, 3, 4, 5

- Jeigu sustabdėte protokolą po cfDNR išskyrimo procedūros, įdėkite suskaičiuotus antgalius į antgalių laikiklius, kaip nurodyta toliau.

Mėginių partijos dydis	Laikiklio tipas	Takelis	Elementas	Vietos padėtis
24, 48, 96	Patarimas	49–54	1000 µl antgaliai	1
			300 µl antgaliai	2
			50 µl antgaliai	3

- Įveskite kiekvieno antgalių stovo pirmojo antgalio vietą, tada pasirinkite **OK** (gerai).

11. Įsitikinkite, kad uždėti visi brūkšniniai kodai, įdėkite plokšteles (brūkšninis kodas turi būti dešinėje) į plokštelių laikiklį, kaip nurodyta toliau, tada pasirinkite **OK** (gerai).

Mėginių partijos dydis	Laikiklio tipas	Takelis	Elementas	Vietos padėtis
24, 48, 96	„Multiflex“	19–24	cfDNR eliuavimo plokštelė, su brūkšniniu kodu	1
			NIPT DNR adapterio plokštelė, su brūkšniniu kodu	2
			Nauja 96 šulinėlių viso pločio plokštelė, bibliotekos, su brūkšniniu kodu	3
			Naujos 96 šulinėlių viso pločio plokštelės	4, 5

12. Įdėkite gilių šulinėlių laikiklį, kaip nurodyta toliau, tada pasirinkite **OK** (gerai).

Mėginių partijos dydis	Laikiklio tipas	Takelis	Elementas	Vietos padėtis
24, 48, 96	Gilių šulinėlių	39–44	50 ml 80 % EtOH gilių šulinėlių rezervuare	1
			Naujos 96 šulinėlių viso pločio plokštelės	2, 3, 4, 5

13. Įdėkite reagentų voneles į reagentų laikiklį, kaip nurodyta toliau, tada pasirinkite **OK** (gerai).

Mėginių partijos dydis	Laikiklio tipas	Takelis	Elementas	Vietos padėtis
24, 48, 96	Reagentas	47	2,5 ml grandinės galų taisymo mišinys	1
			Paruoštas poliadenilavimo mišinys (bendras tūris)	2
			Paruoštas ligavimo mišinys (bendras tūris)	3
			10ml ml mėginio gryninimo granulės	4
			12 ml hibridizacijos buferinio tirpalo	5

14. Likusius 12 ml hibridizacijos buferinio tirpalo (HT1) palikite telkinio talpoje.

15. Įsitikinkite, kad laikikliai, eksploatacinės laboratorinės medžiagos ir reagentai įdėti taip, kaip nurodyta, tada ekrane „Library Deck Verification“ (bibliotekos platformos patvirtinimas) pasirinkite **OK** (gerai).

16. Palaukite, kol bus atlikta automatizuota reagentų tūrio patikra.
17. Stebėkite ML STAR, kai atliekami automatizuoti veiksmai.
18. Kai „Workflow Manager“ (darbo eigos tvarkyklė) paragins, įsitikinkite, kad niekas netrukdo ML STAR įkėlimo platformai, kad ML STAR galėtų ištuštinti laikiklius.
19. Pasirinkite **Unload** (išimti), kad ištuštintumėte platformą.
20. Apžiūrėkite bibliotekų plokštelę ir įsitikinkite, kad visuose šulinėliuose tūris vienodas.



DĖMESIO

Jei tūris nevienodas, mėginiams gali nepavykti atlikti automatinės kokybės kontrolės.

21. Jei norite padėti saugoti, sandariai uždarykite ir palikite bibliotekų plokštelę.
22. Išimkite laikiklius, nuvalykite platformą, tada pasirinkite **OK** (gerai).
23. Įveskite komentarus apie paveiktus šulinėlius, tada pasirinkite **OK** (gerai).
24. Atlikite vieną iš toliau nurodytų veiksmų.
 - Norėdami pereiti prie bibliotekų kiekybinio nustatymo procedūros, pasirinkite **Yes** (taip).
 - Norėdami sustoti, pasirinkite **Exit** (išeiti).

SAUGAUS SUSTOJIMO TAŠKAS

Jei norite sustoti, prieš padėdami į laikymo vietą sandariai uždarykite bibliotekų plokštelę. Bibliotekų plokštelė išlieka stabili iki 7 dienų nuo paruošimo laikant nuo -25 °C iki -15 °C temperatūroje.

Bibliotekų kiekybinis nustatymas

Paruošimas

1. Paruoškite toliau nurodytus reagentus:

Reagentų	Laikymas	Instrukcijos
DNR kiekybinio nustatymo reagentas	Nuo 2 °C iki 8 °C	Saugokite nuo šviesos. Atšildykite palikdami 30–150 minučių kambario temperatūroje. (Pradedant bibliotekų paruošimo procedūrą rekomenduojama pašalinti reagentą.) Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
DNR kiekybinio nustatymo standartas	Nuo 2 °C iki 8 °C	Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
Resuspensijos buferinis tirpalas	Nuo 2 °C iki 8 °C	Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu.

2. Jei bibliotekų plokštelė buvo laikoma užšaldyta, paruoškite ją kaip nurodyta.
 - a. Patikrinkite, ar ji buvo saugoma ne daugiau kaip 7 dienas, ir atšildykite kambario temperatūroje.

- b. Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu
- c. Centrifuguokite 1000 × g jėga 1 minutę.
3. Likus 10 minučių iki naudojimo įjunkite fluorimetą.
4. Ant naujos 384 šulinėlių plokštelės uždėkite plokštelės brūkšninį kodą.
5. Ant naujos viso pločio šulinėlių plokštelės uždėkite plokštelės brūkšninį kodą.

Procedūra

1. Pasirinkite **OK** (gerai), kad pradėtumėte kiekybinio nustatymo procedūrą.
2. Jei „VeriSeq NIPT Method“ dar neatidarytas, atlikite toliau nurodytus veiksmus.
 - a. Atidarykite „AppLauncher“ (programų paleidyklė) ir pasirinkite **VeriSeq NIPT Method** („VeriSeq NIPT“ metodas).
 - b. Įveskite partijos ID ir naudotojo vardą, tada pasirinkite **OK** (gerai).
3. Nuskaitykite priedų dėžutės brūkšninius kodus.
4. Įveskite naudotojo vardą arba reagentą paruošusio asmens inicialus, tada pasirinkite **OK** (gerai).
5. Įdėkite antgalius į antgalių laikiklį, kaip nurodyta toliau, tada pasirinkite **OK** (gerai).

Mėginių partijos dydis	Laikiklio tipas	Takelis	Elementas	Vietos padėtis
24, 48	Patarimas	1–6	300 µl antgalių stovas	1
			50 µl antgalių stovas	2
96	Patarimas	1–6	300 µl antgalių stovas	1
			50 µl antgalių stovas	2, 3

6. Įsitikinkite, kad brūkšniniai kodai uždėti.
7. Prireikus atidarykite bibliotekų plokštelę.
8. Įdėkite plokšteles (brūkšninis kodas turi būti dešinėje) į „Multiflex“ laikiklį, kaip nurodyta toliau, tada pasirinkite **OK** (gerai).

Mėginių partijos dydis	Laikiklio tipas	Takelis	Elementas	Vietos padėtis
24, 48, 96	„Multiflex“	19–24	Naujos viso pločio plokštelės, su brūkšniniu kodu	1
			Nauja 384 šulinėlių plokštelė, su brūkšniniu kodu	2
			Bibliotekų plokštelė, su brūkšniniu kodu	3
			Naujos 96 šulinėlių viso pločio plokštelės	4, 5

9. Įdėkite reagentų mėgintuvėlius be dangtelių į mėgintuvėlių laikiklį, kaip nurodyta toliau, tada pasirinkite **OK** (gerai).

Mėginių partijos dydis	Laikiklio tipas	Takelis	Elementas	Vietos padėtis
24, 48, 96	Mėgintuvėlių	46	DNR kiekybinio nustatymo standartas	1
			DNR kiekybinio nustatymo reagentas	2

10. Įdėkite reagentų vones į reagentų laikiklį, kaip nurodyta toliau, tada pasirinkite **OK** (gerai).

Mėginių partijos dydis	Laikiklio tipas	Takelis	Elementas	Vietos padėtis
24, 48, 96	Reagentų	47	Nauja reagentų vonelė (tuščia)	1
			16 ml resuspensijos buferinio tirpalo	2

11. Jei sustabdėte protokolą po bibliotekos paruošimo procedūros, įdėkite suskaičiuotus antgalius į antgalių laikiklius, kaip nurodyta toliau.

Mėginių partijos dydis	Laikiklio tipas	Takelis	Elementas	Vietos padėtis
24, 48, 96	Patarimas	49–54	1000 µl antgaliai	1
			300 µl antgaliai	2
			50 µl antgaliai	3

12. Įveskite kiekvieno antgalių stovo pirmojo ir paskutiniojo antgalių vietas, tada pasirinkite **OK** (gerai).
13. Įsitinkite, kad laikikliai, eksploatacinės laboratorinės medžiagos ir reagentai įdėti taip, kaip nurodyta, tada ekrane „Quant Deck Verification“ (kiekybinio nustatymo platformos patvirtinimas) pasirinkite **OK** (gerai).
14. Palaukite, kol bus atlikta automatizuota reagentų tūrio patikra.
15. Stebėkite ML STAR, kai atliekami automatizuoti veiksmai.
16. Kai „Workflow Manager“ (darbo eigos tvarkyklė) paragins, įsitinkite, kad niekas netrukdo ML STAR įkėlimo platformai, kad ML STAR galėtų ištuštinti laikiklius.
17. Pasirinkite **Unload** (išimti), kad ištuštintumėte platformą.
18. Išimkite bibliotekų plokštelę.
- Apžiūrėkite plokštelę ir įsitinkite, kad tūris vienodas visuose šulinėliuose.
 - Sandariai uždarykite bibliotekų plokštelę ir laikykite kambario temperatūroje, kol bus baigta fluorimetrijos duomenų analizė.
19. Išimkite likusias 96 šulinėlių plokšteles ir patikrinkite, ar tūris vienodas visuose šulinėliuose. Didelės tūrio paklaidos gali reikšti pipetavimo problemas..

20. Išimkite 384 šulinėlių plokštelę ir patikrinkite, ar atitinkamuose šulinėliuose yra skysčio.
21. Sandariai uždarykite plokštelę naudodami folijos plėvelę.
22. Centrifuguokite 1 000 x g jėga 20 sekundžių.
23. 10 minučių inkubuokite kambario temperatūroje, saugodami nuo šviesos.
24. Išimkite visus laikiklius.
25. Nuvalykite ML STAR platformą, tada pasirinkite **OK** (gerai).



DĖMESIO

Neišpilkite kiekybinio nustatymo reagentų, kol nebus gauti duomenys. Reagentų prireiks, jei reikės atlikti pakartotinį kiekybinį nustatymą.

26. Atlikę inkubavimą nuimkite folijos plėvelę ir 384 šulinėlių plokštelę įdėkite į mikroplokštelių skaitytuvą. Įsitikinkite, kad naudojate violetinę adapterio plokštelę (dalies numeris: 0310-4336), kurią pateikia molekuliniai įrenginiai arba jo atitikmuo, jei taikoma, naudojant prietaisą.
 - Įsitikinkite, kad įdedant A1 yra viršutiniame kairiajame kampe.
27. Dukart pasirinkite „VeriSeq NIPT“ šabloną, kad atidarytumėte jį programoje „SoftMax Pro“.
28. Skirtuke „Home“ (pradžia) pasirinkite **New Experiment** (naujas bandymas).
29. Pasirinkite **Read** (nuskaityti).
30. Eksportuokite duomenis XML formatu, kaip nurodyta toliau.
 - a. Dešiniuoju pelės mygtuku pasirinkite **Plate** (plokštelė), tada pasirinkite **Rename** (pervardyti).
 - b. Nuskaitykite kiekybinio nustatymo plokštelės brūkšninį kodą, tada pasirinkite **OK** (gerai).
 - c. Viršutiniame kairiajame ekrano kampe pasirinkite plokštelės piktogramą, tada meniu pasirinkite **Export** (eksportuoti).
 - d. Pažymėkite žymimąjį langelį **Expt name** (eksportavimo pavadinimas), nustatykite plokštelės duomenų parinktį „Raw“ (neapdoroti duomenys), nustatykite XML išvesties formatą, tada pasirinkite **OK** (gerai).
 - e. Nurodykite išvesties failo kelią ir pavadinimą, tada pasirinkite **Save** (įrašyti).„Hamilton“ kompiuteris turi turėti prieigą prie failo vietos. Nurodydami failo pavadinimą ar failo kelią nenaudokite tarpų.

Analizė

1. „ML STAR“ (darbo eigos tvarkyklė) ekrane „Scanner Information“ (skaitytuvo informacija) įveskite fluorimetro ID.
2. Įveskite komentarus apie fluorimetro seriją, tada pasirinkite **OK** (gerai).
3. Nueikite į *.xml kiekybinio nustatymo failą, kuriame yra fluorimetrijos duomenys, tada pasirinkite **OK** (gerai).
4. Peržiūrėkite standartų kreivės ir mėginių koncentracijos analizės rezultatus, tada pasirinkite **OK** (gerai).
5. Jei reikia iš naujo nuskaityti plokštelę, pasirinkite **Rescan** (nuskaityti iš naujo). Mėginiai yra jautrūs laikui ir šviesai. Jei reikia, nedelsdami atlikite pakartotinį nuskaitymą.
6. Įveskite komentarus apie paveiktus šulinėlius, tada pasirinkite **OK** (gerai).

7. Įvertinkite rezultatus ir tęskite, kaip nurodyta toliau.
- Jei rezultatai atitinka specifikaciją, pereikite prie [Bibliotekų telkimas 38 psl.](#) Specifikacijas žr. kiekybinio nustatymo KK metrikos ir ribų lentelėje, esančioje 2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ programinės įrangos vadove (dokumento Nr. 1000000067940).
 - Jei rezultatai neatitinka specifikacijos, sistema metodą nutraukia. Pakartokite kiekybinio nustatymo procedūras pradėdami nuo procedūrų, aprašytų skyriuje [Paruošimas 34 psl.](#)
8. Atlikite vieną iš toliau nurodytų veiksmų.
- Norėdami pereiti prie [Bibliotekų telkimas 38 psl.](#) procedūros, pasirinkite **Yes** (taip).
 - Norėdami sustoti, pasirinkite **Exit** (išeiti).

SAUGAUS SUSTOJIMO TAŠKAS

Jei norite sustoti, prieš padėdami į laikymo vietą sandariai uždarykite bibliotekų plokštelę. Bibliotekų plokštelė išlieka stabili iki 7 dienų laikant nuo -25 °C iki -15 °C temperatūroje.

Bibliotekų telkimas

Paruošimas

1. Paruoškite toliau nurodytus reagentus.

Reagentas	Laikymas	Instrukcijos
Hibridizacijos buferinis tirpalas	Nuo -25 °C iki -15 °C	Atšildykite kambario temperatūroje. Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu. Panaudoję padėkite atgal į laikymo vietą.

2. Jei bibliotekų plokštelė buvo laikoma užšaldyta, paruoškite ją kaip nurodyta.
- Patikrinkite, ar ji buvo saugoma ne daugiau kaip 7 dienas, ir atšildykite kambario temperatūroje.
 - Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu 1 500 sūk./min. greičiu 1 minutę.
 - Centrifuguokite 1 000 × g jėga 20 sekundžių.
 - Pipetuodami sumaišykite.
3. Pažymėkite tuščią telkimo mėgintuvėlį „Pool A“ (A telkinys). Jei naudojami 96 mėginiai, pažymėkite antrą tuščią telkimo mėgintuvėlį „Pool B“ (B telkinys).
4. Išsaugokite toliau nurodytą denatūravimo programą termocikleryje su šildomu dangčiu.
- Pasirinkite iš anksto pašildyto dangčio parinktį ir nustatykite 102 °C.
 - Nustatykite 50 µl reakcijos tūrio vertę.
 - Nustatykite didžiausią kitimo greičio vertę (≥ 2 °C per sekundę).
 - Inkubuokite 96 °C temperatūroje 10 minučių, tada – 4 °C temperatūroje 5 sekundes.
 - Laikykite 4 °C temperatūroje.

Procedūra

- Padėkite bibliotekų plokštelę ant iš anksto užprogramuoto termociklerio ir vykdykite denatūravimo programą.
Neatlikite bibliotekų plokštelės denatūravimo procedūros, kol kiekybinis nustatymas neperėjo KK metrikos, nes gali reikėti iš naujo atlikti kiekybinį nustatymą.
- Bibliotekų plokštelę 20 sekundžių centrifuguokite 1000 × g.
- Pasirinkite **OK** (gerai), kad pradėtumėte bibliotekų telkimo procedūrą.
- Jei „VeriSeq NIPT“ metodas neatidarytas, atlikite toliau nurodytus veiksmus.
 - Atidarykite „AppLauncher“ (programų paleidyklė) ir pasirinkite **VeriSeq NIPT Method** („VeriSeq NIPT“ metodas).
 - Įveskite partijos ID ir naudotojo vardą, tada pasirinkite **OK** (gerai).
- Pasirinkite telkinio koncentraciją, tada – **OK** (gerai).
Tikslinis klasterių tankumas yra 220–260 K/mm².

PASTABA Norint išlaikyti panašų klasterių tankį, gautą naudojant 48/96 mėginių partijas, gali tekti padidinti telkinio koncentraciją ir (arba) telkinio tūrį 24 mėginių partijoms.

- Jei „Workflow Manager“ (darbo eigos tvarkyklė) bus pateiktas raginimas, atlikite vieną iš toliau nurodytų veiksmų.
 - Norėdami įkelti mėginių lapą, pasirinkite mėginių lapą, susietą su partija, tada pasirinkite **Load** (įkelti).
 - Norėdami taikyti sistemos numatytąsias vertes likusiems mėginių tipams, lyties nustatymo parinkčiai ar patikros tyrimo tipui, prie kiekvienos nuostatos pasirinkite parinktį **Use Default** (naudoti numatytąsias vertes).
Informacijos apie mėginių lapo kūrimą žr. 2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ programinės įrangos vadove (dokumento Nr. 1000000067940).
- Pasirinkite **Start** (pradėti), kad paleistumėte plokštelės denatūravimo laikmatį.
- Įdėkite antgalius į antgalių laikiklius, kaip nurodyta toliau.

Mėginių partijos dydis	Laikiklio tipas	Takelis	Elementas	Vietos padėtis
24, 48, 96	Patarimas	7–12	50 µl filtrų antgaliai	1

- Įdėkite denatūruotos bibliotekos plokštelę (brūkšninis kodas turi būti dešinėje) į „Multiflex“ laikiklį, kaip nurodyta toliau, tada pasirinkite **OK** (gerai).

Mėginių partijos dydis	Laikiklio tipas	Takelis	Elementas	Vietos padėtis
24, 48, 96	„Multiflex“	19–24	Denatūruotos bibliotekos plokštelė (su brūkšniniu kodu)	1

10. Įdėkite telkimo mėgintuvėlius į mėgintuvėlių laikiklį, kaip nurodyta toliau, tada pasirinkite **OK** (gerai).

Mėginių partijos dydis	Laikiklio tipas	Takelis	Elementas	Vietos padėtis
24, 48	Mėgintuvėlių	46	Naujas 2 ml mėgintuvėlis, „Pool A“ (A telkinys)	1
96	Mėgintuvėlių	46	Naujas 2 ml mėgintuvėlis, „Pool A“ (A telkinys)	1
			Naujas 2 ml mėgintuvėlis, „Pool B“ (B telkinys)	2

11. Įdėkite reagentų voneles į reagentų laikiklį, kaip nurodyta toliau, tada pasirinkite **OK** (gerai).

Mėginių partijos dydis	Laikiklio tipas	Takelis	Elementas	Vietos padėtis
24, 48, 96	Reagentų	47	3 ml hibridizacijos buferinio tirpalo	1

12. Įdėkite antgalius į antgalių laikiklius, kaip nurodyta toliau.

Mėginių partijos dydis	Laikiklio tipas	Takelis	Elementas	Vietos padėtis
24, 48, 96	Patarimas	49–54	1000 µl filtrų antgaliai	1
			300 µl filtrų antgaliai	2
			50 µl filtrų antgaliai	3

13. Įveskite kiekvieno antgalių stovo pirmojo ir paskutiniojo antgalių vietas, tada pasirinkite **OK** (gerai).

14. Įsitinkite, kad laikikliai, laboratoriniai įrankiai ir reagentai įkelti taip, kaip nurodyta.

15. Ekrane „Pooling Deck Verification“ (telkimo platformos patvirtinimas) pasirinkite **OK** (gerai).

16. Stebėkite ML STAR, kai atliekami automatizuoti veiksmai.

17. Įveskite komentarus apie paveiktus šulinėlius, tada pasirinkite **OK** (gerai).

18. Kai „Workflow Manager“ (darbo eigos tvarkyklė) paragins, įsitinkite, kad niekas netrukdo ML STAR įkėlimo platformai, kad ML STAR galėtų ištuštinti laikiklius.

19. Pasirinkite **Unload** (išimti), kad ištuštintumėte platformą.

20. Ištuštinkite mėgintuvėlių laikiklį.

21. Uždėkite dangtelius ant kiekvieno telkimo mėgintuvėlio, išmaišykite sūkuriniu maišytuvu ir trumpai centrifuguokite.

22. Pasirinkite **OK** (gerai).

23. Baigę telkimo procedūrą, kiek įmanoma greičiau sekvenuokite bibliotekas. Jei reikia, sandariai uždarykite bibliotekų plokštelę ir laikykite nuo -25 °C iki -15 °C temperatūroje iki 7 dienų, kad galėtumėte atlikti pakartotinį telkimą.

SAUGAUS SUSTOJIMO TAŠKAS

Jei norite sustoti, uždarykite telkimo mėgintuvėlius ir ne daugiau kaip 7 dienas laikykite juos nuo -25 °C iki -15 °C temperatūroje.

Sutelktų bibliotekų paruošimas sekoskaitos procedūrai**Paruošimas**

1. Paruoškite toliau nurodytus reagentus:

Reagentas	Laikymas	Instrukcijos
Telkinių mėgintuvėliai	Nuo -25 °C iki -15 °C	Jei plokštelė anksčiau buvo padėta saugoti, atšildykite ją kambario temperatūroje. Trumpai išmaišykite sūkuriniu maišytuvu. Trumpai centrifuguokite.

2. Paruoškite naujos kartos sekoskaitos sistemą užpildydami toliau pateiktus laukus „Local Run Manager“ „VeriSeq NIPT“ modulyje.
 - a. „Run Name“ (serijos pavadinimas)
 - b. **[Pasirinktinai]** Serijos aprašas
 - c. Telkinio brūkšninis kodas

**DĖMESIO**

Telkinio brūkšninis kodas, įvestas į „Local Run Manager“ modulį, turi sutapti su telkinio brūkšniniu kodu, įvestu į „Workflow Manager“ (darbo eigos tvarkytuvė). Analizės programinė įranga atmes netinkamas serijos konfigūracijas ir gali reikėti iš naujo atlikti sekoskaitos procedūrą.

Daugiau informacijos apie „Local Run Manager“ VeriSeq NIPT Module naudojimą rasite 2 v. „VeriSeq NIPT Solution“ programinės įrangos vadove (dokumento Nr. 1000000067940).

Procedūra

- Įdėkite toliau nurodytas eksploatacines medžiagas į reagentų kasetę, tada pipetuodami sumaišykite.
 - Hibridizacijos buferinis tirpalas (900 µl)
 - 450 µl „Pool A“ (A telkinys) (450 µl)
- Sekoskaitos instrukcijų žr. naujos kartos sekoskaitos prietaiso informaciniame vadove. Dėl „NextSeq 550Dx“ žr. „NextSeq 550Dx“ prietaiso informacinį vadovą (dokumento Nr. 1000000009513) (arba žr. atitinkamos pakuotės lapelį, kaip nurodyta „Illumina“ palaikymo puslapyje www.support.illumina.com).
- Paraginti patvirtinkite tinkamą serijų konfigūraciją.
- Jei reikia, pakartokite šią procedūrą naudodami B telkinį.
 - Norint pasiekti tikslinį klasterių tankį, bibliotekos plokštelę galima telkti pakartotinai sistemoje „Hamilton“ naudojant kitą telkimo koncentraciją. Vykdam pakartotinį telkimą pradinis telkinys nebegalioja.
 - Be to, norint pasiekti tikslinį klasterių tankį, telkinio santykį taip pat galima pakeisti į HT1 (450 µl + 900 µl).

Naujos kartos sekoskaita

2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ galima naudoti su naujos kartos sekoskaitos sistema, kurios specifikacijos nurodytos toliau:

- 2 x 36 pagal galą suporuotų nuskaitymų atlikimas;
 - suderinamas su indeksavimo adapteriais „VeriSeq NIPT Sample Prep Kit“;
 - du cheminių medžiagų kanalai;
 - automatinis BCL (*.bcl) failų (neapdorotų sekoskaitos įrenginio duomenų) kūrimas;
 - 400 mln. suporuotų pagal galą nuskaitymų per seriją;
 - suderinamumas su 2 versijos „VeriSeq NIPT“ tyrimo programine įranga
- „NextSeq 550Dx“ yra suderinamas su 2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“

Sekoskaitos duomenų analizė

Atlikus sekoskaitą, sekoskaitos duomenys automatiškai siunčiami į 2 versijos „VeriSeq NIPT“ tyrimo programinę įrangą, kad būtų galima atlikti analizę ir sugeneruoti ataskaitą. Ataskaitoje pateikiama kiekvieno partijos mėginio klasifikacija, taip pat visos serijos KK metrikos įvertinimo duomenys. Analizės procesas nuo sekoskaitos baigimo iki galutinių rezultatų pateikimo trunka maždaug 4 valandas, tiriant 48 mėginių partiją. Išsamesnės informacijos apie duomenų analizę ir išvesties failą žr. 2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ programinės įrangos vadove (dokumento Nr. 1000000067940).

Rezultatų interpretavimas

2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ algoritmas naudoja sudėtingą statistinį modelį, kuriame derinama skirtingų tipų informacija iš pagal galą suporuotų nuskaitymų sekoskaitos bibliotekos fragmentų rinkinio. Šis modelis naudojamas siekiant aptikti genomo sritis, kuriose yra trūkumas arba perteklius, remiantis kiekvieno mėginio biblioteka. Svarbu, kad šis modelis atsižvelgia į tai, ar trūkumo arba pertekliaus lygis kiekybiškai atitinka aneuploidijos įvykį vaisiaus genome apskaičiuotu bibliotekos vaisiaus frakcijos lygiu.

Visų chromosomų suporuotų pagal galą sekoskaitos duomenys yra prilygiuojami referentiniam genomui (HG19). Unikalus neduplikuoti prilygiuoti nuskaitymai yra agreguojami į 100 kb dėklus. Atitinkamiems dėklų skaičiams pritaikomas GC tendencingumas ir jie sureguliuojami pagal anksčiau nustatytą konkrečios genomo srities aprėptį. Naudojant šiuos normalizuotus dėklų skaičius, statistiniai įverčiai išvedami kiekvienai autosomai palyginant aprėpties sritis, kurios gali būti paveiktos aneuploidijų, su likusiomis autosomomis. Logaritminio tikėtimumo santykis (LTS) skaičiuojamas kiekvienam mėginiui, atsižvelgiant į šiuos aprėptimi paremtus įverčius ir apskaičiuotą vaisiaus frakciją. LTS yra tikimybė, kad mėginys bus paveiktas, atsižvelgiant į nustatytą aprėptį ir vaisiaus frakciją, lyginant su tikimybe, kad mėginys bus nepaveiktas, atsižvelgiant į tą pačią nustatytą aprėptį. Šis santykis skaičiuojamas taip pat atsižvelgiant į numatytą vaisiaus frakcijos netikslumą. Tolesniems skaičiavimams naudojamas santykio natūrinis algoritmas. Tyrimo programinė įranga įvertina kiekvienos tikslinės chromosomos ir kiekvieno mėginio LTS, kad būtų galima nustatyti aneuploidiją.

Kurdami partiją, turite apibrėžti kiekvieno mėginio tipą (vienvaisis ar dvivaisis nėštumas), patikros tyrimo tipą (pagrindinės patikros ar viso genomo patikros) ir lytinių chromosomų nustatymo parinktį („Yes“ (taip), „No“ (ne) ir SCA). Nuo šių parinkčių priklauso, kokia informacija apie kiekvieną mėginį bus pateikta.

Nuo patikros tyrimo tipo priklauso, kokių autosomų anomalijų informacija bus pateikta tiriant visų tipų mėginius. Pasirinkus pagrindinės patikros tyrimo tipą, pranešama tik apie visos chromosomos trisomijos įvykius, susijusius su 13, 18 ir 21 chromosomomis. Pasirinkus viso genomo patikros tyrimo tipą, pranešama apie bet kokios autosomos chromosomos visos arba dalinės chromosomos iškritas ar duplikacijas. Mažiausias dalinės chromosomos iškritas ar duplikacijos, apie kurią pranešama, dydis yra 7 Mb.

Tiriant vienvaisio nėštumo mėginius galima išjungti lytinių chromosomų nustatymo parinktį. Taip pat galima sukonfigūruoti sistemą, kad ji pranešdama apie lytinių chromosomų aneuploidijas nurodytų euploidiniuose mėginiuose nustatytą lytį arba jos nenurodytų.

Tiriant dvivaisio nėštumo mėginius, pasirinkus lytinių chromosomų nustatymo parinktį „Yes“ (taip), pateikiant rezultatą nurodomas Y chromosomos buvimas arba nebuvimas bibliotekoje. Tiriant dvivaisio nėštumo mėginius negalima pateikti informacijos apie lytinių chromosomų aneuploidiją.

PASTABA Kai visų partijos mėginių lytis yra ta pati, el. paštu / per WebUI siunčiamas klaidos pranešimas įspės naudotoją, perspėdamas apie priemaišą / užteršimą. Partija bus pripažinta negaliojančia ir ataskaita nebus parengta. (Galioja „VeriSeq“ NIPT sprendimo 2 versijos 2.2 ir naujesnėms programinės įrangos versijoms.)

Rezultatas ANOMALY DETECTED (aptikta anomalija) nurodo, kad atliekant mėginio patikros tyrimą gautas teigiamas rezultatas dėl vienos arba kelių anomalijų, atsižvelgiant į pasirinktą patikros tyrimo tipą ir lytinių chromosomų nustatymo parinktį. Aptikus anomaliją, ataskaitoje pateikiama anomalijos suvestinė, pagrįsta citogenetinio tyrimo duomenimis.

2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ programinė įranga naudodama statistinius duomenis, sugeneruotus atliekant sekoskaitą, pateikia kiekvieno mėginio vaisiaus frakcijos vertę (FFE). FFE – tai apytikslis vaisiaus cfDNA komponentas, atkurtas tyrimo metu ir nurodomas kaip kiekvieno mėginio suapvalinta procentinė vertė. Šios vertės vidutinis standartinis nuokrypis vertinant visus mėginius yra 1,3 %. Pranešant apie rezultatus negalima atmesti mėginių remiantis vien tik FFE verte.

Kad galėtų vykdyti chromosomos padengimo priskyrimo procesą, 2 versijos „VeriSeq NIPT“ tyrimo programinė įranga naudoja individualizuotą vaisiaus aneuploidijos pasiklivimo testą (angl. „individualized Fetal Aneuploidy Confidence Test“, „iFACT“), t. y., dinamišką slenkstinės vertės metriką, kuri nurodo, ar sistema sugeneravo pakankamai sekoskaitos aprėpties duomenų, atsižvelgiant į kiekvieno mėginio vaisiaus frakcijos vertę. Neigiami priskyrimai pranešami tik tada, jei mėginys atitinka „iFACT“ slenkstinę vertę. Jei mėginys nepasiekia šios slenkstinės vertės, KK vertinimo ekrane rodoma FAILED iFACT („iFACT“ nepavyko) ir sistema nesugeneruoja rezultato.

Be „iFACT“, 2 versijos „VeriSeq NIPT“ tyrimo programinė įranga atlikdama analizę įvertina keletą kitų KK metrikų. Papildoma metrika apima padengimo vientisumo referentinio genomo srityse vertinimą ir cfDNR fragmentų ilgių pasiskirstymo vertinimą. Jei metrikos vertė nepatenka į priimtina diapazoną, KK vertinimo ekrane rodoma KK žyma arba KK klaida. Jei įvyksta KK klaida, sistema nesugeneruoja mėginio rezultato. Jei mėginys neatitinka KK reikalavimų, mėginį galima apdoroti iš naujo, jei kraujo mėginio surinkimo mėgintuvėlyje yra pakankamai plazmos.

2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ sugeneruoja duomenis, kuriuos galima naudoti galutinėje ataskaitoje. Ji nesugeneruoja galutinės pacientui skirtos ataskaitos. Klientai yra atsakingi už galutinės ataskaitos, kurią reikia pateikti gydytojui, dirbančiam paciento buvimo vietoje, formos sukūrimą ir turinį. „Illumina“ nėra atsakinga už klientams skirtos galutinės ataskaitos formuluotės tikslumą.



DĖMESIO

Patikrinkite visų mėginių vaisiaus frakcijos vertes. Jei visų serijos mėginių vaisiaus frakcijos vertės yra panašios, mėginiai galėjo susimaišyti ir dėl to galėjo pakisti rezultatai. Kreipkitės į „Illumina“ techninės pagalbos skyrių, kuris padės pašalinti triktį.

Veikimo charakteristikos

Tolesniuose klinikinio veiksmingumo ir analitinio veiksmingumo skyriuose pateikti duomenys sugeneruoti naudojant protokolus ir medžiagas, nurodytas naudojimo instrukcijoje, pradedant nuo plazmos. Visi šiame skyriuje nurodyti sekoskaitos duomenys sugeneruoti naudojant „NextSeq 500/550“ sekoskaitos sistemą arba „NextSeq 550Dx“ sekoskaitos sistemą ir taikant toliau nurodytas konfigūracijas:

	„NextSeq 500/550“	„NextSeq 550Dx“
Prietaiso programinė įranga	4.0 versijos „NextSeq“ valdymo programinė įranga	1.3 versijos „NextSeq“ operacinė programinė įranga
Reagentų rinkinio versija	2.5 versijos „NextSeq 500/550“ didelio našumo (75 ciklų) reagentų rinkinys	2.5 versijos „NextSeq 550Dx“ didelio našumo (75 ciklų) reagentų rinkinys
Sekoskaitos metodas	2 x 36 suporuotų pagal galą nuskaitymų sekoskaitos serija, vykdoma didelio našumo režimu	2 x 36 suporuotų pagal galą nuskaitymų sekoskaitos serija, vykdoma didelio našumo režimu

Klinikinis tyrimas

2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ klinikinis tikslumas nustatytas įvertinus plazmos mėginius, paimtus iš nėščiųjų, kurioms nustatytas vienvaisis arba dvivaisis nėštumas. Mėginiai gauti iš biobanke sukauptų anonimizuotų plazmos mėginių, kurie buvo gauti iš periferinio visos sudėties kraujo mėginių. Ieškant tyrimui tinkamų mėginių išanalizuota daugiau nei 45 000 mėginių. Šie mėginiai prieš tai buvo naudoti prenatalinės patikros tyrimams dėl vaisiaus chromosomų aneuploidijų ir 7 Mb ar didesnių dalių iškritų bei duplikacijų atlikti. Visi iš nėščiųjų paimti mėginiai, kuriuose nustatyta anomalija, ir nuosekliai paimtų mėginių, kuriuose anomalija nenustatyta, rinkinys buvo tinkami naudoti tyrimo tikslais, jei buvo pasiekiami klinikiniai rezultatai ir jei mėginiai atitiko kriterijus. Tyrimo analizės rinkinį sudarė iš viso 2 335 mėginiai. 2 328 šio rinkinio mėginiai buvo paimti iš nėščiųjų, kurioms nustatytas vienvaisis nėštumas, o septyni mėginiai paimti iš nėščiųjų, kurioms nustatytas dvivaisis nėštumas.

Iš šių mėginių 28 (1,2 %, 28 iš 2 335) mėginiai per pirmąjį bandymą neatitiko tyrimo KK kriterijų atliekant baigtos sekoskaitos duomenų analizę:

- 27 nepavykę „iFACT“ testai (vienas XO atvejis, 26 atvejais anomalija nenustatyta);
- vieno mėginio duomenys neatitiko numatyto diapazono.

Demografiniai duomenys ir nėštumo charakteristikos

Motinos amžiaus, gestacinio amžiaus ir nėštumo trimestro duomenys, susiję su viso genomo patikros tyrimo mėginiais, įskaitant mėginius su žinomais mozaikiškumo atvejais, apibendrinti [7 lentelė](#). Didžioji dalis (98 %) tiriamųjų mėginių yra pirmojo trimestro nėštumo mėginiai.

Buvo įvertinti pagrindinės patikros tyrimo ir viso genomo patikros tyrimo kohortų demografiniai rodikliai ir statistinio skirtumo nenustatyta. Demografiniai duomenys ir nėštumo charakteristikos buvo panašūs neatsižvelgiant į tai, ar buvo įtraukti žinomi mozaikiškumo atvejai, ar ne.

7 lentelė Demografiniai duomenys ir nėštumo charakteristikos

Statistiniai suvestinės rodikliai	Visas genomas (įtraukiant žinomus mozaikiškumo atvejus)
Mėginių skaičius	2 307*
Motinos amžius – metai	
Vidurkis	35,08
Standartinis nuokrypis	4,04
Mediana	34,95
25-asis procentilis, 75-asis procentilis	32,31, 37,79
Mažiausias, didžiausias	20,22, 53,02
Gestacinis amžius kraujo mėginio paėmimo metu – savaitės	
Vidurkis	10,93
Standartinis nuokrypis	1,20
Mediana	10,57
25-asis procentilis, 75-asis procentilis	10,29, 11,14
Mažiausias, didžiausias	10,00, 27,86
Nėštumo trimestras – skaičius (%)	
< Pirmasis (<14 savaičių)	2252 (98 %)
Antrasis	54 (2 %)
Trečiasis (≥27 savaitės)	1 (0 %)

* Į galutinį mėginių skaičių įtraukti 7 dvivaisio nėštumo mėginiai.

Klinikinis veiksmingumas

Naudojant 2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ gauti rezultatai buvo palyginti su klinikinio pamatinio etalono rezultatais. Visų tyrimo mėginių rezultatai atitiko klinikinio pamatinio etalono rezultatus (vadinamus klinikinėmis tiesomis, angl. „clinical truth“), susijusius su vaisiaus chromosomos aneuploidijos būkle ir 7 Mb ar didesnėmis dalinėmis iškritomis bei duplikacijomis. Į šį tyrimą įtrauktų mėginių klinikinio pamatinio etalono rezultatai

priklausė nuo chromosomų analizės arba naujagimio fizinės apžiūros, kai naudojant NGS sistemą atlikto NIPT patikros tyrimo rezultatas neigiamas, rezultatų. Kvalifikuotas tyrimo personalas klasifikavo klinikinio pamatinio etalono duomenis pagal užsakovo pateiktą medicininių kodų dokumentą.

Chromosomų analizės metodai apėmė kariotipavimą, fluorescencinę in situ hibridizaciją (FISH) ir lyginamosios genomo hibridizacijos chromosomų mikromatricą (CMA). Chromosomų analizė atlikta naudojant naujagimio ar kūdikio periferinį kraują ar seiles, pastojimo darinių (POC) mėginius, amniocitus, choriono gaurelius, placentos audinius arba postnatalinės virkštelės kraują.

Mozaikiškumas apibrėžiamas kaip dviejų ar daugiau skirtingos chromosomų sandaros ląstelių linijų buvimas organizme. Ląstelių linijos išsivysto iš tos pačios zigotos. Mozaikiškumo tipas bei lygis skiriasi ir priklauso nuo mozaikiškumo įvykių atsiradimo laiko embriogenezės ir vaisiaus raidos etapais. Atliekant prenatalinės diagnostikos tyrimus nustatoma įvairių mozaikiškumo tipų, atsižvelgiant į nenormalių ir normalių ląstelių linijų pasiskirstymą citotrofoblastuose, mezenchimoje arba vaisiuje.¹⁰ Nors mozaikiškumas gali būti aptiktas esant bet kokiai chromosomos anomalijai, mozaikiškumas dažniau paplitęs retų trisomijų atveju nei 21, 18 ir 13 chromosomų trisomijos (T21, T18 ir T13) atvejais.¹¹ Atliekant veiksmingumo įvertinimą mozaikiškumo atvejai buvo įtraukti į viso genomo analizę, nes šio patikros tyrimo tipo tikslas yra aptikti retas autosominės aneuploidijas (RAA).

Pagrindinės patikros tyrimo veiksmingumas

Pagrindinės patikros tyrimas apima T21, T18 ir T13 anomalijų tyrimą. Į analizę iš viso įtraukti 2 243 vienvaisio nėštumo ir dvivaisio nėštumo mėginiai. Visais septyniais dvivaisio nėštumo atvejais buvo teisingai nustatyta T21 ir šie atvejai nepateikiami toliau esančioje lentelėje.

8 lentelė 2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ jautrumas ir specifiškumas aptinkant 21, 18 ir 13 chromosomų trisomijas atliekant moterų, kurioms nustatytas vienvaisis nėštumas, pagrindinės patikros tyrimą (neįtraukiant žinomų mozaikiškumo atvejų)

	T21	T18	T13
Jautrumas	>99,9 % (130 iš 130)	>99,9 % (41 iš 41)	>99,9 % (26 iš 26)
Dvipusis 95 % pasikliautinis intervalas	97,1 %, 100 %	91,4 %, 100 %	87,1 %, 100 %
Specifiškumas	99,90 % (1982 iš 1984)	99,90 % (1995 iš 1997)	99,90 % (2000 iš 2002)
Dvipusis 95 % pasikliautinis intervalas	99,63 %, 99,97 %	99,64 %, 99,97 %	99,64 %, 99,97 %

Tyrimo veiksmingumas atliekant pagrindinės patikros tyrimą, kaip parodyta 8 lentelė, apskaičiuotas neįtraukiant 64 mėginių, kuriuose nustatytos RAA, autosominės dalinės iškritos ar duplikacijos ar žinomi mozaikiškumo atvejai, grupės. Šie 64 mėginiai apėmė aštuonis T21 ir tris T18 mozaikiškumo atvejus. Penki iš šių 11 mėginių buvo identifikuoti kaip paveikti anomalijos, aptiktos naudojant 2 versijos „VeriSeq NIPT“ tyrimo programinę įrangą.

Viso genomo patikros tyrimo veiksmingumas

Viso genomo patikros tyrime bet kokia anomalija apima trisomijas, monosomijas ir 7 Mb ar didesnes dalines iškritas ar duplikacijas. Viso genomo patikros tyrimo mėginius sudarė 36 mėginiai, kuriuose nustatytas mozaikiškumas. Iš viso tirti 2 307 vienvaisio nėštumo ir dvivaisio nėštumo mėginiai. Visais septyniais dvivaisio nėštumo atvejais buvo teisingai nustatyta 21 chromosomos anomalija ir šie rezultatai nepateikiami toliau esančiose lentelėse.

Viso genomo patikros tyrimo veiksmingumas nustatant bet kokią anomaliją

9 lentelė 2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ jautrumas ir specifiškumas aptinkant bet kokią anomaliją atliekant viso genomo patikros tyrimą (įtraukiant žinomus mozaikiškumo atvejus)

	Jautrumas	Specifiškumas
Įvertis, % (n/N)	95,5 % (318 iš 333)	99,34 % (1954 iš 1967)
Dvipusis 95 % pasikliautinis intervalas	92,7 %, 97,3 %	98,87 %, 99,61 %

Viso genomo patikros tyrimo veiksmingumas aptinkant retą autosominę aneuploidiją

10 lentelė 2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ jautrumas ir specifiškumas aptinkant retą autosominę aneuploidiją (RAA) atliekant viso genomo patikros tyrimą (įtraukiant žinomus mozaikiškumo atvejus)

	Jautrumas	Specifiškumas
Įvertis, % (n/N)	96,4 % (27 iš 28)	99,80 % (2001 iš 2005)
Dvipusis 95 % pasikliautinis intervalas	82,3 %, 99,4 %	99,49 %, 99,92 %

Viso genomo patikros tyrimo veiksmingumas nustatant dalines iškritas ir duplikacijas

11 lentelė 2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ jautrumas ir specifiškumas aptinkant 7 Mb ar didesnes dalines iškritas ir duplikacijas atliekant viso genomo patikros tyrimą (įtraukiant žinomus mozaikiškumo atvejus)

	Jautrumas	Specifiškumas
Įvertis, % (n/N)	74,1 % (20 iš 27)	99,80 % (2000 iš 2004)
Dvipusis 95 % pasikliautinis intervalas	55,3 %, 86,8 %	99,49 %, 99,92 %

Veiksmingumo skirtumai tarp pagrindinės patikros ir viso genomo patikros tyrimų

Pagrindinės patikros ir viso genomo patikros tyrimuose naudojama vienoda dažniausiai pasitaikančių trisomijų ir lytinių chromosomų aneuploidijų verčių nustatymo metodologija. Atliekant pagrindinės patikros tyrimą algoritmas taikomas tik T21, T18 ir T13. Tačiau atliekant viso genomo patikros tyrimą ši metodologija padeda

įvertinti visas trisomijas, RAA ir dalines duplikacijos bei iškritas.

Aprašyti du su veiksmingumu susiję skirtumai tarp pagrindinės patikros ir viso genomo patikros tyrimų. Pirmiausia, atliekant viso genomo patikros tyrimą, mėginiai, kuriuose nustatytas žinomas mozaikiškumas dažnai pasitaikančių trisomijų, RAA ir dalinių iškritų bei duplikacijų atveju, buvo įtraukti į veiksmingumo metriką. Antra, atliekant viso genomo patikros tyrimą visos chromosomos trisomijos atveju gali būti pranešta apie dalinę duplikaciją arba iškritą. Be dalinės duplikacijos ar iškritos, visos chromosomos trisomijos buvimą nurodo LTS vertė, pateikta papildomoje ataskaitoje.

Mozaikiškumo atvejų įtraukimas į viso genomo patikros tyrimą

Mozaikiškumas nurodomas kaip šio tyrimo apribojimas. Jei yra mozaikiškumas, vaisiaus anomalijos signalas yra silpnesnis, todėl jį gali būti sunkiau aptikti bendro tyrimo specifiškumo ribose. Tačiau, kadangi mozaikiškumas yra labiau susijęs su išplėstinio turinio tyrimais, mėginiai, kuriuose nustatytas mozaikiškumas, buvo įtraukti į viso genomo patikros tyrimą.

Iš 64 mėginių, kurie buvo įtraukti į viso genomo patikros, bet ne pagrindinės patikros, tyrimą, 36 mėginiuose mozaikiškumas buvo nustatytas pagal klinikinį pamatinį etaloną. Iš šių 36 mėginių 23 priskyrimai atitiko klinikinį pamatinį etaloną.

Dalinės iškritos ar duplikacijos ir visos chromosomos aneuploidijos aptikimo palyginimas

2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ pateikia meniu parinkčių, skirtų pagrindinės patikros tyrimui ir viso genomo patikros tyrimui. Atliekant pagrindinės patikros tyrimą, rezultatas ANOMALY DETECTED (aptikta anomalija) pateikiamas tik tada, jei 21, 18 ar 13 chromosomoje aptinkama visos chromosomos aneuploidija ir jei patenkinami visi kokybės kontrolės metrikos kriterijai. Atliekant viso genomo patikros tyrimą, sistema aptinka aneuploidiją visose autosomose ir bent 7 Mb dydžio dalinių iškritų ir duplikacijų įvykius.

Atliekant viso genomo patikros tyrimą, tais atvejais, kai pranešama apie visos chromosomos įvykį, taip pat kai CNV įvykis toje pačioje chromosomoje viršija LLS slenkstį, sistema praneša apie dalinės iškritos ar duplikacijos įvykį, užuot atlikusi visos chromosomos priskyrimą, jei dalinės iškritos ar duplikacijos dydis yra iki 75 % chromosomos, kurioje aptiktas įvykis, dydžio. Jei aptikta dalinės iškritos ir duplikacijos sritis apima daugiau nei 75 % chromosomos dydžio, įvykis užregistruojamas kaip visos chromosomos trisomija arba visos chromosomos monosomija, jei tuo pačiu metu viršijama visos chromosomos LTS slenkstinė vertė. Dėl to gana didelės iškritos ir duplikacijos, kurios yra mažesnės arba lygios 75 % chromosomos dydžio, gali reikšti visos chromosomos aneuploidiją.

Papildomoje ataskaitoje pateikta visų mėginių visos chromosomos klasifikacijos LTS vertė. Prieš interpretuojant rezultatą, LTS vertę reikia peržiūrėti atsižvelgiant į ribinę vertę, nurodytą [95 % aptikimo tikimybė vidutinio dydžio srityse pagal dydį naudojant 2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ 60 psl.](#) Pavyzdžiui, CNV iškvietimas, kai chromosomos lygio LTS vertės, viršijančios ribinę vertę, leidžia toliau pagrįsti aiškinimą, patvirtinantį visos chromosomos aneuploidiją, kaip pavyzdį žr. [12 lentelė](#)

Klinikiniame tyrime buvo du vienvaisio nėštumo mėginiai, kuriuose buvo gana didelės duplikacijos (viena 21 chromosomoje ir viena 18 chromosomoje), kurios nesiekė 75 % santykinio chromosomos dydžio (žr. 12 lentelė). Abu įvykiai buvo užregistruoti kaip tos chromosomos dalinės duplikacijos, o ne kaip visos chromosomos trisomija. Šių įvykių LTS vertės viršijo ribinę vertę ir atitiko visos chromosomos trisomijos rezultatą. Dalinės duplikacijos ar visos chromosomos trisomijos priskyrimo atveju toliau apdorojant teigiamą NIPT priskyrimą siūloma atlikti patvirtinamąjį paciento testavimą atliekant prenatalinę diagnostiką.

12 lentelė Didelių duplikacijos įvykių, identifikuotų atliekant viso genomo patikros tyrimą, pavyzdžiai

	Klinikinė tiesa	Viso genomo tyrimo sistemos rezultatas	Anomalijos dydis (Mb)	Chromosomos dydžio dalis, %	LTS vertės
1 mėginys	21 chromosomos trisomija vienvaisio nėštumo atveju	Dalinė duplikacija 21 chromosomoje	22,50	48,9	19,43
2 mėginys	18 chromosomos trisomija vienvaisio nėštumo atveju	Dalinė duplikacija 18 chromosomoje	47,00	60,2	12,99

Papildomos informacijos apie kokybės kontrolės metriką, naudojamą aneuploidijos rezultatams pateikti, žr. 2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ programinės įrangos vadove (dokumento Nr. 1000000067940).

Lytinės chromosomos

Naudojant 2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ gauti lytinių chromosomų rezultatai buvo palyginti su klinikinio pamatinio etalono rezultatais. Gauti duomenys apibendrinti toliau pateiktoje lentelėje. Apskaičiuota kiekvienos lytinės chromosomos atitikties procentinė vertė pagal kiekvieną klinikinio pamatinio etalono rezultatą. Atitikties procentinė vertė apskaičiuota padalijant mėginių, kuriuose naudojant 2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ nustatytas lytinės chromosomos priskyrimas atitiko klinikinio pamatinio etalono klasifikaciją, skaičių iš viso mėginių skaičiaus pagal tą pačią klinikinio pamatinio etalono klasifikaciją.

13 lentelė Vaisiaus lyties klasifikacijos atitikties procentinė vertė*

Vaisiaus lyties klasifikacija		Fenotipas, nustatytas atliekant fizinę naujagimio apžiūrą		Citogenetinio tyrimo rezultatai							
Aptikta	Kariotipas	Moteriškoji lytis	Vyriškoji lytis	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY	Kita**	Nėra
Anomalija neaptikta	XX	997	0	21	0	2	0	0	0	0	0
Anomalija neaptikta	XY	0	966	0	15	0	0	0	0	0	1
Aptikta anomalija	XO	0	0	0	0	19	0	0	1	0	0
Aptikta anomalija	XXX	0	0	0	0	0	17	0	0	1	0

Vaisiaus lyties klasifikacija		Fenotipas, nustatytas atliekant fizinę naujagimio apžiūrą		Citogenetinio tyrimo rezultatai							
Aptikta	Kariotipas	Moteriškoji lytis	Vyriškoji lytis	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY	Kita**	Nėra
Aptikta anomalija	XXY	0	0	0	0	0	0	23	0	1	0
Aptikta anomalija	XYY	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0
Iš viso		997	966	21	15	21	17	23	12	2	1
Atitikties procentinė vertė		100	100	100	100	90,5	100	100	91,7	Netai-koma	Netai-koma

* Penkiais dvivaisio nėštumo atvejais buvo teisingai nustatytas Y chromosomos buvimas. Dviem atvejais teisingai nustatytas Y chromosomos nebuvimas.

** Kiti citogenetinio tyrimo rezultatai buvo XXXXX ir XYY.

2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ prognozinė teigiamojo testo vertė ir prognozinė neigiamojo testo vertė

Prognozinė teigiamojo testo vertė (PTTV) ir prognozinė neigiamojo testo vertė (PNTV) pateikia informacijos apie tyrimo gebėjimą pateikti klinišnius sprendimus remiantis testo jautrumu, specifiškumu ir numatoma tikimybe, kad vaisius yra paveiktas trisomijos (paplitimo duomenimis). Kadangi PTTV ir PNTV priklauso nuo paplitimo, o šių aneuploidijų paplitimas varijuoja skirtingose subjektų populiacijose, PTTV ir PNTV buvo apskaičiuotos imant tikėtinų paplitimo verčių intervalą, remiantis jautrumo ir specifiškumo vertėmis, stebėtomis atliekant klinišinio tikslumo tyrimo pagrindinės patikros tyrimą (neįtraukiant žinomų mozaikiškumo atvejų). [17 lentelė](#) duomenys pagrįsti viso genomo patikros tyrimu (įtraukiant žinomo mozaikiškumo atvejus).

14 lentelė 21 chromosomos trisomijos paplitimas, PTTV ir PNTV atliekant pagrindinės patikros tyrimą (neįtraukiant žinomų mozaikiškumo atvejų)

Paplitimas (%)	PTTV (%)	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

15 lentelė 18 chromosomos trisomijos paplitimas, PTTV ir PNTV atliekant pagrindinės patikros tyrimą (neįtraukiant žinomų mozaikiškumo atvejų)

Paplitimas (%)	PTTV (%)	PNTV (%)
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

16 lentelė 13 chromosomos trisomijos paplitimas, PTTV ir PNTV atliekant pagrindinės patikros tyrimą (neįtraukiant žinomų mozaikiškumo atvejų)

Paplitimas (%)	PTTV (%)	PNTV (%)
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

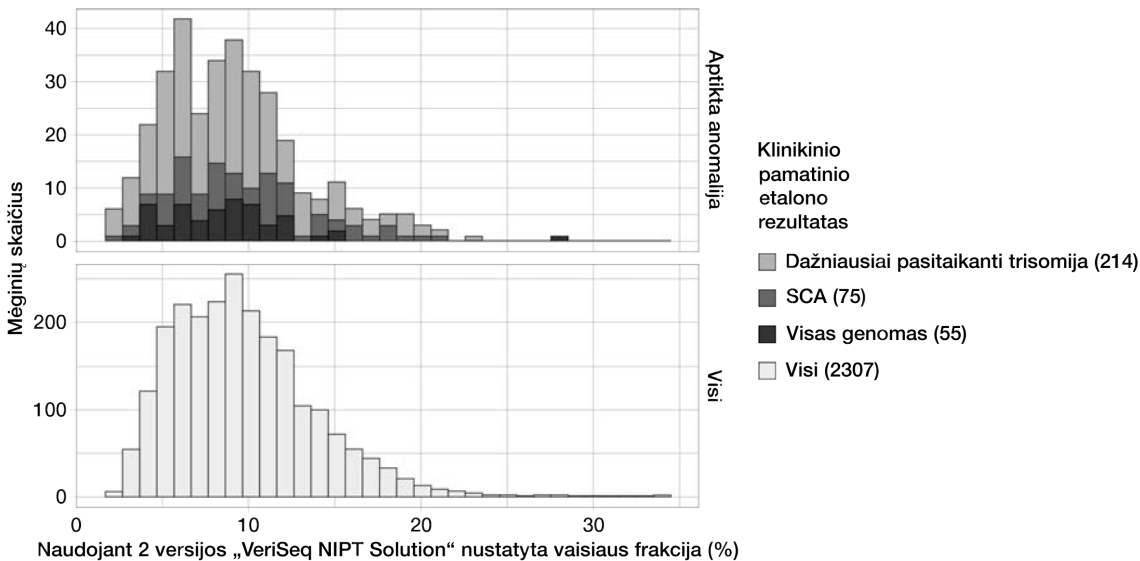
17 lentelė Bet kokios anomalijos paplitimas, PTTV ir PNTV atliekant viso genomo patikros tyrimą (įtraukiant žinomus mozaikiškumo atvejus)

Paplitimas (%)	PTTV (%)	PNTV (%)
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

Vaisiaus frakcijos pasiskirstymas

2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ vaisiaus frakcijos (FF) verčių, gautų atliekant viso genomo patikros tyrimą, apimančių mozaikiškumo atvejus, pasiskirstymas parodytas 1 pav. klinikinio pamatinio etalono rezultato kategorijoje.

1 pav. Vaisiaus frakcijos pasiskirstymas



5 mėginiuose nustatyta įvairių kategorijų anomalijų.

Dažnai pasitaikanti trisomija – šis rezultatas apima mėginius, kuriuose aptikta 21, 18 ir (arba) 13 chromosomos trisomija.

Visas genomas – šis rezultatas apima mėginius, kuriuose aptikta RAA arba dalinės iškritos ir (arba) duplikacijos.

FF vertės varijuoja nuo 2 % iki 34 %, mediana – 9 %, tarpkvantilinis (IQ) intervalas – nuo 6 % iki 12 %. Dažniausiai pasitaikančių trisomijų ir įvykių, aptiktų viso genomo patikros tyrimu, FF vertės mediana yra 8 %, o SCA atveju – 9 %. FF verčių intervalas buvo nuoseklus visų rezultatų atveju. Akivaizdus FF pasiskirstymo poslinkio tarp dažniausiai pasitaikančių trisomijų, SCA, viso genomo patikros tyrimu aptiktų įvykių ar visų mėginių, naudotų atliekant viso genomo analizę, nėra.

Veiksmingumas dvivaisio nėštumo atveju

13, 18 ir 21 chromosomų trisomijos ir Y chromosomos nustatymo veiksmingumas dvivaisio nėštumo atveju

Dėl mažo 21, 18 ir 13 chromosomų trisomijos paplitimo dvivaisio nėštumo atveju klinikiniam tyrimui iširta nedaug dvivaisio nėštumo mėginių, kuriuose aptikta anomalija. Siekiant įvertinti 2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ veiksmingumą dvivaisio nėštumo atveju, buvo sukurti *in silico* modeliai, pagrįsti stebėjimo duomenimis, gautais iš klinikinių mėginių, siekiant sumodeliuoti dvivaisio nėštumo populiacijas. Minėtas modelis sukurtas atsižvelgiant į numatytą populiaciją. Vaisiaus frakcijos pasiskirstymas nustatytas ištyrus apytiksliai 4 500 dvivaisio nėštumo mėginių ir palygintas su pasiskirstymu, nustatytu ištyrus apytiksliai 120 000 vienvaisio nėštumo mėginių. Vaisiaus frakcijos pasiskirstymas, priklausantis nuo aneuploidijos būklės, nustatytas remiantis

vienvaisio nėštumo mėginių spėjamais priskyrimais (21 chromosomos trisomija – 1 044, 18 chromosomos trisomija – 307, 13 chromosomos trisomija – 192). Apibendrinus šių dviejų pasiskirstymų duomenis buvo galima padaryti išvadas dėl aneuploidijų aptikimo dvyniuose. Buvo sumodeliuoti dizigotinių ir monozigotinių dvynių rinkiniai ir buvo paimtas svertinis vidurkis, atspindintis jų paplitimą numatytoje populiacijoje (dizigotinių ir monozigotinių dvynių santykis yra 2:1) siekiant įvertinti jautrumą. Specifiškumo nustatymo tikslais buvo sumodeliuoti dvynių, kuriems nenustatyta anomalijų, rinkiniai.

Kiekvieno sumodeliuoto mėginio, kuriame nustatyta trisomija, frakcija (t. y. paveikta frakcija) apskaičiuota skirtingai pagal kiekvieną mėginių kategoriją, kaip nurodyta toliau.

- Monozigotinių dvynių atveju kiekvieno mėginio paveikta frakcija buvo nustatyta kaip 1,0, nes šiuo atveju trisomija paveikia abu vaisius.
- Dizigotinių dvynių atveju buvo daroma prielaida, kad tik vienas iš dvynių yra paveiktas (trisomija abiem dizigotiniams dvyniams nustatoma itin retais atvejais). Paveiktos frakcijos vertės sumodeliuotos remiantis žinomu vaisiaus frakcijos santykio pasiskirstymu, kaip nustatyta tiriant įvairių lyčių dvynių klinikinius mėginius. Laikytasi konservatyvaus požiūrio ir daroma prielaida, kad dvynio, kuriam nustatyta trisomija, vaisiaus frakcija visada yra mažesnė. Vaisiaus frakcijoms, kurios buvo vidutiniškai mažesnės 13 ir 18 chromosomų trisomijos atvejais, buvo taikomas pataisos faktorius.
- Jei dvyniams trisomija nenustatyta, buvo nustatyta nulinė kiekvieno mėginio paveiktos frakcijos vertė.

Jei dvyniams nustatyta 18 arba 13 chromosomos trisomija, vaisiaus frakcija, atitinkanti mėginio paveiktą frakciją, buvo sumažinta. Sumažinimas buvo proporcingas vaisiaus frakcijos sumažinimo vidurkiui, stebėtam klinikiniuose duomenyse, susijusiuose su 18 ar 13 chromosomos trisomija vienvaisio nėštumo atvejais, palyginti su vienvaisio nėštumo atvejais, kuriuose nustatyta euploidija.

Kiekvieno sumodeliuoto mėginio bendra vaisiaus frakcija ir paveikta frakcija buvo naudojamos siekiant apskaičiuoti aneuploidijos vertę naudojant standartinį 2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ algoritmą. Jautrumas apskaičiuotas nustatant, kaip dažnai sumodeliuotų paveiktų dvynių aneuploidijos vertės viršijo atitinkamą aneuploidijos ribinę vertę. Atitinkamai specifiškumas apskaičiuotas nustatant, kaip dažnai sumodeliuotų nepaveiktų dvynių aneuploidijos vertės nesiekė atitinkamos aneuploidijos ribinės vertės (**18 lentelė**). 95 % pasikliautinieji intervalai nustatyti remiantis tikrų klinikinių dvynių mėginių, kurie buvo klasifikuoti kaip paveikti arba nepaveikti atitinkamos trisomijos, skaičiumi pradiniam duomenų rinkinyje.

Siekiant apskaičiuoti Y chromosomos nustatymo jautrumą dvynių mėginiuose, buvo sumodeliuoti XY/XY ir XX/XY dvynių rinkiniai. Buvo taikomas svertinis vidurkis, atspindintis jų paplitimą numatytoje populiacijoje (1 XY/XY:1 XX/XY). Siekiant nustatyti Y chromosomos nustatymo specifiškumą dvyniuose, buvo sumodeliuotas XX/XX dvynių rinkinys. Bendros vaisiaus frakcijos vertės buvo sumodeliuotos remiantis žinomu vaisiaus frakcijos pasiskirstymu klinikiniuose dvynių mėginiuose.

XY/XY ir XX/XY dvynių atveju atitinkamos Y chromosomos vertės buvo apskaičiuotos remiantis žinomu ryšiu tarp vaisiaus frakcijos ir Y chromosomos verčių klinikiniuose vienvaisio nėštumo mėginiuose, kuriuose vaisius klasifikuojamas kaip vyriškosios lyties. Tik XX/XY dvynių atveju buvo modeliuojamos paveiktos (t. y. vyriškosios lyties) vaisiaus frakcijos vertės, remiantis žinomu vaisiaus frakcijos santykio, stebėto tarp dvynių (to paties nėštumo), pasiskirstymu, kaip nustatyta tiriant įvairių lyčių dvynių klinikinius mėginius. Laikytasi konservatyvaus požiūrio ir buvo pasirinkta paveikta frakcija, atitinkanti mažesnę vieno iš dvynių frakciją. Kiekvieno sumodeliuoto XX/XY mėginio Y chromosomos vertė buvo padauginta iš paveiktos frakcijos.

XX/XX dvynių atveju Y chromosomos vertės buvo gautos iš verčių, stebėtų klinikiniuose vienvaisio nėštumo mėginiuose, kuriuose vaisius klasifikuojamas kaip moteriškosios lyties. Tada standartinis 2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ algoritmas naudodamas Y chromosomos vertę ir bendros vaisiaus frakcijos vertę kiekvieną sumodeliuotą mėginį klasifikavo kaip turintį Y chromosomą arba neturintį Y chromosomos.

Jautrumas apskaičiuotas nustatant, kaip dažnai sumodeliuoti XY/XY arba XX/XY dvyniai buvo teisingai klasifikuoti kaip turintys Y chromosomą. Specifiškumas apskaičiuotas nustatant, kaip dažnai sumodeliuoti XX/XX dvyniai buvo teisingai klasifikuoti kaip neturintys Y chromosomos. 95 % pasikliautinieji intervalai apskaičiuoti remiantis tikrų klinikinių dvynių mėginių, kurie buvo klasifikuoti kaip turintys Y chromosomą arba neturintys Y chromosomos, skaičiumi pradiniam duomenų rinkinyje.

18 lentelė 21, 18 ir 13 chromosomų trisomijos nustatymo sumodeliuotoje dvynių populiacijoje įverčiai

	21 chromosomos trisomija	18 chromosomos trisomija	13 chromosomos trisomija	Y chromosomos buvimas
Jautrumas	96,4 %	95,7 %	93,6 %	>99,9 %
Dvipusis 95 % pasikliautinis intervalas	(86,4 %, 98,9 %)	(68,3 %, 99,4 %)	(64,1 %, 98,9 %)	(99,9 %, >99,9 %)
Specifiškumas	99,9 %	>99,9 %	>99,9 %	>99,9 %
Dvipusis 95 % pasikliautinis intervalas	(99,8 %, >99,9 %)	(99,9 %, >99,9 %)	(99,9 %, >99,9 %)	(99,7 %, >99,9 %)

18 lentelė pateikiami taškiniai įverčiai ir apskaičiuoti jautrumo ir specifiškumo 95 % pasikliautinieji intervalai, kai 2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ naudojamas 21, 18 ir 13 chromosomų trisomijai bei Y chromosomos buvimui aptikti sumodeliuotoje dvivaisio nėštumo populiacijoje, atsižvelgiant į numatytą populiaciją. Pasikliautinieji intervalai apskaičiuoti remiantis KK reikalavimus atitinkančių klinikinių dvynių mėginių, kurie klasifikuojami kaip paveikti arba nepaveikti atitinkamos trisomijos, skaičiumi. Apskaičiuojant jautrumą daroma prielaida, kad du trečdaliai paveiktų dvivaisio nėštumo atvejų yra dizigotiniai dvyniai, iš kurių vienas iš dvynių yra paveiktas, o vienas trečdalis paveiktų dvivaisio nėštumo atvejų yra monozigotiniai dvyniai ir jie abu yra paveikti trisomijos.

18 lentelė pateikti įverčiai susiję tik su dvivaisio nėštumo atvejais. Dėl itin mažo paplitimo nepakako daugiavaisio nėštumo, kai vystosi trys ar daugiau embrionų, duomenų, kad būtų galima nustatyti atitinkamus statistinius modelius, leidžiančius apskaičiuoti aneuploidijos aptikimo tikslumą.

Analitinis veiksmingumas

Tikslumas

Siekiant įvertinti ir kiekybiškai nustatyti tyrimo tikslumą, naudojant 2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ analizės procedūros programinę įrangą, buvo atlikta kartotinė dviejų toliau nurodytų ankstesnių tyrimų, atliktų naudojant „VeriSeq NIPT Solution“, duomenų analizė:

- tarplaboratorinio atkuriamumo tyrimas – trys operatoriai vykdė tris serijas trijose laboratorijose naudodami vieną reagentų partiją (iš viso devynios serijos);
- laboratorinio tikslumo nustatymo tyrimas – vienoje laboratorijoje vykdyta 12 serijų naudojant du ML STAR įrenginius, dvi sekoskaitos prietaiso sistemas ir tris sekoskaitos reagentų partijas.

Tikslumo nustatymo tyrimo tikslas buvo kiekybiškai nustatyti tyrimo tikslumą aptinkant 21 chromosomos trisomiją (T21) ir Y chromosomą bei įvertinti kintamumą naudojant skirtingus prietaisus, bibliotekos paruošimo rinkinius ir sekoskaitos reagentų partijas. Atliekant tyrimus atkuriamumas pirmiau neaprašytais sąlygomis nebuvo vertinamas.

5 % vaisiaus frakcijos T21 telkinys sukurtas naudojant cfDNR, išskirtą iš nėščių moterų plazmos (kai nustatyta vaisiaus T21), ir cfDNR, išskirtą iš ne nėščių moterų plazmos. Taip pat buvo sukurtas 10 % vyriškosios lyties (vaisiaus kariotipas – XY), kaip nustatyta iš motinos plazmos, vaisiaus frakcijos cfDNR telkinys. Kiekvienos serijos kiekvieno tyrimo mėginių grupę sudarė keturios 5 % vaisiaus frakcijos mėginių, kuriuose nustatyta T21, telkinio replikacijos ir dvidešimt 10 % vyriškosios lyties, kaip nustatyta iš motinos plazmos, vaisiaus frakcijos cfDNR telkinio replikacijų. Tyrimai buvo atliekami 10 dienų, abiejuose tyrimuose bendrai atlikta 21 serija.

Buvo nuspręsta įvertinti T21 ir Y chromosomos buvimą remiantis klinikinių būklių reprezentatyvumu ir anomalijos aptikimo sudėtingumu. 21 chromosoma yra mažiausia žmogaus autosoma, todėl jos dydis daro tiesioginę įtaką T21 aptikimo jautrumui, ypač esant mažoms vaisiaus frakcijos vertėms, pvz., tokioms, kokios naudojamos šiame tyrime. Y chromosoma, aptinkama motinos plazmoje, yra išskirtinai vaisiaus kilmės chromosoma, todėl atliekant tyrimą ją lengviau aptikti.

Stebėtieji 21 chromosomos LTS vertės ir Y chromosomos normalizuotų chromosomų verčių (NCV) vidutiniai ir standartiniai nuokrypiai atskleidė, kad replikacijos standartinis nuokrypis (SN) buvo didžiausias kintamumą lemiantis veiksnys. Skirtingos laboratorijos, prietaisai ir reagentų partijos daro nedidelę įtaką kintamumui, kaip parodo skirtumas tarp bendro SN ir replikacijos SN, pateiktas 19 lentelė ir 20 lentelė.

19 lentelė Tarplaboratorinio (atkuriamumo) tyrimo sekoskaitos atsako standartinių nuokrypių (SN) suvestinė

Atsakas	N	Vidurkis	Replikacijos SN	Bendras atkuriamumo SN*
21 chromosomos LTS įvertis	36	34,43	11,36	11,36
Y chromosomos NCV	180	190,56	7,96	10,20

* Bendro standartinio nuokrypio vertė apima kintamumą, kurį nulėmė laboratorija, operatorius, serija, diena ir replikacija.

20 lentelė Laboratorijos sekoskaitos atsako tikslumo suvestinė

Atsakas	N	Vidurkis	Replikacijos SN	Bendras laboratorijos SN*
21 chromosomos LTS įvertis	48	36,01	9,07	10,25
Y chromosomos NCV	240	198,68	7,63	7,82

* Bendra standartinio nuokrypio vertė apima kintamumą, kurį nulėmė sekoskaitos prietaisai, reagentų partija, operatorius, serija, diena ir replikacija.

Buvo atliktas papildomas tyrimas siekiant palyginti 2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ sekoskaitos tikslumą (bendrą standartinį nuokrypį) naudojant 2.0 versijos ir 2.5 versijos pratekamąsias kiuvetes. Tyrime buvo naudojamos dviejų tipų pratekamosios kiuvetės (2.0 ir 2.5 versijos), trys sekoskaitos rinkinių partijos ir keturios prietaisų sistemos; naudojant kiekvieną kombinaciją buvo vykdytos dvi sekoskaitos serijos, iš viso 48 serijų vienoje laboratorijoje. Vienas sekoskaitos telkinys buvo paruoštas naudojant rankiniu būdu paruoštas cfDNR plokšteles. Mėginių grupę sudarė keturios 5 % vaisiaus frakcijos mėginių, kuriuose nustatyta T21, telkinio replikacijos ir dvidešimt 10 % vyriškosios lyties (vaisiaus kariotipas – XY), kaip nustatyta iš motinos plazmos, vaisiaus frakcijos cfDNR telkinio replikacijų. 21 lentelė pateikti tyrimo rezultatai patvirtina, kad sekoskaitos tikslumas naudojant 2.0 ir 2.5 versijos pratekamąsias kiuvetes nesiskiria.

21 lentelė Sekoskaitos naudojant 2.0 versijos ir 2.5 versijos pratekamąsias kiuvetes atsako tikslumo suvestinė

Atsakas	Stebėjimų skaičius (pagal versiją)	2.0 versija, bendras SN*	2.5 versija, bendras SN*	Statistinis rezultatas**
21 chromosomos LTS įvertis	96	9,56	8,44	Statistiniu požiūriu lygiavertis (tikslumo vertė = 0,25)
Y chromosomos NCV	480	7,74	7,38	Statistiniu požiūriu lygiavertis (tikslumo vertė = 0,38)

* Bendra standartinio nuokrypio vertė apima kintamumą, kurį nulėmė sekoskaitos prietaisai, reagentų partija, serija, diena ir replikacija.

** Remiantis dispersijų lygybės F testu (standartiniai nuokrypiai sulyginti)

Kryžminė tarša

Buvo įvertinta „VeriSeq NIPT Solution“ mėginių paruošimo darbo eigos kryžminės taršos tikimybė. Buvo ištirti plazmos telkiniai, sudaryti iš nenėščių moterų (XX) ir suaugusių vyrų (XY) mėginių, išdėliojus mėgintuvėlius šachmatų lentos principu keturiuose 96 šulinėlių plokštelėse. Mėginių skaičius: kiekvienoje plokštelėje buvo po 48 moterų ir vyrų mėginius; iš viso naudoti 192 moterų mėginiai ir 192 vyrų mėginiai. Nė viename iš moterų paimtame mėginyje Y chromosomos padengimas nebuvo statistiškai didesnis, nei apskaičiuota foninė vertė; tai reiškia, kad toje pačioje plokštelėje kryžminė tarša iš vyriškosios lyties mėginių nenustatyta. Naudojant „VeriSeq NIPT Solution“ nebuvo stebima jokia aptinkama kryžminė tarša.

Potencialios trukdančiosios medžiagos

Potencialių trukdančiųjų medžiagų poveikis naudojant „VeriSeq NIPT Solution“ įvertintas analizuojant tyrimo veiksmingumą esant tokioms medžiagoms.

Į motinos plazmos mėginių, kuriuose nenustatyta vaisiaus anomalija, kai laukiamasi moteriškosios lyties vaisiaus (nustatyta vaisiaus chromosomų pora XX), telkinius buvo įmaišyta albumino, bilirubino, hemoglobino ir trigliceridų (endogeninių). Mėginiai tirti naudojant du kiekvienos tiriamosios medžiagos koncentracijos lygius (po 16 kiekvienos medžiagos mėginių). Jokio poveikio tyrimo efektyvumui nepastebėta.

22 lentelė Potencialios trukdančiosios medžiagos (endogeninės)

Tiriama medžiaga	Maža tiriamosios medžiagos koncentracija (mg/ml)	Didelė tiriamosios medžiagos koncentracija (mg/ml)
Albuminas	35	50
Bilirubinas	0,01	0,15
Hemoglobinas	100	200
Trigliceridas	1,5	5

Plazmoje esanti motinos genomo DNR (gDNR) taip pat gali turėti įtakos tyrimo veiksmingumui, nes ji gali būti išskirta kartu su vaisiaus cfDNR. Naudojant kiekvieną mėginį buvo pridėta 1,6, 3,3 ir 4,9 ng koncentracijos genomo DNR (tai atitinka 1, 2 ir 3 standartinius nuokrypius nuo vidutinės numatomos gDNR koncentracijos praėjus 7 dienoms nuo visos sudėties kraujo paėmimo¹²) į cfDNR, išskirtą iš motinos plazmos mėginių, kuriuose nenustatyta vaisiaus anomalija, kai laukiamasi moteriškosios lyties vaisiaus (nustatyta vaisiaus chromosomų pora XX). Tada mėginiai buvo ištirti naudojant „VeriSeq NIPT Solution“ (po 16 kiekvienos koncentracijos mėginių). Didesnės gDNR koncentracijos poveikio tyrimo efektyvumui nepastebėta.

Remiantis EP7-A2 („Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline–Second Edition“), ištirta dvidešimt potencialių trukdančiųjų medžiagų (egzogeninių), randamų vaistuose, kurie paprastai vartojami ar skiriami per nėštumą. 20 potencialių trukdančiųjų medžiagų buvo sujungta į keturis telkinius, įmaišyta į motinos plazmos mėginius, kuriuose nenustatyta vaisiaus anomalija, kai laukiamasi moteriškosios lyties vaisiaus (nustatyta vaisiaus chromosomų pora XX), ir ištirta naudojant „VeriSeq NIPT Solution“ (po 16 kiekvieno telkinio tyrimų). Šių egzogeninių medžiagų buvimo poveikio tyrimo efektyvumui nepastebėta.

23 lentelė Potencialios trukdančiosios medžiagos (egzogeninės)

1 telkinys	2 telkinys	3 telkinys	4 telkinys
Acetaminofenas	Difenhidraminas	Albuterolis	Cetirizinas
Acetilcisteinas	Eritromicinas	Bupropionas	Dekstrometorfanas
Bisoprololis	Guaifenezinas	Kofeinas	L-askorbo rūgštis
Citalopramas	Heparinas	Sertralinas	Metoprololis
Desloratadinas	Lidokainas	Natrio fluoridas	Nadololis

Aptikimo riba

Aptikimo riba (AR) apibrėžiama kaip vaisiaus frakcijos lygis, užtikrinantis 95 % dominančios būklės, pvz., T21, aptikimo tikimybę. Atlikta įvairių tyrimų ir statistinių analizių siekiant įvertinti 2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ aptikimo ribą nustatant dažnai pasitaikančias būkles.

Dominančios būklės aptikimo riba mėginyje, kuriame yra aberacija, naudojant 2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“, iš esmės priklauso nuo trijų veiksnių:

- vaisiaus frakcijos;
- sekoskaitos aprėpties gylio;

- genomo dominančios srities dydžio ir sudėtingumo.

Esant pastoviam sekoskaitos aprėpties gyliui, nurodytą aberaciją lengviau aptikti mėginyje, kuriame vaisiaus frakcijos procentinis dydis yra aukštesnis, nei mėginyje, kuriame vaisiaus frakcijos procentinis dydis yra mažesnis. Ir atitinkamai, esant pastoviai vaisiaus frakcijai, nurodytą aberaciją lengviau aptikti mėginyje, kurio sekoskaitos aprėpties gylis yra aukštesnis, nei mėginyje, kurio sekoskaitos aprėpties gylis yra mažesnis. Galiausiai, aberacijas, esančias mažesnėse ar sudėtingesnėse genomo srityse, sunkiau aptikti nei aberacijas, esančias didesnėse ar ne tokiose sudėtingose genomo srityse, darant prielaidą, kad vaisiaus frakcija ir sekoskaitos aprėpties gylis yra pastovūs.

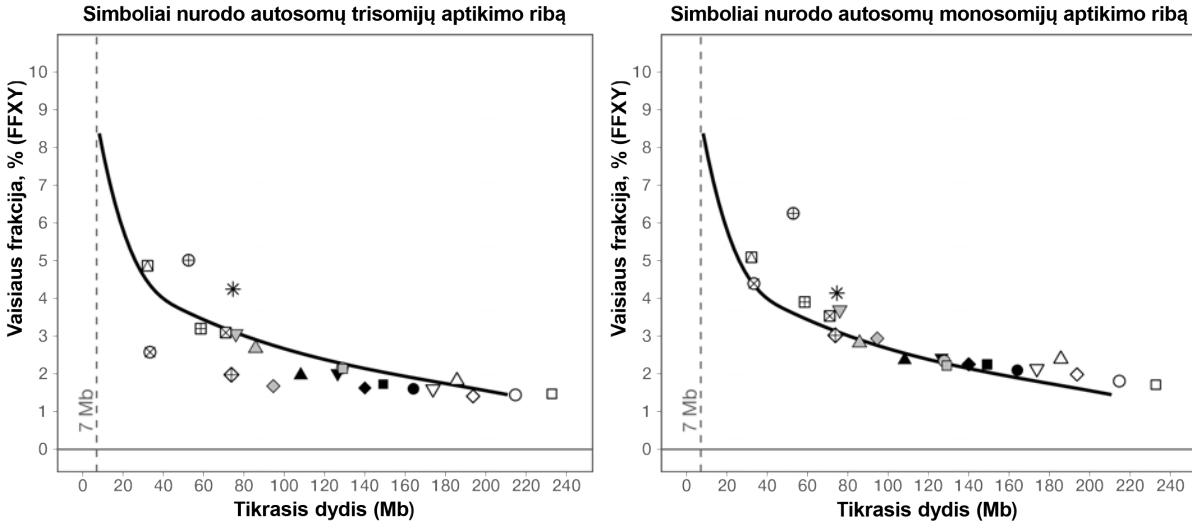
Siekiant nustatyti T21 aptikimo AR, buvo išanalizuoti mėginiai, tarp kurių buvo sutelktų T21 paveiktų mėginių ir sutelktų mėginių, kuriuose anomalija nenustatyta. Atliekant titravimą buvo sumaišytos dviejų tipų analizės siekiant sukurti septynių vaisiaus frakcijos lygių (0, 2, 3, 4, 5, 6 ir 10 %) rinkinį. Kiekvieną lygį sudarė iš viso 10 replikacijų.

Siekiant dar labiau padidinti vaisiaus frakcijos tinklėlio skyrą AR analizės tikslais, šio tyrimo duomenys buvo papildyti duomenimis, gautais atliekant in silico skiedimą. Eksperimentinio skiedimo ir titravimo rezultatai buvo sumodeliuoti taikant kontroliuojamo sekoskaitos duomenų maišymo metodą. Šio in silico titravimo duomenys apėmė 14 vaisiaus frakcijos lygių (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 ir 4,50 %) rinkinį, o kiekvieną lygį sudarė 32 replikacijų. Gautiems duomenims taikyta probito analizė siekiant nustatyti T21 aptikimo ribą.

Buvo sukurtas atskiras statistinis modelis, kuriame naudojami vaisiaus frakcijos, sekoskaitos aprėpties gylio ir genomo dydžio / sudėtingumo duomenys, siekiant numatyti bet kokios aberacijos aptikimo tikimybę bet kokiam mėginyje. Šis modelis sukurtas remiantis duomenimis, gautais iš 1 405 XY mėginių rinkinio. Remiantis šiuo modeliu nustatyta, kad T21 aptikimo riba atitinka probito analizę pagrįstą apskaičiavimą, aprašytą pirmiau. Šis statistinis modelis buvo naudojamas siekiant nustatyti aneuploidijų aptikimo visose autosomose ir dalinių iškritų bei duplikacijų aptikimo ribos vertes.

[2 pav](#) parodyta 95 % aptikimo tikimybė vidutinio dydžio srityse pagal dydį ir visų autosomų trisomijų ir monosomijų aptikimo ribos. CNV LTS ribinė vertė 15,1.

2 pav. 95 % aptikimo tikimybė vidutinio dydžio srityse pagal dydį naudojant 2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“



Chromo- soma	Simbolis	Trisomija		Monosomija	
		LTS ribinė vertė	AR (%)	LTS ribinė vertė	AR (%)
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

Chromo- soma	Simbolis	Trisomija		Monosomija	
		LTS ribinė vertė	AR (%)	LTS ribinė vertė	AR (%)
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

Trikčių šalinimas

2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ trikčių šalinimas

Trikties tipas	Galimas rezultatas	Aiškinimas	Rekomenduojamas veiksmas	Komentarai
Nepakankamas pradinis plazmos kiekis	Mėginio KK triktis	Nepakankamas plazmos tūris.	Paimkite naują mėginį.	Remiantis vizualia plazmos tūrio patikra.
Kraujo mėgintuvėlio triktis	Kraujas neatskiriamas į kraujo komponentus	Mėginys necentrifuguotas.	Įsitikinkite, kad centrifuga įjungta ir kad mėgintuvėlis buvo centrifuguotas reikiama jėga. Paimkite naują mėginį.	
		Netinkamas mėginio laikymas ar transportavimas (mėginio hemolizė).	Paimkite naują mėginį.	Nepavyks atskirti užšaldytų mėginių kraujo komponentų. Dėl netinkamų transportavimo ar laikymo sąlygų gali įvykti mėginių hemolizė.

Trikties tipas	Galimas rezultatas	Aiškinimas	Rekomenduojamas veiksmas	Komentarai
Mėginio užsikimšimas arba lėtas pratekėjimas	Plazmos užteršimas	Atskiri mėginiai gali užkimšti surišimo plokštelę, jei plazmos mėginyje didelė tarša.	Apžiūrėkite mėginį. Jei mėgintuvėlyje likusi plazma yra raudona arba balsva. Jei mėginys atrodo įprastai, iš naujo tirkite mėginį.	
	Mėginių perpilda	Netinkamai apžiūrėta, ar kiekviename mėgintuvėlyje esantys mėginiai yra tinkami.	Panaikinkite gretimuose perpildytuose šulinėliuose esančius mėginius.	Gali reikšti, kad mėginiai buvo netinkamai gabenami arba laikomi prieš aprodėjimą. Netinkamus mėginius pašalinkite iš apdorotinų mėginių sąrašo.
	Aparatinės įrangos gedimas	Nepakankamas medžiagos paėmimas atliekant išskyrimą.	Iš naujo išstirkite mėginį. Jei problema kartojasi toje šulinėlio vietoje naudojant kitus mėginius, kreipkitės į „Illumina“ techninės priežiūros tarnybą.	

Trikties tipas	Galimas rezultatas	Aiškinimas	Rekomenduojamas veiksmas	Komentarai
Atskiro mėginio analizės KK triktis	Sekoskaitos KK triktis	Galimos priežastys nurodytos toliau: <ul style="list-style-type: none"> nepakankama genetinė įvestis; netinkamas perkėlimas tvarkant mėginius; sekoskaitos reagento triktis. 	Patikrinkite mėginio anotaciją. Patikrinkite, ar nebuvo panašių rezultatų apdorojant ankstesnius mėginius atitinkamoje plokštelės vietoje. Iš naujo ištyrinkite mėginį.	Nurodo nepakankamą mėginio medžiagą arba netinkamą perkėlimą sistemoje ML STAR. Genetinės medžiagos gali nepakakti, jei plazmoje nepakanka ekstraląstelinės vaisiaus DNR arba jei dėl ląstelinės DNR mėginys per daug atskiedžiamas sekoskaitos tikslais.
	Maža vaisiaus frakcija arba mažas įtrauktų sričių (NES) skaičius	Sugeneruota nepakankamai duomenų, kad būtų galima pateikti tikslią ataskaitą.	Iš naujo ištyrinkite naudodami plazmą.	

Trikties tipas	Galimas rezultatas	Aiškinimas	Rekomenduojamas veiksmas	Komentarai
Kiekybinio nustatymo KK triktis	Nepavykusi kiekybinio nustatymo serija. Partijos mediana mažesnė nei minimali	Nepakankamas proceso kiekis.	Pakartokite kiekybinį nustatymą. Jei pakartotinė procedūra nepavyko, kreipkitės į „Illumina“ techninės priežiūros skyrių.	Reikalavimų neatitinkantys standartinės kreivės rodikliai rodo problemas, susijusias su bibliotekos paruošimu (t. y. nebiologinio etanolio naudojimu), arba problemas, susijusias su kiekybinio nustatymo procesu.
	Nepavykusi kiekybinio nustatymo serija	Standarto kreivės triktis.	Pakartokite kiekybinį nustatymą. Jei pakartotinė procedūra nepavyko, kreipkitės į „Illumina“ techninės priežiūros skyrių.	
Telkimo triktis	Nepavyko užbaigti mėginių telkimo	Telkimo analizei nepavyko apskaičiuoti tinkamų telkinių tūrių.	Iš naujo įvertinkite tikslią telkimo koncentraciją. Pakartokite telkimo analizę.	

„VeriSeq NIPT Microlab STAR“ trikčių šalinimas

Proceso veiksmas	Klaidos kodas	Klaidos dialogo langas	Aprašas	Veiksmai, kurių turi imtis naudotojas
Partijos kūrimas	EM0044	„The Batch ID entered contains forbidden characters.“ (Ivestame partijos ID yra neleistinų simbolių.)	Naudojant 2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ visuose duomenų laukuose galima naudoti tik skaitmenis, raides, pabraukimo brūkšnius ir brūkšnius.	Sukurkite partijos pavadinimą, kuriame nebūtų jokių specialiųjų simbolių.
Partijos kūrimas	EM0051	„The Batch ID is greater than 36 characters in length.“ (Partijos ID viršija 26 simbolių ilgio apribojimą.)	Naudojant 2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ partijų pavadinimams taikomas 36 simbolių ilgio apribojimas.	Sukurkite trumpesnį nei 36 simbolių partijos pavadinimą.
Partijos kūrimas	EM0076	„Unable to connect to VeriSeq Onsite Server v2“ (Nepavyko prisijungti prie 2 versijos „VeriSeq“ vietinio serverio)	2 versijos „VeriSeq“ vietinis serveris neatsako į „Workflow Manager“ (darbo eigos tvarkyklė) pateiktas duomenų užklausas.	<ol style="list-style-type: none"> Įsitikinkite, kad ML STAR yra prijungtas prie tinklo. Įsitikinkite, kad „VeriSeq“ vietinio serverio 2 versija yra įjungta. Patikrinkite, ar ML STAR gali prisijungti prie 2 versijos „VeriSeq“ vietinio serverio (naudokite ryšio patikrinimo užklausą). Jei atlikus anksčiau nurodytus veiksmus problemos išspręsti nepavyko, kreipkitės į „Illumina“ techninės pagalbos tarnybą.

Proceso veiksmas	Klaidos kodas	Klaidos dialogo langas	Aprašas	Veiksmai, kurių turi imtis naudotojas
Partijos kūrimas	EM0118	„This batch has been failed and cannot be further processed.“ (Ši partija nepavyko ir jos toliau apdoroti negalima.)	Nurodyta partija jau pažymėta kaip nepavykusi ir jos negalima toliau apdoroti.	2 versijos „VeriSeq“ vietiniame serveryje esantis partijos įrašas nurodo, kad pasirinkta partija nepavyko. Jos toliau apdoroti negalima. Sukurkite kitą partiją naudodami reikiamus mėginius.
Partijos kūrimas	Netaikoma	„This batch has already completed processing. Would you like to repool?“ (Šios partijos apdorojimas jau baigtas. Ar norite atlikti pakartotinį telkimą?)	Nurodyta partija jau apdorota naudojant telkimo procesą. Vienintelis leidžiamas apdorojimo veiksmas yra pakartotinis telkimas.	Telkite pakartotinai kaip parodyta toliau. <ul style="list-style-type: none"> • Pasirinkite Re-pool (Telkti pakartotinai). • Nutraukite metodą ir prieš sujungdami iš naujo įsitikinkite, kad partijos pavadinimas yra teisingas.
Plazmos atskyrimas	WP0087	„Duplicate sample barcodes loaded.“ (Įkelti pasikartojantys mėginio brūkšniniai kodai.)	Į sistemą įkelti mėginiai su vienodais brūkšniniais kodais.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Vadovaudamiesi „Workflow Manager“ (darbo eigos tvarkyklė) pateikiamais raginimais raskite pasikartojančius mėginius. 2. Pašalinkite pasikartojančius mėginius ir pakeiskite etiketes arba pakeiskite juos. 3. Iš naujo įdėkite mėginius.

Proceso veiksmas	Klaidos kodas	Klaidos dialogo langas	Aprašas	Veiksmai, kurių turi imtis naudotojas
Plazmos atskyrimas	EP0102	„Samples specified in the Sample Sheet were not loaded.“ (Mėginių lape nurodyti mėginiai neįkelti.)	Į mėginių lapą įtraukti mėginiai nerasti tarp įkeltų brūkšnių kodų.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Vadovaudamiesi „Workflow Manager“ (darbo eigos tvarkyklė) pateikiamais raginimais raskite trūkstamus mėginius. 2. Rinkitės vieną iš toliau nurodytų parinkčių. <ul style="list-style-type: none"> • Pridėkite prie partijos trūkstamus mėginius ir iš naujo įkelkite mėginius. • Nutraukite metodo vykdymą ir prireikus modifikuokite mėginių lapą. Paleidimo iš naujo metodas.
Plokštelės įdėjimas	Netaikoma	„Venus Barcode Mask Error“ („Venus“ brūkšninio kodo šablono klaida)	„Workflow Manager“ (darbo eigos tvarkyklė) tinkamai susieja plokšteles su partija naudodama „Venus“ brūkšninio kodo šablonus.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Patikrinkite plokštelės vietą ir įsitikinkite, kad plokštelės išdėstymas tinkamas. 2. Įsitikinkite, kad įdėta plokštelė yra tinkama nurodytos partijos plokštelė.

Proceso veiksmas	Klaidos kodas	Klaidos dialogo langas	Aprašas	Veiksmai, kurių turi imtis naudotojas
cfDNR išskyrimas	WE0150	„Pressure in the vacuum chamber is too low.“ (Per žemas slėgis vakuuminės sistemos kameroje.)	„Workflow Manager“ (darbo eigos tvarkyklė) netęs proceso, jei vakuuminės sistemos linijos slėgis ramybės būsenoje yra < 400 torų.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Patikrinkite, ar vakuuminės sistemos linija neužsilenkusi ir ar nėra kitų trukdžių. 2. Atidarykite atliekų linijos išleidimo sąvaržas, išleiskite slėgį, o tada visiškai uždarykite išleidimo linijos sąvaržas. 3. Įsitikinkite, kad vakuuminės sistemos valdiklis ir siurblys yra įjungti. 4. Patikrinkite vakuuminį atliekų butelį. Jei atliekų butelis užpildytas daugiau nei iki pusės, ištuštinkite jį. 5. Jei problema išlieka, el. paštu susisieki su „Illumina“ techninės priežiūros skyriumi.
cfDNR išskyrimas	WE0153	„Pressure in the vacuum chamber is too high.“ (Per aukštas slėgis vakuuminės sistemos kameroje.)	Jei išmatuotas vakuuminės sistemos slėgis per aukštas prieš paleidžiant slėgio valdymo operacijas, tai gali reikšti sistemos gedimą.	Patikrinkite valdiklio užpakalinę pusę ir įsitikinkite, kad visos vakuuminės sistemos jungtys ir linijos tinkamai prijungtos.

Proceso veiksmas	Klaidos kodas	Klaidos dialogo langas	Aprašas	Veiksmai, kurių turi imtis naudotojas
cfDNR išskyrimas	WE0996	„Vacuum failed to seal.“ (Vakuuminei sistemai nepavyko sandariai uždaryti.)	Prieš tęsiant reikia pašalinti sandarinimo gedimą.	Prieš pasirinkdami OK (gerai) patikrinkite, ar sandarinimo gedimas išspręstas. 1. Įsitikinkite, kad surišimo plokštelė yra tiesiai priešais vakuuminės sistemos kolektorių. Apsimovę pirštinę ranka paspauskite surišimo plokštelę. 2. Klausykitės vakuuminės sistemos dūzgimo ir stebėkite vandens tekėjimą per surišimo plokštelę. 3. „Workflow Manager“ (darbo eigos tvarkyklėje) atidarykite pėdsakų rodinį. Kai tikrasis slėgio rodmuo pasiekia bent 50 slėgio vienetų mažiau nei aplinkos rodmenys, kad galėtumėte tęsti cfDNA išskyrimą, pasirinkite OK (gerai). 4. Jei per nustatytą laiką nepasiekiamas reikiamas slėgio rodmuo, pasirinkite OK (gerai) ir tęskite pirmąją lizato apkrovą. 5. Pristabdykite metodą, kai lizatas bus paskirstytas ant rišamosios plokštelės. Įstatykite iš naujo ir jėga paspauskite rišamąją plokštelę. 6. Jei lizatas neprateka per plokštelę, susisiekite su „Illumina“ techninės pagalbos skyriumi.

Proceso veiksmas	Klaidos kodas	Klaidos dialogo langas	Aprašas	Veiksmai, kurių turi imtis naudotojas
cfDNR išskyrimas	WM0219	Jei vakuuminė sistema įjungta, rankiniu būdu iš naujo nustatykite siurbį.	Vakuuminė sistema gali likti įjungta, kai atliekant išskyrimo procesą nutraukiamas metodo vykdymas.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Vakuuminės sistemos valdiklyje paspauskite Power (maitinimo) mygtuką, kad išjungtumėte vakuuminę sistemą. 2. Palaukite 10 sekundžių, tada dar kartą paspauskite Power (maitinimo) mygtuką, kad įjungtumėte vakuuminę sistemą.
cfDNR išskyrimas	EE0477	„An error has occurred while moving a plate. (iSWAP error)“ (perkeliant plokštelę įvyko klaida. („iSWAP“ klaida)	Jei įvyko „iSWAP“ klaida (plokštelė nukrito, jos nepavyko paimti ir pan.), sistema paragina naudotoją pabaigti perkėlimo veiksmą rankiniu būdu.	<p>Įsitikinkite, kad plokštelė tinkama naudoti (medžiaga neišsiliejo).</p> <ul style="list-style-type: none"> • Jei plokštelės atkurti nepavyksta, nutraukite seriją. • Jei plokštelę galima atkurti, vadovaudamiesi ekrane rodomomis instrukcijomis perkeltite plokštelę rankiniu būdu.
cfDNR išskyrimas	EE0519	„Scanned barcode does not match binding plate barcode on record.“ (Nuskaitytas brūkšninis kodas neatitinka užregistruoto surišimo plokštelės brūkšninio kodo.)	Įkelta surišimo plokštelė neatitinka išimtos plokštelės brūkšninio kodo.	Įsitikinkite, kad įkeliamą plokštelę atitinka užregistruotą brūkšninį kodą (žr. atitinkamo brūkšninio kodo sekimo žurnalą).

Proceso veiksmas	Klaidos kodas	Klaidos dialogo langas	Aprašas	Veiksmai, kurių turi imtis naudotojas
API	EA0372	„Unable to connect to the data server.“ (Nepavyko prisijungti prie duomenų serverio.)	2 versijos „VeriSeq“ vietinis serveris neatsako į „Workflow Manager“ (darbo eigos tvarkyklė) pateiktas duomenų užklausas.	1. Įsitikinkite, kad ML STAR yra prijungtas prie tinklo. 2. Įsitikinkite, kad „VeriSeq“ vietinio serverio 2 versija yra įjungta. 3. Patikrinkite, ar ML STAR gali prisijungti prie 2 versijos „VeriSeq“ vietinio serverio (naudokite ryšio patikrinimo užklausą).
	EA0774	„Connection Error. The API server connection failed to validate.“ (Ryšio klaida. Nepavyko patvirtinti API serverio ryšio.)	2 versijos „VeriSeq“ vietinis serveris nebeatsako į „Workflow Manager“ (darbo eigos tvarkyklė) pateiktas duomenų užklausas.	Įsitikinkite, kad: 1. Įsitikinkite, kad ML STAR yra prijungtas prie tinklo. 2. Patikrinkite, ar ML STAR gali prisijungti prie 2 versijos „VeriSeq“ vietinio serverio (naudokite ryšio patikrinimo užklausą). 3. Įsitikinkite, kad „VeriSeq“ vietinio serverio 2 versija yra įjungta.
	EA0780	„403: Invalid Request The current transaction is not valid.“ (403: netinkama užklausa. Dabartinė operacija netinkama.)	Išsiųsti duomenys pažeidžia sistemos darbo eigos logiką.	Žr. pateiktą klaidos informaciją. Dažniausios priežastys yra per ilgos įvestys arba leistinių simbolių apribojimą pažeidžiančios įvestys.

Literatūra

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

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

Keitimo istorija

Dokumentas	Data	Keitimo aprašas
Dokumento Nr. 1000000078751 v09	2024 m. balandžio mėn.	<p>Pašalinta</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pasenusios dalies Nr. 20030577. • Kraujo surinkimo mėgintuvėlių centrifugos maksimalios mėgintuvėlių talpos reikalavimas. <p>Pridėta</p> <ul style="list-style-type: none"> • Nauja dalis #20101927 „VeriSeq“ vietinio serverio 2 versijai. • 10 ml kraujo paėmimo mėgintuvėlių matavimo vienetas. • Paaiškinimas apie suderinamas „SoftMax Pro“ versijas. • Paaiškinimas, kuriame nurodoma, kad norint užtikrinti galimybę pakeisti „VeriSeq NIPT Microlab STAR“, reikia naudoti tik suderinamus plastikinius gaminius. • Pastaba dėl įspėjimo apie mėginio užteršimą priemaisomis skyriuje „Rezultatų interpretavimas“. • Įspėjimas. Neužšaldykite viso kraujo mėginio, surinkto į „Streck“ ekstraląstelinės DNR BCT kraujo surinkimo mėgintuvėlius. • Įspėjimas, kad mėginys nepatektų į aukštą temperatūrą. • Paaiškinimas dėl tyrimo apribojimų ir atkuriamumo sąlygų. • CNV LLR ribinės vertės paaiškinimas 2 paveikslėlyje, kuris yra skyriuje „Aptikimo riba“. <p>Atnaujinta</p> <ul style="list-style-type: none"> • Suderinama reagentų vonelės nuoroda iš „Roche“ reagentų vonelės į „illumina“ reagentų vonelę ir pridėtas naujas dalies numeris. • „Thermo Fisher Multifuge X4 Pro-MD“ katalogo dalies numeris iki # 75016034. • Įspėjimas, kad dėl nenuoseklaus šulinėlio tūrio mėginiams gali nepavykti atlikti automatinės kokybės kontrolės. • Nuoroda į prietaiso pakuotės lapelius.
Dokumento Nr. 1000000078751 v08	2022 m. rugpjūčio mėn.	<p>Atnaujinkite darbo eigos dalies numerį</p> <p>Pašalinta instrukcija pipetuojuant maišyti, jei bibliotekos plokštelė buvo užšaldyta.</p>

Dokumentas	Data	Keitimo aprašas
Dokumento Nr. 1000000078751 v07	2022 m. gegužės mėn.	<p>Procedūros apribojimus padalinkite į 2 versijos „VeriSeq NIPT Solution“ nustatymą ir įtraukite pirmuosius du punktus. Likęs tekstas naujoje antraštėje „Tyrimo apribojimai“.</p> <p>Pašalinta</p> <ul style="list-style-type: none"> • „VeriSeq“ nuo visų reagentų ženklavimo. • Plokštelės brūkšninį kodą uždėkite ant „VeriSeq NIPT“ adapterio plokštės ruošiant bibliotekas. <p>Pridėta</p> <ul style="list-style-type: none"> • Žodis sertifikuotas vandeniui be ribonukleazijų ir deoksiribonukleazijų. • Vienas iš šių mikroplokštelių skaitytuvų arba jo atitikmuo ir „SpectraMax“ M2, M3, M4, M5 bei pastaba. • Į skyrių „VeriSeq NIPT Microlab STAR“, kad paaiškintumėte, ką daryti taisant klaidą. • Pastaba vizualiai patikrinti šulinėlius. • Instrukcijos 24 ir 48 mėginių partijoms visose protokolo dalyse. • Veiksmai, kada naudoti violetinę adapterio plokštelę ar jos atitikmenį. • Skiltyje „Demografijos ir nėštumo charakteristikos“ pateikiami žodžiai, skirti pirmojo trimestro nėštumo rezultatams įtraukti. • Punktas pagal giluminės plokštelės specifikacijas atsparumui sukimo momentui įtraukti. <p>Atnaujinta</p>
		<ul style="list-style-type: none"> • Unikalių partijų pavadinimų formuluotės yra aiškinamosios ir pateikiančios pavyzdį. • Pastabų, įspėjimų ir perspėjimų simboliai ir formatavimas. • Antrinių bandymo punktų rezultatai. • Guanidino tiocianatas virsta guanidino hidrochloridu. • CVS į BVS (bazinę vakuuminę sistemą) • Formuluotė, skirta viso genomo ekranui ir LTS balui naudoti. • Specifikacijos: reagentų vonelės specifikacijos, gilių šulinėlių plokštelės, 384 šulinėlių plokštelės, 96 šulinėlių plokštelės
Dokumento Nr. 1000000078751 v06	2021 m. rugpjūčio mėn.	Atnaujintas įgaliotojo atstovo ES adresas.

Dokumentas	Data	Keitimo aprašas
Dokumento Nr. 1000000078751 v05	2020 m. gruodžio mėn.	<p>Vykdamas reglamentacinius nurodymus, skirsniai „Procedūros principai“, „Išspėjimai ir atsargumo priemonės“ bei „Gaminio ženklavimas“ atnaujinti papildomais paaiškinimais.</p> <p>Šiek tiek atnaujintas protokolo turinys, jį pritaikant dabartiniam „Illumina“ stiliui ir organizacijai.</p> <p>Skyriaus „Analitinis veiksmingumas“ skirsnyje „Tikslumas“ pataisytas 21 chromosomos aprašas, frazę „antra mažiausia žmogaus autosoma“ pakeičiant fraze „antra mažiausia žmogaus autosoma“.</p> <p>Skirsniuose „Atskirtos plazmos paruošimas“ ir „Rezultatų interpretavimas“ pridėti perspėjimai apie netinkamą rezervuarų naudojimą ir mėginių susimaišymo pavojus.</p> <p>Pridėti nauji serverio ir programinės įrangos dalių numeriai, skirti išleistam naujam serverio modeliui ir atnaujintai programinei įrangai.</p> <p>Informacijos apie protokolą ir trikčių šalinimą dalyje pridėti perspėjimai apie mėginių perpildą ir tai, kaip jos išvengti.</p> <p>Atnaujintas veikliųjų medžiagų sąrašas, pateiktas priedų dėžutėje esančiame DNR kiekybinio nustatymo standarte, kad sąrašas atitiktų saugos duomenų lapą.</p> <p>Atnaujinti „Local Run Manager“ „VeriSeq NIPT“ modulio pavadinimai, kad jie būtų tokie patys, kaip kituose dokumentuose. Įtraukta redakcijų istorija.</p>
Dokumento Nr. 1000000078751 v04	2020 m. spalio mėn.	Smulkūs pataisymai.
Dokumento Nr. 1000000078751 v03	2020 m. rugsėjo mėn.	Atnaujintas medžiagų sąrašas, kuriame dabar pateikiamos laboratorinės įrangos specifikacijos ir žinomi suderinami priedai.

Dokumentas	Data	Keitimo aprašas
Dokumento Nr. 1000000078751 v02	2020 m. vasario mėn.	<p>Atnaujintas informacijos apie klinikinį veiksmingumą pateikimas siekiant geriau perteikti įprastos ir viso genomo atrankos tipų skirtumus.</p> <p>Įtrauktas naujas skirsnis „Įprastos ir viso genomo patikrų veiksmingumo skirtumai.“</p> <p>Iš skyriaus „Procedūros principai“ pašalinta prieštaraujanti informacija apie galimybę pasirinkti papildomą ataskaitą. Siekiant suvienodinti stilių, atnaujintas „VeriSeq NIPT“ 2 v. „Workflow Manager“ programinės įrangos pavadinimas. Naujais pakeitimais atnaujintos Australijos ir „Illumina Netherlands“ adresų etiketės.</p>
Dokumento Nr. 1000000078751 v01	2019 m. rugpjūčio mėn.	Pašalintas pasikartojantis cfDNR išskyrimo veiksmas, atsiradęs dėl leidybos programinės įrangos klaidos.
Dokumento Nr. 1000000078751 v00	2019 m. gegužės mėn.	Pirmasis leidimas.

Patentai ir prekių ženklai

Šis dokumentas ir jo turinys priklauso „Illumina, Inc.“ ir jos filialams („Illumina“), jis skirtas tik klientui naudoti pagal sutartį, kiek tai susiję su čia aprašyto (-ų) produkto (-ų) naudojimu, ir jokių kitų tikslų. Šis dokumentas ir jo turinys negali būti naudojami ar platinami jokių kitų tikslų ir (arba) kitaip negali būti pateikiami, atskleidžiami ar atkuriami koku nors būdu be išankstinio rašytinio „Illumina“ sutikimo. „Illumina“ šiuo dokumentu neperduoda jokios trečiosios šalies licencijos pagal jos patentą, prekės ženklą, autorių teises, bendras teises nei panašių teisių.

Kvalifikuotas ir tinkamai išmokytas personalas turi griežtai ir aiškiai vadovautis šiame dokumente pateiktomis instrukcijomis, kad būtų užtikrintas tinkamas ir saugus šiame dokumente aprašyto (-ų) produkto (-ų) naudojimas. Prieš naudojant tokį (-ius) produktą (-us), visas šio dokumento turinys turi būti išsamiai perskaitytas ir suprastas.

JEI NEBUS PERSKAITYTOS VISOS ČIA PATEIKTOS INSTRUKCIJOS IR JOMIS NEBUS AIŠKIAI VADOVAUJAMASI, GALIMAS PRODUKTO (-Ų) PAŽEIDIMAS, NAUDOTOJO BEI KITŲ ASMENŲ SUŽEIDIMAS IR ŽALA KITAI NUOSAVYBEI, BE TO, TAI PANAIKINA PRODUKTUI (-AMS) TAIKOMOS GARANTIJOS GALIOJIMĄ.

„ILLUMINA“ NEPRISIIMA JOKIOS ATSAKOMYBĖS, JEI ČIA APRAŠOMAS (-I) PRODUKTAS (-AI) (ĮSKAITANT DALIS IR PROGRAMINĘ ĮRANGĄ) NAUDOJAMAS (-I) NETINKAMAI.

© 2023 m. „Illumina, Inc.“. Visos teisės saugomos.

Visi prekių ženklai priklauso „Illumina, Inc.“ ar kitiems atitinkamiems savininkams. Daugiau informacijos apie prekių ženklus žr. www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktinė informacija



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 JAV
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (ne Šiaurės Amerikoje)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Gaminio ženklimas

Visą informaciją apie gaminių pakuočių ir etikečių simbolius rasite simbolių paaiškinimo lentelėje, pateiktoje svetainės support.illumina.com skirtuke „Documentation“ (dokumentacija).

Pradėjus veikti Europos medicinos priemonių duomenų bazei („Eudamed“), saugos ir veikimo suvestinę (SSP) galima rasti tinklalapyje <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>. Ji susieta su baziniu UDI-DI (0081627002NIPTRP).