

Priložene upute

ZA IN VITRO DIJAGNOSTIKU.

Namjena

VeriSeq™ NIPT Solution v2 test je za upotrebu u *in vitro* dijagnostici koji služi kao test za probir za prepoznavanje fetalnih genetskih anomalija na razini genoma iz uzoraka majčine periferne pune krvi trudnica gestacijske dobi najmanje 10 tjedana. VeriSeq NIPT Solution v2 upotrebljava sekvenciranje cijelog genoma za prepoznavanje djelomičnih dupliciranja i delecija za sve autosome i statusa aneuploidije za sve kromosome. Test nudi mogućnost da se ispita aneuploidija spolnih kromosoma (SCA). Proizvod se ne smije upotrebljavati kao isključiv temelj za dijagnozu ili druge odluke o upravljanju trudnoćom.

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

Sažetak i objašnjenje analize

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

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

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

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

VeriSeq NIPT Solution v2 neinvazivni je in vitro dijagnostički (IVD) test koji koristi sekvenciranje fragmenata cfDNK-a na razini cijelog genoma dobivenog iz uzoraka majčinske periferne pune krvi uzete od trudnica gestacijske dobi najmanje 10 tjedana. Test nudi dvije mogućnosti odabira vrste probira: osnovni i na razini genoma. Osnovni probir nudi informacije o stanju aneuploidije samo za kromosome 21, 18, 13, X i Y. Probiri na razini genoma prepoznaju djelomična dupliciranja i delecije za sve autosome i stanje aneuploidije za sve kromosome. Obje vrste probira nude mogućnost izvješćivanja o aneuploidiji spolnih kromosoma (sex chromosome aneuploidy, SCA) s otkrivanjem spola fetusa ili bez njega. Mogućnost izvješćivanja za SCA može se isključiti. Ako je mogućnost izvješćivanja za SCA isključena, ne otkriva se ni spol fetusa. Da biste saznali više o mogućnostima izvješćivanja o spolu, pogledajte *Vodič za softver VeriSeq NIPT Solution v2 (broj dokumenta: 1000000067940)*.

Načela postupka

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

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

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

**OPREZ**

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

- **Izdvajanje cfDNK-a** – pročišćavanje cfDNK-a od plazme postiže se adsorpcijom na pločici za povezivanje, pranjem pločice za povezivanje radi uklanjanja kontaminanata i ispiranjem.
- **Priprema biblioteke** – pročišćeni fragmenti cfDNK-a prolaze kroz postupak popravka krajeva kako bi se 5' i 3' prevjesi pretvorili u „tupe“ krajeve. Zatim se krajevima 3' dodaje dioksiadenozin nukleotid radi stvaranja prevjesa od jedne baze. Indeksirani adapteri koji sadrže prevjes od jedne baze 3' deoksitimidina zatim se ligacijom dodaju na obrađene fragmente cfDNK-a. Ligacijom dobiveni DNK pročišćava se pomoću reverznih imobilizacijskih zrnaca u krutoj fazi. Svaki uzorak u skupu od njih 24, 48 ili 96 dobiva jedinstveni indeksirani adapter. Adapteri imaju 2 svrhe:

**OPREZ**

Budite iznimno oprezni da biste izbjegli unakrsnu kontaminaciju indeksa jer bi to moglo uzrokovati netočne rezultate.

- Indeksi omogućuju prepoznavanje uzoraka prilikom slijednog sekvenciranja.
- Adapteri indeksa sadrže sekvence koje omogućuju fiksiranje biblioteke na tvrdoj površini protočnog članka za sekvenciranje radi generiranja klastera i slijednog sekvenciranja.
- **Kvantifikacija** – proizvod biblioteke kvantificira se pomoću fluorescentne boje u koncentraciji određenoj prema usporedbi sa standardnom krivuljom DNK-a.
- **Stvaranje skupova za biblioteku i sekvenciranje** – biblioteke uzorka stavljaju se zajedno u skupove od 24 ili 48 uzoraka u prilagođenim količinama radi svođenja varijacija u pokrivenosti na najmanju moguću mjeru. Svaki se skup zatim sekvencira uz pomoć instrumenta za sekvenciranje nove generacije.
- VeriSeq NIPT Solution v2 ne obuhvaća opremu ni potrošni materijal za sekvenciranje.
- **Analiza** – za svaki se uzorak analiza sastoji od sljedećeg:
 - Identifikacija fragmenata biblioteke prema sekvenci indeksa i poravnanju uparenih krajeva očitava se u usporedbi s humanim referentnim genomom.
 - Fetalna frakcija biblioteke određuje se kombiniranjem informacija iz raspodjela dužina i genomskih koordinata fragmenata biblioteke.
 - Nakon uzimanja u obzir poznatih utjecaja, statistički model prepoznaje regije genoma koje su ispodprosječno ili iznadprosječno zastupljene u biblioteci na način dosljedan s anomalijom na utvrđenoj razini fetalne frakcije.
 - NIPT izvješće nudi sažetak rezultata za odabrani testni izbornik pri čemu se uz rezultat fetalne frakcije za uzorke koji su prošli kontrolu kvalitete navodi ANOMALY DETECTED (Anomalija otkrivena) ili NO ANOMALY DETECTED (Anomalija nije otkrivena).
 - Dodatno izvješće nudi kvantitativne mjerne podatke koji karakteriziraju prepoznatu anomaliju.

Ograničenja postupka

Ograničenja analize

- Dokazi o osjetljivosti i specifičnosti testa pokrivaju jednoplodne i blizanačke trudnoće. U ovim se uputama za upotrebu ne navode podaci o osjetljivosti ili specifičnosti za trojke ni druge višepodne trudnoće.
- VeriSeq NIPT Solution v2 nije namijenjen za prepoznavanje poliploidija, primjerice triploidije.
- VeriSeq NIPT Solution v2 nije namijenjen za prepoznavanje uravnoteženih promjena redoslijeda kromosoma.
- Za ovu su analizu potrebni uzorci majčine periferne pune krvi trudnica gestacijske dobi najmanje 10 tjedana.
- U slučaju osnovnih probira test VeriSeq NIPT Solution v2 traži specifične abnormalnosti kromosoma. Rezultati koji se objavljuju kao NO ANOMALY DETECTED (Nije otkrivena anomalija) ne uklanjaju mogućnost kromosomskih abnormalnosti testiranih kromosoma. Negativan rezultat ne uklanja mogućnost da u trudnoći postoje druge kromosomske abnormalnosti, genetske bolesti ili prirodene anomalije (npr. anomalija otvorene neuralne cijevi).
- Kod probira na razini genoma velike delecije i dupliciranja koja veličinom ne premašuju 75 % veličine kromosoma mogu biti indikativni za aneuploidiju cijelog kromosoma.
- Kod probira na razini genoma određene su regije izuzete iz analize. Popis izuzetih regija dostupan je na web-mjestu službe za podršku tvrtke Illumina. Otkrivanje genomskih abnormalnosti provodi se samo nad regijama koje nisu izuzete.
- Izvješćivanje o spolu fetusa nije dostupno u svim regijama zbog lokalnih propisa u vezi s objavljivanjem spola.
- Prema podacima iz literature, rezultati probira na temelju DNK-a bez stanica mogu biti ograničeni određenim čimbenicima povezanim s majkom i fetusom. Neki od njih navedeni su u nastavku, no popis nije cjelovit:
 - nedavne transfuzije krvi u majke
 - prethodno presađivanje organa / matičnih stanica majke
 - autoimuna bolest majke
 - neoplazme (benigne i maligne) majke
 - mozaicizam majke
 - varijacije broja kopija u majke
 - fetoplacentalni mozaicizam / ograničeni placentalni mozaicizam
 - fetalna smrt / sindrom nestalog blizanca

Izješćivanje o testu VeriSeq NIPT Solution v2

- VeriSeq NIPT Solution v2 test je za probir i ne smije se promatrati izdvojeno od drugih kliničkih saznanja i rezultata testiranja. Zaključci o stanju fetusa i odluke o upravljanju trudnoćom ne smiju se temeljiti samo na rezultatima NIPT probira.⁷
- VeriSeq NIPT Solution v2 izvješćuje o sljedećem:
 - Osnovni probir testira iznadprosječnu reprezentaciju kromosoma 13, 18 i 21.
 - Probir na razini genoma testira ispodprosječnu i iznadprosječnu reprezentaciju svih autosoma, uključujući djelomične delecije i dupliciranja veličine najmanje 7 Mb.
 - Kad se u jednoplodnih trudnoća odabere Yes (Da) ili SCA kao mogućnost izvješćivanja o spolu, mogu se prepoznati sljedeće anomalije spolnih kromosoma: XO, XXX, XXY i XYY.
 - Kad se u jednoplodnih trudnoća odabere Yes (Da) kao mogućnost izvješćivanja o spolu, otkriva se spol fetusa.
 - Prisutnost Y kromosoma u blizanačkim trudnoćama.

Komponente proizvoda

VeriSeq NIPT Solution v2 sastoji se od sljedeće pripreme uzoraka:

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

VeriSeq NIPT Solution v2 sastoji se od sljedećih softverskih komponenti:

- VeriSeq NIPT Assay Software v2 (broj dijela 20047024), unaprijed instaliran na VeriSeq Onsite Server v2.
 - VeriSeq Onsite Server v2 (broj dijela 20028403, 20047000, 20101927) ili postojeći VeriSeq Onsite Server (broj dijela 15076164 ili 20016240) nadograđen na v2.
- VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 (broj dijela 20044988), unaprijed instaliran na VeriSeq NIPT Microlab STAR.
 - VeriSeq NIPT Microlab STAR (broj dijela: Hamilton Company Reno: 95475-01 (115 V) i 95475-02 (230 V), Hamilton Company Bonaduz: 806288).
- Modul Local Run Manager VeriSeq NIPT (broj dijela 20044989)

Reagensi

Priloženi reagensi

illumina isporučuje sljedeće reagense: VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (24 samples) (broj dijela 20025895), VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (48 samples) (broj dijela 15066801) i VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (96 samples) (broj dijela 15066802). VeriSeq NIPT Sample Prep Kit konfiguriran je za upotrebu s uređajem VeriSeq NIPT Microlab STAR (ML STAR) (broj dijela 95475-01, 95475-02 ili 806288), koji proizvodi Hamilton Company.

VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, kutija za izdvajanje

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

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

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

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

VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, kutija za pripremu biblioteke

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

Naziv reagensa na naljepnici	Broj spremnika u kompletu	Aktivni sastojci	Skladištenje
End Repair Mix (Završna mješavina za popravak)	1	DNK polimeraza i dNTP-ovi u puferiranoj vodenoj otopini	od -25 °C do -15 °C
A-Tailing Mix (A-mješavina za zatvaranje)	1	DNK polimeraza i dATP u puferiranoj vodenoj otopini	od -25 °C do -15 °C
Ligation Mix (Mješavina za ligaciju)	1	DNK ligaza u puferiranoj vodenoj otopini	od -25 °C do -15 °C
Hybridization Buffer (Pufer za hibridizaciju)	1	Puferirana vodena otopina	od -25 °C do -15 °C
NIPT DNA Adapter Plate (Pločica prilagodnika za NIPT DNK)	1	Oligonukleotidi u puferiranoj vodenoj otopini	od -25 °C do -15 °C

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

Naziv reagensa na naljepnici	Broj spremnika u kompletu	Aktivni sastojci	Skladištenje
End Repair Mix (Završna mješavina za popravak)	1	DNK polimeraza i dNTP-ovi u puferiranoj vodenoj otopini	od -25 °C do -15 °C
A-Tailing Mix (A-mješavina za zatvaranje)	2	DNK polimeraza i dATP u puferiranoj vodenoj otopini	od -25 °C do -15 °C
Ligation Mix (Mješavina za ligaciju)	2	DNK ligaza u puferiranoj vodenoj otopini	od -25 °C do -15 °C
Hybridization Buffer (Pufer za hibridizaciju)	1	Puferirana vodena otopina	od -25 °C do -15 °C
NIPT DNA Adapter Plate (Pločica prilagodnika za NIPT DNK)	1	Oligonukleotidi u puferiranoj vodenoj otopini	od -25 °C do -15 °C

VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, kutija za dodatnu opremu

Tablica 5 VeriSeq NIPT Accessory Box, broj dijela 15066811

Naziv reagensa na naljepnici	Broj spremnika u kompletu	Aktivni sastojci	Skladištenje
DNA Binding Plate (Pločica za povezivanje DNK-a)	1	Propilenska mikropločica s modificiranom silikonskom membranom	od 2 °C do 8 °C
Resuspension Buffer (Pufer za resuspendiranje)	1	Puferirana vodena otopina	od 2 °C do 8 °C
Sample Purification Beads (Zrnca za pročišćavanje uzorka)	1	Paramagnetska zrnca u krutoj fazi u puferiranoj vodenoj otopini	od 2 °C do 8 °C
DNA Quantification Reagent (Reagens za kvantifikaciju DNK-a)	1	Interkalirajuća boja za DNK u DMSO-u	od 2 °C do 8 °C
DNA Quantification Standard (Standard kvantifikacije DNK-a)	1	Standard za dsDNK, nespecifični DNK i natrijev azid u puferiranoj vodenoj otopini	od 2 °C do 8 °C

VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, epruvete i naljepnice za tijek rada

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

Naziv stavke na naljepnici	Broj stavki u kompletu	Skladištenje
Label (LBL)–Plate Barcode (Naljepnica (LBL) – barkod pločice)	9	od 15 °C do 30 °C
Label (LBL)–Deep-well Plate Barcode (Naljepnica (LBL) – barkod pločice s dubokim jažicama)	12	od 15 °C do 30 °C
Tube (TB)–Empty Pooling Tube (Epruveta (TB) – prazna epruveta za skupljanje)	5	od 15 °C do 30 °C

Reagensi koji nisu priloženi

Obavezni reagensi koji nisu priloženi

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

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

Neobavezni reagensi koji nisu priloženi

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

Skladištenje i rukovanje

1. Sobna je temperatura definirana kao temperatura od 15 °C do 30 °C.
2. Svi reagensi namijenjeni su isključivo jednokratnoj upotrebi. Kad se reagensi pripreme za upotrebu, moraju se odmah upotrijebiti.
3. Ako su bilo koje pakiranje ili sadržaj komponenti za VeriSeq NIPT Solution oštećeni ili načeti, obratite se službi za korisnike tvrtke Illumina.
4. Reagensi su stabilni kad se skladište kako je navedeno do datuma isteka roka trajanja navedenog na naljepnicama na kompletima. Uvjete skladištenja potražite u stupcu Skladištenje u tablicama iz odjeljka [Reagensi](#). Ne upotrebljavajte reagense kojima je istekao rok trajanja.

5. Promjene fizičkog izgleda reagensa mogu upućivati na propadanje materijala. Ako se primijete promjene u fizičkom izgledu (npr. očite promjene boje reagensa ili vidljiva zamućenost uz kontaminaciju mikrobima), reagense nemojte upotrebljavati.
6. Pridržavajte se sljedećih najboljih primjera iz prakse dok rukujete zrnima za pročišćavanje uzoraka.
 - Nikad ne zamrzavajte zrnca.
 - Prije upotrebe zrnaca pričekajte da poprime sobnu temperaturu.
 - Neposredno prije upotrebe promiješajte zrnca dok ne budu dobro suspenzirana i boja se čini homogena.
7. Lysis Buffer, Wash Buffer I, Wash Buffer II, Elution Buffer i Proteinase Buffer mogu stvarati vidljive taloge ili kristale. Prije upotrebe energično ih promiješajte, a zatim vizualno provjerite ima li taloga.
8. Nikad ne zamrzavajte punu krv nakon prikupljanja.
9. Sekvencirajte biblioteke što prije nakon stvaranja skupova. Biblioteke sa stvorenim skupovima stabilne su najviše sedam dana na temperaturi od -25 °C do -15 °C. Nije nužna dodatna denaturizacija ako su skladištene to vremensko razdoblje u tim uvjetima.

Oprema i materijal

Obavezna oprema i materijal koji nisu priloženi

Oprema koja je obavezna, a ne dolazi s proizvodom

Oprema	Dobavljač
Sustav za sekvenciranje nove generacije (NGS, next-generation sequencing) sa sljedećim mogućnostima: <ul style="list-style-type: none"> • sekvenciranje 2 x 36 bp s uparenim krajevima • kompatibilnost s prilagodnicima s dvostrukim indeksom za VeriSeq NIPT Sample Prep Kit • automatsko generiranje BCL datoteka • dvokanalna kemija • 400 milijuna čitanja uparenih krajeva po obradi • Kompatibilno sa softverom VeriSeq NIPT Assay Software v2 ili sustavom NextSeq 550Dx Sequencing System. 	Dobavljač instrumenta ili Illumina, broj dijela 20005715
Zamrzivač, od -25 °C do -15 °C	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Mikrocentrifuga	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Držać za pipete	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Hladnjak, od 2 °C do 8 °C	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora

Oprema	Dobavljač
Jednokanalne pipete od 20 µl	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Jednokanalne pipete od 200 µl	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Jednokanalne pipete od 1000 µl	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Vrtložna miješalica	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Sklop centrifuge i rotora za epruvete za prikupljanje krvi	
<p>Ekvivalent:</p> <ul style="list-style-type: none"> Hlađena centrifuga ubrzanja do 1600 × g bez mogućnosti kočenja Njišući rotor sa spremnicima Umetci za spremnike minimalne dubine od 76 mm Prilagodnici za umetanje epruveta za prikupljanje krvi dimenzija 16 mm x 100 mm 	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
<p>Preporučeno:</p> <ul style="list-style-type: none"> Allegra X12R Series Centrifuge, 1600 g Allegra Centrifuge GH-3.8 Rotor sa spremnicima Allegra Centrifuge Bucket Covers, komplet od dva komada Allegra Centrifuge Adapter Assembly, 16 mm, komplet od četiri komada 	<p>Beckman Coulter, broj artikla 392304 (120 V ili 230 V)</p> <p>Beckman Coulter, broj artikla #369704</p> <p>Beckman Coulter, broj artikla #392805</p> <p>Beckman Coulter, broj artikla #359150</p>
Sklop centrifuge i rotora za mikropločice	
<p>Ekvivalent:</p> <ul style="list-style-type: none"> Relativna centrifugalna sila (RCF) 5600 × g Rotor s njišućim pladnjem s nosačima pladnjeva s 96 jažica, minimalna dubina 76,5 mm. Multifuge X4 Pro-MD 120 V TX-1000BT Sorvall Legend XTR Centrifuge 	<p>Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora</p> <p>Thermo Fisher Scientific broj 75016034 Thermo Fisher Scientific, kataloški broj 75004521 (120 V) ili kataloški broj 75004520 (230 V)</p>

Oprema	Dobavljač
<ul style="list-style-type: none"> HIGHPlate 6000 Microplate Rotor Rotor high plate 6000 Potporna baza za mikropločice <ul style="list-style-type: none"> Preporučeno: <ul style="list-style-type: none"> MicroAmp 96-Well Support Base 96-Well PCR Plate Carrier 	Thermo Fisher Scientific, katalogski broj 75003606 Thermo Scientific VWR katalogski broj 97040-244 Thermo Fisher Scientific, katalogski broj 4379590 Thermo Fisher Scientific, katalogski broj AB-0563/1000
Jedan od sljedećih čitača mikropločica ili ekvivalentan (fluorometar) sa softverom SoftMax Pro v6.2.2 – 7.1.2: <ul style="list-style-type: none"> Gemini XPS SpectraMax M2, M3, M4 i M5. <ul style="list-style-type: none"> Uz čitač mikropločica potreban je ljubičasti umetak da bi se upotrebljavao u tijeku rada. 	Molecular Devices, broj dijela XPS Molecular Devices, broj dijela M2, M3, M4 i M5
SpectraMax High-Speed USB, Serial Adapter	Molecular Devices, broj dijela 9000-0938
Ciklički termostat sljedećih specifikacija: <ul style="list-style-type: none"> Grijani poklopac Temperaturni raspon od 4 °C do 98 °C Temperaturna preciznost ± 2 °C Minimalni korak pojačavanja 2 °C/s Kompatibilan s pločicom Twin.tec PCR Plate 96-well, punog profila 	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
VeriSeq NIPT Microlab STAR	Hamilton, broj dijela 95475-01 (115 V), broj dijela 95475-02 (230 V) ili broj dijela 806288 (za Hamilton Company Bonaduz)
VeriSeq Onsite Server v2 ili nadograđeni VeriSeq Onsite Server	illumina, broj dijela 20028403 ili 20047000 (v2) ili 20101927 ili broj 15076164 ili broj 20016240 (nadograđeno)
Ako se upotrebljava NextSeq 550Dx Sequencing System: <ul style="list-style-type: none"> NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5, 75 cycles 	illumina, broj dijela 20028870

Neobavezna oprema, nije priložena

Oprema	Dobavljač
Pluggo Decapper System	LGP Consulting, broj dijela # 4600 4450

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

Obavezan materijal koji nije priložen

Potrošni materijal	Dobavljač
1000 µl Conductive Non-Sterile Filter Tips	Hamilton, broj dijela 235905
300 µl Conductive Non-Sterile Filter Tips	Hamilton, broj dijela 235903
50 µl Conductive Non-Sterile Filter Tips	Hamilton, broj dijela 235948
<p>Spremnik s dubokim jažicama sljedećih specifikacija:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Format mikropločice SLAS 1–2004 s 96 jažica s piramidalnim ili konusnim dnom minimalnog kapaciteta 240 ml. • Polipropilen s preferencijom za slabo vezanje DNA za sve kontaktne površine uzorka. • Interne dimenzije (razina tekućine) kompatibilne su s koracima automatske aspiracije i pipetiranja za VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Dimenzije visine kompatibilne su s automatiziranim pokretima uređaja VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	<p>Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora</p> <p>Kompatibilni spremnici:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Corning Axygen, broj proizvoda RES-SW96-HP-SI • Agilent, broj proizvoda 201246-100
<p>Posuda s reagensima sa sljedećim specifikacijama:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Posuda koja čvrsto, ali bez primjene sile, sjeda u nosač uređaja VeriSeq NIPT Microlab STAR s konusnim dnom i minimalnog kapaciteta 20 ml. • Polipropilen bez RNaze/DNaze. • Interne dimenzije spremnika (razina tekućine) generiraju razine tekućine uz pomoć volumena ragensa analize i kompatibilne su s koracima automatske aspiracije i pipetiranja za VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Dimenzije visine kompatibilne su s automatiziranim pokretima uređaja VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	<p>Kompatibilne posude:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Illumina Reagent Tub, broj dijela 20095418

Potrošni materijal	Dobavljač
<p>Pločice s dubna stranici okim jažicama sa sljedećim specifikacijama:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Format mikropločice SLAS 1–2004, 3–2004 i 4–2004 s 96 jažica s piramidalnim ili konusnim dnom minimalnog kapaciteta jažice 2 ml. • Prozirni polipropilen s preferencijom za slabo vezanje DNA materijala za sve kontaktne površine uzorka. • Dimenzije jažica generiraju razinu tekućine koja je kompatibilna s koracima automatske aspiracije i pipetiranja za VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Širina pločice koja dopušta smještanje barkodova za pločice na odgovarajući položaj uz čvrsto prianjanje na ravnu površinu. • Okvir otporan na torziju može podnijeti minimalno 5600 x g. • Dimenzije visine pločica kompatibilne su s automatiziranim pokretima uređaja VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	<p>Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora</p> <p>Kompatibilne pločice:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, broj dijela 0030505301 • Eppendorf, broj dijela 30502302 • USA Scientific, broj dijela 1896-2000
<p>Pločica s 384 jažica i sljedećim specifikacijama:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mikropločica s 384 jažice optimizirana za male zapremine s minimalnim kapacitetom jažice 50 µl. • Crni neprozirni polistiren s blokiranjem svjetlosti i slabim vezanjem DNA za sve kontaktne površine uzorka. • Dimenzije jažica generiraju razine tekućine koje su kompatibilne s koracima automatske aspiracije i pipetiranja za VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Dimenzije visine pločica kompatibilne su s automatiziranim pokretima uređaja VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Širina pločice koja dopušta smještanje barkodova za pločice na odgovarajući položaj uz čvrsto prianjanje na ravnu površinu. 	<p>Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora</p> <p>Kompatibilne pločice:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Corning, broj proizvoda # 3820

Potrošni materijal	Dobavljač
<p>Pločica s 96 jažica i sljedećim specifikacijama:</p> <ul style="list-style-type: none"> Mikropločica s okvirom otpornim na torziju može podnijeti minimalno 5600 x g i 96 prozirnih jažica sa suženim dnom, povišenim rubovima i minimalnim kapacitetom jažice 150 µl. Polipropilen bez RNaze/DNaze sa slabim vezanjem DNA za sve kontaktne površine uzorka. Dimenzije jažica generiraju razine tekućine kompatibilne s koracima automatske aspiracije i pipetiranja za VeriSeq NIPT Microlab STAR. Dimenzije visine pločica kompatibilne su s automatiziranim pokretima uređaja VeriSeq NIPT Microlab STAR. <p>NAPOMENA: kompatibilno plastično posuđe s drugim brojevima dijela, primjerice kompatibilne pločice s 96 jažica drugih proizvođača, možda se neće moći izravno zamijeniti bez kalibracije specifične za dio na sustavu VeriSeq NIPT Microlab STAR koju provodi osoblje servisa i podrške tvrtke Illumina. Da biste zamijenili plastično posuđe, obratite se timu za podršku tvrtke Illumina.</p> <ul style="list-style-type: none"> Širina pločice koja dopušta smještanje barkodova za pločice na odgovarajući položaj uz čvrsto prianjanje na ravnu površinu. Kompatibilno s termociklerima za denaturiranje. 	<p>Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora</p> <p>Kompatibilne pločice:</p> <ul style="list-style-type: none"> Eppendorf, broj dijela 0030129512 Eppendorf, broj dijela 30129580 Eppendorf, broj dijela 30129598 Eppendorf, broj dijela 30129660 Eppendorf, broj dijela 30129679 Bio-Rad, broj dijela HSP9601
<p>Jedan od sljedećih zatvarača:</p> <ul style="list-style-type: none"> Microseal 'F' Foil Zatvarači od folije 	<p>Bio-Rad, kataloški broj MSF1001 Beckman Coulter, broj artikla 538619</p>
Cell-Free DNA BCT CE	Streck, kataloški broj 218997
Push Caps	Sarstedt, broj narudžbe 65.802
Epruvete od 2 ml s navojnim čepovima	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Vrhovi za pipete s filtrom od 20 µl za pipetu od 20 µl	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Vrhovi za pipete s filtrom od 200 µl za pipetu od 200 µl	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Vrhovi za pipete s filtrom od 1000 µl za pipetu od 1000 µl	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora

Potrošni materijal	Dobavljač
Ekvivalent: <ul style="list-style-type: none"> • Sprej za brzu dezinfekciju na bazi alkohola • Otopina deterdženta za dezinfekciju Preporučeno: <ul style="list-style-type: none"> • Deionizirana voda i 70-postotni etanol 	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora

Neobavezni materijal, nije priložen

Potrošni materijal	Dobavljač
Dulbeccova fosfatom puferirana fiziološka otopina (DPBS) za negativnu kontrolu (NTC)	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Epruveta, čep s navojem, 10 ml (samo za kontrolne uzorke)	Sarstedt, broj narudžbe 60.551
Epruveta, čep s navojem, 50 ml	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Serološke pipete od 25 ml	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Serološke pipete od 10 ml	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora

Prikupljanje, transport i pohrana uzoraka



OPREZ

Svim uzorcima rukujte kao da su potencijalno zarazne tvari.

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



OPREZ

Izlaganje povišenim temperaturama, odnosno onima iznad navedenih raspona, može negativno utjecati na stope neuspjeha pojedinačnog uzorka i/ili učinkovitost uzorka.

Upozorenja i mjere opreza

- Ova analiza sadrži reagens Proteinase K. Uslijed udisanja, gutanja te dodira s kožom i očima može doći do tjelesnih ozljeda. Upotrebljavajte u dobro prozračenom prostoru, nosite zaštitnu odjeću, izbjegavajte udisanje prašine i bacite u otpad sve spremnike i neiskorišten sadržaj u skladu s primjenjivim državnim sigurnosnim standardima.
- Ova analiza sadrži gvanidinijev klorid. Uslijed udisanja, gutanja te dodira s kožom i očima može doći do tjelesnih ozljeda. Upotrebljavajte u dobro prozračenom prostoru, nosite zaštitnu odjeću i bacite u otpad sve spremnike i neiskorišten sadržaj u skladu s primjenjivim lokalnim državnim sigurnosnim standardima.
- Ova analiza sadrži zapaljivu kemikaliju 2-propanol. Držite je podalje od topline i otvorenog plamena. Uslijed udisanja, gutanja te dodira s kožom i očima može doći do tjelesnih ozljeda. Upotrebljavajte u dobro prozračenom prostoru, nosite zaštitnu odjeću i bacite u otpad sve spremnike i neiskorišten sadržaj u skladu s primjenjivim lokalnim državnim sigurnosnim standardima.
- Ova analiza sadrži dimetilni sulfoksid, korozivnu i zapaljivu tekućinu. Uslijed udisanja, gutanja te dodira s kožom i očima može doći do tjelesnih ozljeda. Upotrebljavajte u dobro prozračenom prostoru, nosite zaštitnu odjeću i bacite u otpad sve spremnike i neiskorišten sadržaj u skladu s primjenjivim lokalnim državnim sigurnosnim standardima.
- Da biste spriječili stvaranje štetnih plinova, ne bacajte otpad nakon izdvajanja cfDNK-a (koji sadrži gvanidin-hidroklorid) s otpadom koji sadrži izbjeljivač (natrijev hipoklorit).
- Svim uzorcima rukujte kao da sadrže potencijalno zarazne tvari.
- Primjenjujte uobičajene laboratorijske mjere opreza. Nemojte pipetirati ustima. Nemojte jesti, piti ni pušiti u prostorima namijenjenima za rad. Pri rukovanju s uzorcima i reagensima za analizu nosite jednokratne rukavice i laboratorijske kute. Nakon rukovanja uzorcima i reagensima za analizu temeljito operite ruke.
- Ne upotrebljavajte komponente analize nakon datuma isteka valjanosti navedenog na naljepnici na pakiranju analize. Ne upotrebljavajte komponente iz analiza iz drugih serija. Serije analiza navedene su na naljepnici na pakiranju analize. Pohranite komponente analize na navedenoj temperaturi.
- Da biste spriječili degradaciju uzorka ili reagensa, prije pokretanja protokola provjerite jesu li se sva isparavanja natrijeva hipoklorita posve izvjetrila.
- Nepridržavanje navedenih procedura može rezultirati netočnim rezultatima ili znatnim smanjenjem kvalitete uzoraka.
- Sve ozbiljne incidente povezane s ovim proizvodom odmah prijavite tvrtki Illumina i nadležnim tijelima država članica u kojima borave korisnik i pacijent.
- Informacije o zaštiti okoliša, zdravlju i sigurnosti potražite u sigurnosno-tehničkom listu (SDS-u) na web-mjestu support.illumina.com/sds.html.

Napomene povezane s postupkom

Izbjegavanje kontaminacije

- Upotrebljavajte nove vrhove i novo potrošno laboratorijsko posuđe.
- Upotrebljavajte vrhove otporne na aerosol da biste smanjili opasnost od prijenosa i unakrsne kontaminacije uzoraka.
- Zbog moguće kontaminacije osobito pazite da sadržaj jažica ostane posve u njima. Pazite da sadržaj ne prska. Centrifugirajte nakon svakog koraka miješanja.
- Pridržavajte se primjenjivih propisa za pravilne laboratorijske prakse i higijenu prilikom rukovanja krvlju i krvnim proizvodima.
- Prilikom pripreme biblioteke ne upotrebljavajte sprejeve s izbjeljivačem u aerosolu. Kontaminacija izbjeljivačem u tragovima može rezultirati neuspjehom analizom.
- Pri otvaranju pločica pazite da pločicu postavite na čvrstu i ravnu površinu te da je čvrsto držite. Polako uklonite brtvu pazeći da ne dođe u kontakt s izloženim jažicama. Nemojte dirati izložene jažice ni mućkati sadržaj. Zbog unakrsne kontaminacije između jažica može doći do netočnih rezultata.

Čišćenje platforme VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Prije upotrebe pregledajte je li platforma čista. Najmanje jednom tjedno napravite tjedno održavanje i slijedite ove upute za čišćenje.
- Uklonite sve nosače koji se mogu izvaditi te ih očistite alkoholnim brzim dezinficirajućim sprejom, deioniziranom vodom i 70-postotnim etanolom i ostavite ih da se osuše. Ako su jako prijavili, nakon toga ostavite ih da se namaču u otopini deterdženta za dezinfekciju, isperite sredstvom za dezinfekciju na bazi alkohola i ostavite da se osuše.
- Otvorite prednji poklopac i obrišite platformu krpom namočenom deioniziranom vodom i 70-postotnim etanolom. Posebno se mora provjeriti čistoća kliznih blokova.
- Uklonite granu osnovnog vakuumskeg sustava (BVS, Basic Vacuum System) i očistite granu, brtvu i unutrašnje odjeljke BVS-a krpom. Nemojte čistiti brtvu etanolom jer on može učiniti taj materijal krtim.
- Ispraznite otpadne vrhove kutije CORE 96-head i nezavisnog kanala.
- Uklonite pločicu za izbacivanje vrhova nezavisnog kanala na stanici za otpadne vrhove i očistite je: poprskajte deioniziranu vodu i 70-postotni etanol izravno na površinu i obrišite. Navucite novu plastičnu vrećicu na okvir i ponovno ga pričvrstite. Vratite na mjesto čistu pločicu za izbacivanje vrhova.
- Poprskajte deioniziranu vodu i 70-postotni etanol izravno na površinu kutije za otpad i tunela CORE 96-head i obrišite je.

- Ako je teško ukloniti naslage s kutija za otpadne vrhove, brišite ih krpom namočenom vodom bez DNaze/RNaze dok se naslage ne uklone. Na odgovarajući način bacite krpu u otpad. Nastavite tako da sterilizirate kutiju sredstvom za dezinfekciju na bazi alkohola.
- Navlažite krpu koja ne ostavlja niti ili štapić s vatom 70-postotnim etanolom. Prebrišite prozor laserskog skenera na čitaču barkoda. Pomoću iste krpe ili štapića očistite svaku jažicu CPAC adaptera za pločice. Ako upotrebljavate krpu, utisnite je u svaku jažicu adaptera pomoću olovke da biste bili sigurni da je unutrašnjost jažice temeljito očišćena.
- Očistite nezavisne kanale:
 - Na nezavisnim kanalima očistite rukav za izbacivanje vrhova (vanjski dio kanala za pipetiranje) krpom koja ne ostavlja niti natopljenom deioniziranom vodom i 70-postotnim etanolom. (pogledajte *Referentni priručnik za Hamilton Microlab STAR, broj 15070074*).
 - Očistite disk za zaustavljanje i prstenove glave za pipetiranje (vanjski dio kanala za pipetiranje) krpom koja ne ostavlja niti natopljenom deioniziranom vodom i 70-postotnim etanolom.
- Očistite kutiju CORE 96-head:
 - Istom krpom koja ne ostavlja niti natopljenom deioniziranom vodom i 70-postotnim etanolom očistite kućište kutije 96-head i dno diskova za zaustavljanje.
 - Istom krpom ili trakom krpe natopljene deioniziranom vodom i 70-postotnim etanolom prođite kroz otore oko bočnih dijelova kanala za pipetiranje kutije 96-head da biste očistili prstenove. Ponovite taj postupak za sve kanale za pipetiranje na kutiji 96-head.
- Poprskajte prednji i bočni poklopac deioniziranom vodom i 70-postotnim etanolom te ih obrišite.
- Očistite zaštitnu vrpču automatskog umetanja krpom natopljenom deioniziranom vodom i 70-postotnim etanolom te je obrišite, ali bez pritiskanja.
- Kad se platforma i komponente posve osuše, zamijenite nosače.

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

Kontrola kvalitete

Kontrolni materijal s poznatim karakteristikama radnih svojstava može se procijeniti radi određivanja razlika u obradi i tehničkim postupcima u laboratoriju.

Obrada kontrolnog uzorka ili kontrole bez predloška smanjuje ukupan broj nepoznatih majčinskih uzoraka koji se mogu obrađivati uz pomoć svake pripreme uzoraka.

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

Upute za upotrebu

Savjeti i tehnike

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

Označavanje pločica barkodovima

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

Brtvljenje i odbrtvljivanje pločice

- Budite iznimno oprezni da ne bi došlo do unakrsne kontaminacije – na donjoj strani brtve ne smije biti vidljive tekućine.
 - Pazite da izložena donja strana brtve ne dođe u kontakt s izloženim jažicama.
 - Pazite da ne dirate izložene jažice.
- Uvijek zabrtvite pločicu s 96 jažica prije prijelaza na sljedeće korake u protokolu:
 - korake centrifuge
 - korake termalnog cikliranja.
- Da biste zabrtvili pločicu, stavite ljepljivu foliju na pločicu i zatim je zabrtvite. Primijenite pritisak preko cijele pločice i brtvu dobro nategnite preko svake jažice.
- Prije otvaranja pločice učinite sljedeće:
 - Kratko centrifugirajte pločicu s 96 jažica na 1000 × g tijekom 20 sekundi.
 - Stavite pločicu na ravnu površinu i polako uklonite brtvu.

VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Prije upotrebe napravite i dokumentirajte obavezno održavanje u skladu s uputama proizvođača.
- Promatrajte ML STAR tijekom automatiziranih koraka. Pratite sučelje softvera VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 radi upita i uputa za rukovatelja.
- Tijekom rada držite na mjestu prednji poklopac.
- Neka platforma bude prazna tijekom rada.
- Ako se tijekom otklanjanja pogreške prikaže opcija **Exclude** (Izuzmi), nemojte je ni u kojem slučaju odabrati. Ako metoda ne može nastaviti nakon rješavanja pogreške ili su opcije rješavanja pogreške ograničene, otkazite obradu.
- Tijekom koraka vakuumiranja pločice, ako to od vas zatraži VeriSeq NIPT Workflow Manager v2, ručno formirajte brtvu između pločice i vakuumske grane.

- Omogućite da sustav automatski baci u otpad vrhove s adaptera. Nemojte ručno uklanjati vrhove ako to softver od vas ne zatraži.
- Uklonite potrošene reagense i potrošni materijal kad to Workflow Manager od vas zatraži.
- Svakodnevno praznite velike staklene boce vakuumskog otpada. Prva velika staklena boca nikad ne smije biti puna više od polovice. Preljev vakuumskog otpada može oštetiti vakuumsku pumpu i oslabiti vakuum koji sustav primjenjuje.
- Za serije s 24, 48 i 96 uzoraka prije pokretanja metode umetnite puni stalak pojedinačno izbrojenih 8-kanalnih vrhova.

Obrada uzoraka

Postupak

1. Izvedite sljedeće korake za svaki alikvot:
 - a. Centrifugirajte uzorke označene barkodom na 1600 × g u trajanju 10 minuta pri 4 °C s isključenom kočnicom.
 - b. Kad se centrifuga potpuno zaustavi, uklonite epruvete s uzorcima.
S izolacijom plazme započnite unutar 15 minuta od centrifugiranja. Ako prođe više od 15 minuta, ponovite centrifugiranje.
2. Pregledajte svaku epruvetu da biste utvrdili prikladnost uzorka potvrđujući sljedeće:
 - Zapremina uzorka odgovara očekivanju.
 - Nakon centrifugiranja uzorka vidljivo je jasno razdvajanje slojeva crvenih krvnih zrnaca i plazme.
 - Razina plazme najmanje je 1,5 ml iznad koncentrata eritrocita bez sloja leukocita i trombocita („buffy coat”).
 - Da uzorak nije dostatno hemoliziran (tj. plazma izgleda tamnocrveno).
 - Uzorak nije lipemičan (tj. plazma ne izgleda mutno ni mliječno i neprozirno).
 - Da uzorak ne sadrži ugruške.



OPREZ

Uzorci koji su nepravilno skladišteni ili je njima nepravilno rukovano mogu postati neprikladni. Ako se u tijeku rada obrade neprikladni uzorci, oni mogu začepiti pločicu za vezivanje tijekom izdvajanja, što pak može uzrokovati prelijevanja uzoraka u susjedne jažice.

3. Skinite čep s epruveta pa ih postavite na nosače epruveta. Umetnite sve uzorke i sve kontrole za plazmu za tu seriju.

**OPREZ**

Ako vam se tijekom rješavanja pogreške ponudi mogućnost Exclude (Izuzmi), nemojte je odabrati. Ako metoda ne može nastaviti nakon rješavanja pogreške, a opcije rješavanja pogreške ograničene su, otkazite obradu.

Izoliranje plazme

Priprema

1. Označite 1 pločicu s dubokim jažicama kao posredničku plazmu i nalijepite barkod.
2. Označite 1 pločicu s dubokim jažicama kao završnu plazmu i nalijepite barkod.
3. Za serije s 24, 48 i 96 uzoraka prije pokretanja metode umetnite puni stalak pojedinačno izbrojenih 8-kanalnih vrhova.

**OPREZ**

Pripazite da upotrebljavate odgovarajuću pločicu za pločice s posredničkom plazmom i završnom plazmom. Upotreba spremnika s dubokim jažicama umjesto pločice s dubokim jažicama može dovesti do amalgamacije uzoraka i posljedično do netočnih rezultata.

Postupak

1. Otvorite AppLauncher pa odaberite **VeriSeq NIPT Method**.
2. Unesite jedinstveni ID serije i korisničko ime pa odaberite **OK** (U redu).
ID serije može sadržavati ≤ 26 znakova. Možete upotrebljavati brojeve, slova, podvlake () ili spojnice (-).
Na primjer: 2025-10-16_serija3.
U ID-u serije ne razlikuju se velika i mala slova. ID-ovi u kojima se razlikuju mala i velika slova, pri čemu je njihov raspored identičan, ne smatraju se jedinstvenima.
Nazivi serija moraju biti jedinstveni i ne smiju se razlikovati samo po velikim ili malim slovima. Na primjer, nazivi serija Serija01 i serija01 nisu jedinstveni. Isto se pravilo primjenjuje i na nazive ID-a uzorka.
3. Odaberite **New Batch** (Nova serija).
4. Nakon inicijalizacije odaberite **OK** (U redu) da biste pokrenuli izolaciju plazme.
5. Odaberite veličinu serije pa **OK** (U redu).
6. Odaberite broj kontrola bez predloška (NTC, no template control) pa **OK** (U redu).
Utori za NTC-ove uvijek su posljednji odabrani utori. Primjerice, ako su u obradi 24 uzorka dva NTC-a, položaji 23 i 24 su NTC-ovi.
7. Izvedite neki od sljedećih koraka:
 - Da biste učitali postojeći list s uzorcima, odaberite list s uzorcima povezan sa serijom pa **OK** (U redu).
 - Da biste nastavili bez odabira lista s uzorcima, odaberite **No Sample Sheet** (Bez lista s uzorcima).

Da biste saznali više o stvaranju lista s uzorcima, pročitajte *Vodič za softver VeriSeq NIPT Solution v2 (broj dokumenta: 1000000067940)*.

NAPOMENA Vrsta uzorka, tj. jednoplodni ili blizanački, mora se točno zabilježiti za svaki uzorak da bi se osigurala odgovarajuća analiza podataka. Ako odaberete **No Sample Sheet** (Bez lista s uzorcima), provjerite jeste li postavili zadane vrijednosti uzoraka u alatu Workflow Manager Service Tools. Dodatne informacije potražite u *Vodiču za softver VeriSeq NIPT Solution v2 (broj dokumenta 1000000067940)*.

8. Provjerite jesu li nalijepljeni svi barkodovi, a zatim umetnite uzorke, vrhove i pločice (s barkodom okrenutim udesno) na nosač.
9. Odaberite **OK** (U redu) nakon svakog upita prilikom umetanja.

Veličina serije uzorka	Vrsta nosača	Staza	Stavka	Položaj
24, 48, 96	Vrh	7 – 12	Vrhovi od 1000 µl	5
			Vrhovi od 1000 µl (samo serija s 96)	4, 5
	Epruveta	15	Pripremljene epruvete s uzorcima krvi 1 – 24 (za serije svih veličina)	1 – 24
	Epruveta	16	Pripremljene epruvete s uzorcima krvi 25 – 48 (samo za serije veličine 48 i 96)	25 – 48
	Epruveta	17	Pripremljene epruvete s uzorcima krvi 49 – 72 (samo za serije veličine 96)	49 – 72
	Epruveta	18	Pripremljene epruvete s uzorcima krvi 73 – 96 (samo za serije veličine 96)	73 – 96
	Multiflex	19 – 24	Prazna pločica s dubokim jažicama, završna plazma – s barkodom	4
	Multiflex	19 – 24	prazna pločica s dubokim jažicama, Intermediate Plasma – s barkodom	5
	Reagens	47	[neobavezno] Dulbeccova fosfatom puferirana fiziološka otopina (DPBS) – upotrebljava se za kontrolu bez predloška (NTC)	5

10. Provjerite jesu li nosači, laboratorijsko posuđe i reagensi pravilno umetnuti.
11. Na zaslonu Pre-Spin Deck Verification (Provjera valjanosti platforme prije centrifugiranja) odaberite **OK** (U redu).
12. Promatrajte ML STAR dok izvodi automatizirane korake.
13. Kad to od vas zatraži Workflow Manager, provjerite da na platformi za umetanje uređaja ML STAR nema nikakvih prepreka kako bi ML STAR mogao izvaditi nosače.

14. Odaberite **Unload** (Isprazni) da biste ispraznili platformu.
15. Na sljedeći način izvadite pločicu s dubokim jažicama s posredničkom plazmom.
 - a. Provjerite je li u svakoj jažici na pločici isti volumen (nije bilo pogreška prilikom pipetiranja). Očekivani je volumen 1000 µl.
 - b. Zabilježite sve nedosljednosti po dovršetku postupka izolacije plazme.
 - c. Zabrtvite pločicu, umetnite s balansom i centrifugirajte na 5600 × g 10 minuta s isključenom kočnicom ili na najnižoj postavci.
16. Odaberite **Yes** (Da) da biste prešli na pripremu završne plazme.
17. Uklonite brtvu s pločice pa je ponovno postavite na nosač.

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

18. Potvrdite okvir **Intermediate Plasma plate has been spun** (Pločica s posredničkom plazmom je centrifugirana) pa odaberite **OK** (U redu).
19. Promatrajte ML STAR dok izvodi automatizirane korake.
20. Kad to od vas zatraži Workflow Manager, provjerite da na platformi za umetanje uređaja ML STAR nema nikakvih prepreka kako bi ML STAR mogao izvaditi nosače.
21. Odaberite **Unload** (Isprazni) da biste ispraznili platformu.
22. Kada Workflow Manager to zatraži, ispraznite nosače i platformu.
23. Uklonite ploču dubokih jažica s konačnom plazmom.
24. Provjerite da na pločici nema sljedećih pogrešaka:
 - različit volumen u jažicama; očekivani je volumen 900 µl
 - vidljivih staničnih peleta
 - prekomjerna hemoliza.

Ako zamijetite vidljive abnormalne stanične pelete ili prekomjernu hemolizu, na kraju metode izolacije plazme poništite zahvaćeni uzorak ili upotrijebite Batch Manager. Dodatne informacije o alatu Batch Manager potražite u dokumentu *Vodič za softver VeriSeq NIPT Solution v2 (dokument br. 1000000067940)*.
25. Kad Workflow Manager to od vas zatraži, odaberite **OK** (U redu).
26. Unesite komentare o zahvaćenim jažicama pa odaberite **OK** (U redu).
27. Izvedite neki od sljedećih koraka.
 - Da biste nastavili s izdvajanjem cfDNK-a, odaberite **Yes** (Da).
 - Da biste zaustavili postupak, odaberite **Exit** (Izlaz).

TOČKA SIGURNOG PREKIDANJA

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

Izdvajanje cfDNK-a**Priprema**

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

Reagens	Skladištenje	Upute
Pločica s dubokim jažicama s konačnom plazmom	od 2 °C do 8 °C	Ako je bila prethodno uskladištena, ostavite je 30 minuta da poprimi sobnu temperaturu. Centrifugirajte na 1000 × g tijekom 20 sekundi. Prije upotrebe odbrtvite pločicu s dubokim jažicama s konačnom plazmom.

3. Polako dodajte 3,75 ml pufera proteinaze u svaku bočicu s reagensom proteinaze K.
 - Pripremite 3 bočice za 24 i 48 uzorka.
 - Pripremite 4 bočice za 96 uzoraka.
4. Začepite bočice s proteinazom K i miješajte u miješalici dok se ponovno ne suspendiraju.

**OPREZ**

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

5. Sakupite pripremljenu proteinazu K iz svih bočica u posudu s reagensom i označite ih kao proteinazu K.
6. U svaku bočicu za reagens s puferom Wash Buffer II dodajte 100 ml 100-postotnog EtOH.
 - Pripremite 1 bocu za 24 i 48 uzoraka.
 - Pripremite 2 boce za 96 uzoraka.
7. Preokrenite bočice s puferom Wash Buffer II radi miješanja.
8. Potvrdite okvire na bočicama s puferom Wash Buffer II.
9. Označite 1 novu pločicu pune širine kao posredničku i nalijepite barkod pločice.
10. Označite 1 novu pločicu pune širine kao ispiranje cfDNK-a i nalijepite barkod pločice.
11. Označite 1 novu pločicu s dubokim jažicama kao posredničku za izdvajanje i nalijepite barkod pločice s dubokim jažicama.

12. Nalijepite barkod pločice na pločicu za povezivanje DNK-a.
13. Postavite zaštitnu foliju na neiskorištene jažice serija od 24 i 48 uzoraka.
14. Pripremite otopinu za čišćenje od 70-postotnog etilnog alkohola (70 % EtOH, 30 % vode bez DNaze/RNaze) za čišćenje vakuumnog sustava.
15. Na sljedeći način pripremite vakuumski sustav.
 - a. Uklonite vakuumsku granu i očistite 70-postotnim etilnim alkoholom.
Nemojte čistiti brtvu etilnim alkoholom jer on može učiniti taj materijal krtim.
 - b. Ispraznite vakuumski otpad.
 - c. Provjerite je li vakuumski sustav platforme ML STAR uključen.

Postupak

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



OPREZ

Prije pokretanja metode za serije od 24, 48 i 96 uzoraka dodajte puni stalak s 8-kanalnim vrhovima.

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

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

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

5. Unesite lokaciju prvog i posljednjeg vrha za svaki stalak s vrhovima pa odaberite **OK** (U redu).

6. Očitajte barkodove na kutiji za izdvajanje.
7. Unesite korisničko ime ili inicijale osobe koja priprema reagense pa odaberite **OK** (U redu).
8. Očitajte barkodove na kutiji za dodatnu opremu.
9. Unesite korisničko ime ili inicijale osobe koja priprema reagense pa odaberite **OK** (U redu).
10. Provjerite jesu li barkodovi nalijepljeni.
11. Po potrebi otvorite pločicu s dubokim jažicama s konačnom plazmom.
12. Na sljedeći način umetnite pločice (s barkodom okrenutim udesno) na nosač pločice pa odaberite **OK** (U redu).

Veličina serije uzorka	Vrsta nosača	Staza	Stavka	Položaj
24, 48, 96	Multiflex	19 – 24	Nova pločica pune širine, posrednička, s barkodom	1
			Nova pločica pune širine, ispiranje cfDNK-a, s barkodom	2
			Nova pločica s dubokim jažicama, posrednička za izdvajanje, s barkodom	4
			Pločica s dubokim jažicama za konačnu plazmu, s barkodom	5

13. Provjerite je li pločica za povezivanje DNK-a označena barkodom pa odaberite **OK** (U redu).
14. Za serije s nepunim pločicama na neiskorištene jažice (stupci 4 – 12 za serije s 24 uzorka i stupci 7 – 12 za serije s 48 uzoraka) postavite obrezanu brtvu pločice.
15. Umetnite pločicu za povezivanje DNK-a na vakuumsku granu s barkodom okrenutim udesno.
16. Prije postavljanja pločice za povezivanje na granu BVS-a vizualno provjerite da u jažicama nema nikakvih prepreka.
One bi mogle onemogućiti protok reagensa dok je pod vakuumom.
17. Ako upotrebljavate serije s 24 ili 48 uzoraka, prekrijte neiskorištene jažice i zabrtvite ih folijom. Potvrdite okvir **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (Jesu li stupci pločice za povezivanje DNK-a zatvoreni?) pa odaberite **OK** (U redu).
18. Na sljedeći način umetnite posude s reagensom na nosač reagensa pa odaberite **OK** (U redu).

Veličina serije uzorka	Vrsta nosača	Staza	Stavka	Položaj
24, 48	Reagens	47	16 ml pufera za ispiranje	1
			11 ml proteinaze K	2
96	Reagens	47	16 ml pufera za ispiranje	1
			15 ml proteinaze K	2

19. Prenesite navedene reagense u spremnike s dubokim jažicama, a zatim na sljedeći način spremnike umetnite u nosače s dubokim jažicama.
20. Odaberite **OK** (U redu).

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

21. Pričekajte da završi automatizirana provjera volumena reagensa.
22. Provjerite je li vakuumski otpad prazan (preporučeno je dopola pun) pa odaberite **OK** (U redu).
23. Provjerite smještaj svih nosača, laboratorijskog posuđa i reagensa pa na zaslonu Extraction Deck Verification (Provjera valjanosti platforme za izdvajanje) odaberite **OK** (U redu).
24. Promatrajte ML STAR tijekom automatiziranih koraka.



OPREZ

Prelievanja uzoraka koje sustav nije prepoznao morate ručno označiti kao nevaljano prije nego što se kontaminiraju obližnje jažice.

25. Nakon koraka završnog vakuumiranja uklonite pločicu za povezivanje DNK-a i očistite donju površinu 70-postotnim etilnim alkoholom.
26. Zabrtvite sve nepokrivene jažice na pločici za povezivanje DNK-a i stavite je na praznu pločicu s dubokim jažicama za konačnu plazmu.
27. Centrifugirajte sklop pločice za povezivanje DNK-a / pločice za konačnu plazmu na 5600 × g 10 minuta s uključenom kočnicom.
28. Odaberite **OK** (U redu).
29. Tijekom centrifugiranja pločice za povezivanje DNK-a dovršite vakuumsko čišćenje:
- Uklonite vakuumsku granu pa odaberite **OK** (U redu).
 - Pričekajte da završi automatizirano uklanjanje otpada.

- c. Očistite vakuumsku granu i unutrašnjost vakuumnog sustava 70-postotnim etilnim alkoholom, a zatim zamijenite vakuumsku granu.
 - d. Potvrdite okvir **Manifold is on Vacuum** (Grana je pod vakuumom) da biste pokrenuli prijenos pločice za ispiranje na vakuumsku granu pa odaberite **OK** (U redu).
30. Nakon centrifuge odbrtvite jažice koje sadrže uzorke na pločici za povezivanje DNK-a.
 31. Postavite pločicu za povezivanje DNK-a na pločicu za ispiranje cfDNK-a koja je na vakuumskoj grani.
 32. Umetnite pločicu za povezivanje DNK-a s barkodom okrenutim udesno pa odaberite **OK** (U redu).
 33. Promatrajte ML STAR tijekom automatiziranih koraka.
 34. Nakon inkubacije potvrdite okvir **Plates are assembled as indicated** (Pločice se sastavljaju na naznačen način). Provjerite nalazi li se sklop pločice za povezivanje DNK-a i pločice za ispiranje cfDNK-a na potpornoj bazi (ako je to potrebno za centrifugiranje).
 35. Zabrtvite nepokrivene jažice na pločici za povezivanje DNK-a.
 36. Centrifugirajte na 5600 × g 2 minute s uključenom kočnicom pa odaberite **OK** (U redu).
 37. Vizualno provjerite je li na pločici za ispiranje cfDNK-a isti volumen u svim jažicama.
Očekivani volumen iznosi približno 55 µl.
 38. Zatvorite i pričvrstite pločicu za ispiranje cfDNK-a radi pripreme biblioteke.
 39. Kad to od vas zatraži Workflow Manager, provjerite da na platformi za umetanje uređaja ML STAR nema nikakvih prepreka da bi ML STAR mogao izvaditi nosače.
 40. Odaberite **Unload** (Isprazni) da biste ispraznili platformu.
 41. Izvadite sve nosače i očistite platformu uređaja ML STAR pa odaberite **OK** (U redu).
 42. Unesite komentare o zahvaćenim jažicama pa odaberite **OK** (U redu).
 43. Izvedite neki od sljedećih koraka:
 - Da biste nastavili s pripremom biblioteka, odaberite **Yes** (Da).
 - Da biste zaustavili postupak, odaberite **Exit** (Izlaz).

TOČKA SIGURNOG PREKIDANJA

U slučaju prekidanja zatvorite pločicu za ispiranje cfDNK-a i pohranite na temperaturi od -25 °C do -15 °C najviše 7 dana.

Priprema biblioteka

Priprema

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

Reagens	Skladištenje	Upute
A-Tailing Mix (A-mješavina za zatvaranje)	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite na sobnoj temperaturi. Promiješajte na vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
cfDNA Elution Plate (Pločica za ispiranje cfDNK-a)	od -25 °C do -15 °C	Ako je pločica prethodno bila uskladištena, provjerite nije li bila uskladištena dulje od 7 dana i odmrznite na sobnoj temperaturi. Promiješajte u miješalici na 1500 okr./min u trajanju od 1 minute. Centrifugirajte na 1000 × g tijekom 20 sekundi.
End Repair Mix (Završna mješavina za popravak)	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite na sobnoj temperaturi. Promiješajte u vrtložnoj miješalici.
Hybridization Buffer (Pufer za hibridizaciju)	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite na sobnoj temperaturi. Promiješajte u vrtložnoj miješalici. Nakon upotrebe vratite u skladište.
Ligation Mix (Mješavina za ligaciju)	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite na sobnoj temperaturi. Promiješajte na vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
NIPT DNA Adapter Plate (Pločica prilagodnika za NIPT DNK)	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite na sobnoj temperaturi. Promiješajte u vrtložnoj miješalici. Centrifugirajte na 1000 × g tijekom 20 sekundi.
Resuspension Buffer (Pufer za resuspendiranje)	od 2 °C do 8 °C	Promiješajte u vrtložnoj miješalici. Nakon upotrebe vratite u skladište.
Sample Purification Beads (Zrnca za pročišćavanje uzorka)	od 2 °C do 8 °C	Ostavite je 30 minuta da poprimi sobnu temperaturu. Energično promiješajte u miješalici prije svake upotrebe. Promiješajte miješalicom ili inverzijom dok sva zrnca ne budu u suspenziji i smjesa postane homogena.

**OPREZ**

Pri otvaranju pločice prilagodnika za NIPT DNK budite iznimno oprezni da ne bi došlo do unakrsne kontaminacije aerosolom iz jažice u jažicu jer bi to moglo uzrokovati pogrešne rezultate.

3. Ako je pločica za ispiranje cfDNK-a pohranjena zamrznuta, pripremite je na sljedeći način.
 - a. Odmrznite na sobnoj temperaturi.
 - b. Promiješajte u miješalici na 1500 okr./min u trajanju od 1 minute.
 - c. Centrifugirajte na 1000 × g tijekom 20 sekundi.
4. Označite jednu novu pločicu pune širine kao biblioteke i nalijepite barkod pločice.
5. Pripremite 80-postotni EtOH od apsolutnog EtOH. Objedinite 40 ml 100-postotnog etilnog alkohola i 10 ml vode bez DNaze/RNaze. Invertirajte da biste promiješali.
6. Provjerite je li termalna kontrola platforme ML STAR uključena.

Razrjeđivanje enzima

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

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

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

Veličina serije uzorka	Mješavina za ligaciju (µl)	Pufer za resuspendiranje (µl)
24, 48	230	1713
96	440	3278

Postupak

1. Odaberite **OK** (U redu) da biste počeli s pripremom biblioteke. Ako metoda **VeriSeq NIPT Method** još nije otvorena:
 - a. Otvorite AppLauncher i odaberite **VeriSeq NIPT Method**.
 - b. Unesite ID serije i korisničko ime pa odaberite **OK** (U redu).
2. Potvrdite da je pripremljen sljedeći potrošni materijal kao što je navedeno na zaslonu Reagent Preparation (Priprema reagensa):
 - A-mješavina za zatvaranje, mješavina za ligaciju i 80-postotni etilni alkohol
 - Zrnca za pročišćavanje uzorka, završna mješavina za popravak i pločica prilagodnika za NIPT DNK
3. Potvrdite okvire pa odaberite **OK** (U redu).

4. Skenirajte barkodove na kutiji za pripremu biblioteke.
5. Unesite korisničko ime ili inicijale osobe koja priprema reagense pa odaberite **OK** (U redu).
6. Očitajte barkodove na kutiji za dodatnu opremu.
7. Unesite korisničko ime ili inicijale osobe koja priprema reagense pa odaberite **OK** (U redu).
8. Na sljedeći način umetnite vrhove na nosače vrhova pa odaberite **OK** (U redu) za svaki nosač.

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

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

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

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

Veličina serije uzorka	Vrsta nosača	Staza	Stavka	Položaj
24, 48, 96	Multiflex	19 – 24	pločica za ispiranje cfDNK-a, s barkodom	1
			pločica prilagodnika za NIPT DNK, s barkodom	2
			nova pločica pune širine s 96 jažica, biblioteke, s barkodom	3
			nove pločice pune širine s 96 jažica	4, 5

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

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

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

Veličina serije uzorka	Vrsta nosača	Staza	Stavka	Položaj
24, 48, 96	reagens	47	2,5 ml mješavine za završni popravak	1
			pripremljena A-mješavina za zatvaranje (ukupan volumen)	2
			pripremljena mješavina za ligaciju (ukupan volumen)	3
			10 ml zrnaca za pročišćavanje uzorka	4
			12 ml pufera za hibridizaciju	5

14. Ostatak od 12 ml pufera za hibridizaciju (HT1) spremite u spremnik za izradu skupova.

15. Provjerite jesu li nosači, laboratorijsko posuđe i reagensi pravilno umetnuti kako je navedeno pa na zaslonu Library Deck Verification (Provjera valjanosti platforme za biblioteku) odaberite **OK** (U redu).

16. Pričekajte da završi automatizirana provjera volumena reagensa.

17. Promatrajte ML STAR tijekom automatiziranih koraka.

18. Kad to od vas zatraži Workflow Manager, provjerite da na platformi za umetanje uređaja ML STAR nema nikakvih prepreka kako bi ML STAR mogao izvaditi nosače.

19. Odaberite **Unload** (Isprazni) da biste ispraznili platformu.

20. Provjerite je li na pločici s bibliotekama u svakoj jažici isti volumen.



OPREZ

Ako volumeni nisu dosljedni, uzorci možda neće proći automatiziranu kontrolu kvalitete.

21. Ako ćete je pohranjivati, zabrtvite i zadržite pločicu s bibliotekama.

22. Izvadite nosače, očistite platformu pa odaberite **OK** (U redu).

23. Unesite komentare o zahvaćenim jažicama pa odaberite **OK** (U redu).

24. Izvedite neki od sljedećih koraka:

- Da biste nastavili s kvantificiranjem biblioteka, odaberite **Yes** (Da).
- Da biste zaustavili postupak, odaberite **Exit** (Izlaz).

TOČKA SIGURNOG PREKIDANJA

U slučaju prekidanja zatvorite pločicu za biblioteke prije skladištenja. Pločica za biblioteke stabilna je najviše 7 dana od dana pripreme na temperaturi od -25 °C do -15 °C.

Kvantifikacija biblioteka

Priprema

1. Pripremite sljedeće reagense:

Reagens	Skladištenje	Upute
Reagens za kvantifikaciju DNK-a	od 2 °C do 8 °C	Zaštitite od svjetlosti. Odmrzavajte na sobnoj temperaturi 30 - 150 minuta. (preporučuje se uklanjanje reagensa na početku postupka pripreme biblioteka). Promiješajte na vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
Standard kvantifikacije DNK-a	od 2 °C do 8 °C	Promiješajte na vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
Pufer za resuspendiranje	od 2 °C do 8 °C	Promiješajte u vrtložnoj miješalici.

2. Ako je pločica s bibliotekama pohranjena zamrznuta, pripremite je na sljedeći način.
 - a. Provjerite da pločica nije bila pohranjena dulje od 7 dana i odmrznite je na sobnoj temperaturi.
 - b. Promiješajte u vrtložnoj miješalici
 - c. Centrifugirajte na 1000 × g 1 minutu.
3. Fluorometar uključite 10 minuta prije upotrebe.
4. Primijenite crtični kôd pločice na novu ploču od 384 jažica.
5. Primijenite crtični kôd pločice na novu punu pločicu.

Postupak

1. Odaberite **OK** (U redu) da biste pokrenuli kvantifikaciju.
2. Ako metoda VeriSeq NIPT Method nije već otvorena:
 - a. Otvorite AppLauncher i odaberite **VeriSeq NIPT Method**.
 - b. Unesite ID serije i korisničko ime pa odaberite **OK** (U redu).
3. Očitajte barkodove na kutiji za dodatnu opremu.

4. Unesite korisničko ime ili inicijale osobe koja priprema reagense pa odaberite **OK** (U redu).
5. Na sljedeći način umetnite vrhove na nosač vrhova pa odaberite **OK** (U redu).

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

6. Provjerite jesu li barkodovi nalijepljeni.
7. Po potrebi otvorite pločicu s bibliotekama.
8. Na sljedeći način umetnite pločice (s barkodom okrenutim udesno) na nosač Multiflex pa odaberite **OK** (U redu).

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

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

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

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

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

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

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

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



OPREZ

Ne bacajte reagense za kvantifikaciju dok ne dobijete podatke. Ako ćete morati ponoviti kvantifikaciju, bit će vam potrebni reagensi.

26. Nakon inkubacije skinite foliju i postavite pločicu s 384 jažice na čitač mikropločica. Obavezno umetnite ljubičasti prilagodnik (broj dijela: 0310-4336) proizvođača Molecular Devices ili ekvivalentni ako je to primjenjivo za instrument koji upotrebljavate.
- Neka prilikom umetanja A1 bude u gornjem lijevom kutu.
27. Dvaput odaberite predložak VeriSeq NIPT da biste ga otvorili u softveru SoftMax Pro.

28. Na kartici Home (Početno) odaberite **New Experiment** (Novi eksperiment).
29. Odaberite **Read** (Očitaj).
30. Izvezite podatke u XML obliku na način opisan u nastavku.
 - a. Desnom tipkom miša odaberite **Plate** (Pločica), a zatim odaberite **Rename** (Preimenuj).
 - b. Skenirajte barkod pločice za kvantifikaciju pa odaberite **OK** (U redu).
 - c. U gornjem lijevom kutu zaslona odaberite ikonu pločice, a zatim na izborniku odaberite **Export** (Izvezi).
 - d. Potvrdite okvir **Expt name** (Naziv izvezene datoteke), mogućnost datuma pločice postavite na neobrađeno, izlazni oblik postavite na XML, a zatim odaberite **OK** (U redu).
 - e. Postavite put i naziv izlazne datoteke pa odaberite **Save** (Spremi).Računalo Hamilton mora moći pristupiti mjestu datoteke. U nazivu datoteke i putu datoteke nemojte upotrebljavati razmake.

Analiza

1. Na uređaju ML STAR na zaslonu Scanner Information (Podaci o skeneru) unesite ID fluorometra.
2. Unesite komentare o obradi pomoću fluorometra pa odaberite **OK** (U redu).
3. Pronađite *.xml kvantifikacijsku datoteku koja sadrži fluorometrijske podatke pa odaberite **OK** (U redu).
4. Pregledajte rezultate analize krivulje standarda i koncentracije uzoraka pa odaberite **OK** (U redu).
5. Ako morate ponovno skenirati pločicu, odaberite **Rescan** (Ponovno skeniraj).

Uzorci su osjetljivi na vrijeme i svjetlost. Po potrebi odmah izvedite ponovno skeniranje.
6. Unesite komentare o zahvaćenim jažicama pa odaberite **OK** (U redu).
7. Očitajte rezultate i nastavite kako je opisano.
 - Ako rezultati zadovoljavaju specifikacije, prijedite na [Stvaranje skupova biblioteka na stranici 38](#). Specifikacije potražite u tablici mjernih podataka i granica za *kvantifikacijsku kontrolu kvalitete u Priručniku za upotrebu softvera VeriSeq NIPT Solution v2 (broj dokumenta 1000000067940)*.
 - Ako rezultati ne zadovoljavaju specifikacije, sustav će prekinuti metodu. Ponovite postupke kvantifikacije počevši od odjeljka [Priprema na stranici 34](#).
8. Izvedite neki od sljedećih koraka:
 - Da biste nastavili na [Stvaranje skupova biblioteka na stranici 38](#), odaberite **Yes** (Da).
 - Da biste zaustavili postupak, odaberite **Exit** (Izlaz).

TOČKA SIGURNOG PREKIDANJA

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

Stvaranje skupova biblioteka

Priprema

1. Pripremite sljedeće reagense:

Reagens	Skladištenje	Upute
Hybridization Buffer (Pufer za hibridizaciju)	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite na sobnoj temperaturi. Promiješajte u vrtložnoj miješalici. Nakon upotrebe vratite u skladište.

2. Ako je pločica s bibliotekama pohranjena zamrznuta, pripremite je na sljedeći način.
 - a. Provjerite da pločica nije bila pohranjena dulje od 7 dana i odmrznite je na sobnoj temperaturi.
 - b. Promiješajte u miješalici na 1500 okr./min u trajanju od 1 minute.
 - c. Centrifugirajte na 1000 × g tijekom 20 sekundi.
 - d. Pomiješajte pipetiranjem.
3. Označite praznu epruvetu za stvaranje skupa „Skup A“. Za 96 uzoraka označite drugu praznu epruvetu za stvaranje skupa „Skup B“.
4. Spremite sljedeći program za denaturiranje na termocikler s grijanim poklopcem.
 - a. Odaberite mogućnost predgrijanja poklopca i postavite ga na 102 °C.
 - b. Postavite reakcijski volumen na 50 µl.
 - c. Postavite korak pojačavanja na maksimum (≥ 2 °C u sekundi).
 - d. Inkubirajte na 96 °C u trajanju 10 minuta, a zatim 4 °C u trajanju 5 sekundi.
 - e. Držite na 4 °C.

Postupak

1. Postavite pločicu s bibliotekama na unaprijed programirani termocikler i pokrenite program denaturizacije. Nemojte denaturizirati pločicu s bibliotekama prije nego što kvantifikacija prođe mjerne podatke kontrole kvalitete jer ćete možda morati ponovno izvesti kvantifikaciju.
2. Centrifugirajte pločicu s bibliotekama na 1000 × g tijekom 20 sekundi.
3. Odaberite **OK** (U redu) da biste započeli izradu skupa biblioteka.
4. Ako metoda VeriSeq NIPT Method nije otvorena:
 - a. Otvorite AppLauncher i odaberite **VeriSeq NIPT Method**.
 - b. Unesite ID serije i korisničko ime pa odaberite **OK** (U redu).
5. Odaberite koncentraciju skupa pa **OK** (U redu).
Ciljna je gustoća klastera 220 – 260 K/mm².

NAPOMENA Koncentracije skupova i/ili volumeni skupova za serije s 24 uzorka možda će se morati povećati da bi se zadržale slične gustoće klastera dobivene u serijama s 48/96 uzoraka.

6. Ako Workflow Manager to od vas zatraži, izvedite jedan od sljedećih koraka:

- Da biste učitali list s uzorcima, odaberite list s uzorcima povezan sa serijom pa **OK** (U redu).
- Da biste upotrebljavali zadane vrijednosti sustava za ostale tipove podataka, izvješće o spolu ili vrstu probira, za svaku postavku odaberite **Use Default** (Koristi zadanu vrijednost).
Da biste saznali više o stvaranju lista s uzorcima, pročitajte *Vodič za softver VeriSeq NIPT Solution v2* (broj dokumenta: 1000000067940).

7. Odaberite **Start** (Pokreni) da biste počeli mjeriti vrijeme pločice za denaturiziranje.

8. Na sljedeći način umetnite vrhove na nosače vrhova.

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

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

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

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

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

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

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

12. Na sljedeći način umetnite vrhove na nosače vrhova.

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

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

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

TOČKA SIGURNOG PREKIDANJA

U slučaju prekidanja stavite čep na epruvete za stvaranje skupova i pohranite na temperaturi od -25 °C do -15 °C najviše 7 dana.

Priprema skupova biblioteka za sekvenciranje

Priprema

1. Pripremite sljedeće reagens:

Reagens	Skladištenje	Upute
Epruvete skupa	od -25 °C do -15 °C	Ako su prethodno bile pohranjene, odmrznite ih na sobnoj temperaturi. Kratko promiješajte u miješalici. Kratko centrifugirajte.

2. Pripremite sustav za sekvenciranje nove generacije ispunjavanjem sljedećih polja u modulu Local Run Manager VeriSeq NIPT Module:
 - a. Run Name (Naziv obrade)
 - b. **[neobavezno]** Opis obrade
 - c. Pool Barcode (Barkod skupa)

**OPREZ**

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

Da biste saznali više o upotrebi modula Local Run Manager VeriSeq NIPT Module, pročitajte *Vodič za softver VeriSeq NIPT Solution v2 (broj dokumenta 1000000067940)*.

Postupak

1. Objedinite sljedeće volumene u spremniku reagensa, a zatim pipetirajte u smjesu.
 - Pufer za hibridizaciju (900 µl)
 - Skup A 450 µl (450 µl)
2. Nastavite sa sekvenciranjem prema uputama iz referentnog vodiča za svoj instrument za sekvenciranje nove generacije. Za NextSeq 550Dx pročitajte *Referentni vodič za instrument NextSeq 550Dx (broj dokumenta 1000000009513)* (ili primjenjive upute za uporabu navedene na stranici podrške tvrtke Illumina www.support.illumina.com).
3. Na upit potvrdite odgovarajuću konfiguraciju obrade.
4. Prema potrebi ponovite postupak za skup B.
 - Da biste postigli raspon gustoće ciljnog klastera, za pločicu s bibliotekom može se ponovno stvoriti skup pomoću druge koncentracije za stvaranje skupa na uređaju Hamilton. Ponovno stvaranje skupa čini izvorni skup nevažecim.
 - Umjesto toga omjer skupa prema HT1 (450 µl + 900 µl) može se izmijeniti tako da se postigne ciljani raspon gustoće klastera.

Sekvenciranje nove generacije

VeriSeq NIPT Solution v2 može se upotrebljavati sa sustavom za sekvenciranje nove generacije sljedećih specifikacija:

- mogućnost čitanja 2 x 36 uparenih krajeva
- kompatibilnost s prilagodnicima indeksa iz kompleta za pripremu uzoraka VeriSeq NIPT Sample Prep Kit
- dvokanalna kemija
- automatsko generiranje BCL datoteka (*.bcl) (neobrađeni podaci s instrumenta za sekvenciranje)
- 400 milijuna čitanja uparenih krajeva po obradi
- kompatibilnost sa softverom VeriSeq NIPT Assay Software v2.

NextSeq 550Dx kompatibilan je s testom VeriSeq NIPT Solution v2

Analiza podataka o sekvencama

Nakon dovršetka sekvenciranja podaci dobiveni sekvenciranjem automatski se šalju softveru VeriSeq NIPT Assay Software v2 radi analize i generiranja izvješća. Izvješće obuhvaća klasifikaciju svakog uzorka u seriji kao i procjenu svih mjernih podataka kontrole kvalitete za obradu. Postupak analize od dovršetka sekvenciranja do završnih rezultata traje otprilike 4 sata za seriju s 48 uzoraka. Detaljne informacije o analizi podataka i izlaznoj datoteci potražite u *Vodiču za softver VeriSeq NIPT Solution v2 (broj dokumenta: 1000000067940)*.

Tumačenje rezultata

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

Za sve kromosome podaci o uparenim krajevima dobiveni sekvenciranjem usklađuju se s referentnim genomom (HG19). Jedinствена neduplicirana usklađena očitavanja agregiraju se u spremnike od 100 kb. Odgovarajući broj spremnika prilagođava se GC utjecaju i u skladu s prethodno utvrđenom genomskom pokrivenošću specifičnom za područje. Uz upotrebu takvih normaliziranih brojeva spremnika statistički rezultati izvode se za svaki autosom usporedbom područja pokrivenosti koja mogu biti zahvaćena aneuploidijom s ostatkom autosoma. Logaritamski omjer vjerojatnosti (LLR, log likelihood ratio) izračunava se za svaki uzorak uz uzimanje u obzir tih rezultata utemeljenih na pokrivenosti i procijenjene fetalne frakcije. LLR je vjerojatnost da je uzorak zahvaćen uzimajući u obzir opaženu pokrivenost i fetalnu frakciju u odnosu na vjerojatnost da uzorak nije zahvaćen uz istu opaženu pokrivenost. Pri izračunu tog omjera uzima se u obzir i određena nesigurnost fetalne frakcije. Za daljnje izračune upotrebljava se prirodni logaritam omjera. Softver za analizu određuje LLR za svaki ciljni kromosom i svaki uzorak kako bi odredio aneuploidiju.

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

Za sve se vrste uzoraka vrstom probira određuje koje će se autosomne nepravilnosti prepoznavati. U osnovnoj vrsti probira prijavljuju se samo slučajevi trisomije na cijelom kromosomu koji zahvaćaju kromosome 13, 18 i 21. U probiru na razini genoma prijavljuju se cijele ili djelomične delecije kromosoma ili dupliciranje bilo kojeg autosomnog kromosoma. Duljina najmanje prepoznatljive djelomične delecije ili duplikacije kromosoma jest 7 Mb.

Kod jednoplodnih uzoraka moguće je onemogućiti prijavljivanje spolnih kromosoma. Moguće je i konfigurirati da se prepoznaju aneuploidije spolnih kromosoma uz prijavljivanje ili bez prijavljivanja spola euploidnih uzoraka.

Kod blizanačkih uzoraka, ako se za prijavljivanje spolnih kromosoma odabere Yes (Da), rezultat je ograničen na prijavljivanje prisutnosti ili odsutnosti kromosoma Y u biblioteci. Aneuploidija spolnih kromosoma ne može se prijaviti za uzorke blizanačke trudnoće.

NAPOMENA Kad je prijavljeni spol svih uzoraka u seriji jednak, korisniku se e-poštom ili na web-sučelju šalje obavijest o pogrešci s upozorenjem o izmiješanosti/kontaminaciji uzoraka. Serija će se proglašiti nevaljanom i neće se izraditi izvješće. (Primjenjivo na poslužiteljski softver VeriSeq NIPT Solution v2 verzije 2.2 i novije.)

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

VeriSeq NIPT Assay Software v2 upotrebljava statističke podatke generirane tijekom sekvenciranja da bi procijenio fetalnu frakciju (FFE, fetal fraction estimation) za svaki uzorak. FFE je procijenjena komponenta fetalnog cfDNK-a koja se dobiva analizom i izražava se kao zaokruženi postotak za svaki uzorak. Prosječna standardna devijacija te procjene za sve uzorke iznosi 1,3 %. FFE se ne smije upotrebljavati zasebno za izdvajanje uzoraka prilikom objave rezultata.

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

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

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



OPREZ

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

Radne karakteristike

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

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

Kliničko ispitivanje

Klinička preciznost testa VeriSeq NIPT Solution v2 pokazana je obradom uzoraka plazme trudnih žena s jednoplođnim i blizanačkim trudnoćama. Uzorci su dobiveni iz masovno pohranjenih anonimiziranih uzoraka plazme koji su prethodno obrađeni iz uzoraka periferne pune krvi. Radi uključivanja u ispitivanje razmotreno je više od 45 000 uzoraka. Ti su uzorci prošli prenatalni probir za fetalne kromosomske aneuploidije i djelomične delecije i dupliciranja veličine 7 Mb ili veće. Svi uzorci zahvaćenih trudnoća i podskup daljnjih uzoraka nezahvaćenih trudnoća kvalificirali su se za testiranje pod uvjetom dostupnosti kliničkih ishoda i zadovoljenja kriterija za uzorke. U skupu za testnu analizu našlo se ukupno 2335 uzoraka. U tom skupu je 2328 uzoraka bilo iz jednoplođnih trudnoća, a sedam od blizanačkih trudnoća.

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

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

Demografski podaci i karakteristike trudnoće

Dob majke, gestacijska dob i tromjesečje trudnoće sažeti su u [Tablica 7](#) za uzorke u probiru na razini genoma, uključujući uzorke s poznatim mozaicizmima. Većina (98 %) testiranih uzoraka predstavlja prvo tromjesečje trudnoće.

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

Tablica 7 Demografski podaci i karakteristike trudnoće

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

* Predstavljani završni uzorci obuhvaćali su 7 blizanaca.

Kliničko djelovanje

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

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

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

Učinkovitost osnovnog probira

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

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

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

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

Učinkovitost probira na razini genoma

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

Učinak probira na razini genoma za sve anomalije

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

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

Učinak probira na razini genoma za rijetku autosomnu aneuploidiju

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

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

Učinak probira na razini genoma za djelomične delecije i dupliciranja

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

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

Razlike u djelovanju osnovnih probira i probira na razini genoma

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

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

Uvrštavanje mozaika u probir na razini genoma

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

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

Djelomična delecija i dupliciranje nasuprot prepoznavanja aneuploidije cijelih kromosoma

VeriSeq NIPT Solution v2 nudi mogućnosti na izborniku za osnovni probir i probir na razini genoma. U osnovnom probiru rezultat ANOMALY DETECTED (Anomalija otkrivena) dobiva se samo kad je prepoznata potpuna aneuploidija na kromosomima 21, 18 ili 13 te ako su zadovoljeni svi mjerni zahtjevi kontrole kvalitete. Pri probiru na razini genoma sustav prepoznaje aneuploidiju na svim autosomima te slučajeve djelomične delecije i dupliciranja veličine najmanje 7 Mb.

Tijekom upotrebe probira na razini genoma kad i slučaj cijelog kromosoma i slučaj CNV-a unutar istog kromosoma prekoračuju prag LLR-a sustav u izvješćivanju daje prednost slučajevima djelomične delecije ili dupliciranja pred prepoznavanjem cijelog kromosoma ako veličina djelomične delecije ili dupliciranja obuhvaća otprilike 75 % ili manje kromosoma na kojemu je slučaj prepoznat. Ako je regija s djelomičnom delecijom i dupliciranjem veća od 75 % veličine kromosoma, slučaj se prijavljuje kao puna trisomija ili monosomija cijelog kromosoma ako je prekoračen i prag LLR-a za cijeli kromosom. Zbog toga delecije i dupliciranja manja od ili jednaka 75 % veličine kromosoma mogu upućivati na aneuploidiju cijelog kromosoma.

Za sve je uzorke rezultat LLR-a za klasifikaciju cijelog kromosoma dostupan u dodatnom izvješću. Prije tumačenja rezultata mora se pregledati rezultat LLR-a u pogledu navedene granične vrijednosti na [Vjerojatnost prepoznavanja od 95 % za prosječne regije po veličini za VeriSeq NIPT Solution v2 na stranici 58](#). Primjerice, očitavanje CNV-a u kojem rezultati LLR-a na razini kromosoma premašuju graničnu vrijednost dodatno podržavaju tumačenje koje odgovara aneuploidiji cijelog kromosoma, a primjer je prikazan u [Tablica 12](#).

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

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

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

Da biste saznali više o mjernim vrijednostima kontrole kvalitete koje se upotrebljavaju prilikom otkrivanja rezultata aneuploidije, pročitajte *Vodič za softver VeriSeq NIPT Solution v2 (broj dokumenta: 1000000067940)*.

Spolni kromosomi

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

Tablica 13 Postotak čestotnosti za fetalnu klasifikaciju spola*

Fetalna klasifikacija spola		Fenotip prema fizičkom pregledu novorođenčeta		Citogenetski rezultati								
		Ženski spol	Muški spol	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY	Drugo**	Nedostaje	
Prepoznato	Kariotip											
Anomalija nije otkrivena	XX	997	0	21	0	2	0	0	0	0	0	0
Anomalija nije otkrivena	XY	0	966	0	15	0	0	0	0	0	0	1
Anomalija otkrivena	XO	0	0	0	0	19	0	0	1	0	0	0
Anomalija otkrivena	XXX	0	0	0	0	0	17	0	0	1	0	0
Anomalija otkrivena	XXY	0	0	0	0	0	0	23	0	1	0	0
Anomalija otkrivena	XYY	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0

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

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

** Drugi citogenetski rezultati bili su XXXXX i XYYY.

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

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

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

Rasprostranjenost (%)	PPV (%)	NPV (%)
0,05	33,17	> 99,99
0,10	49,82	> 99,99
0,20	66,53	> 99,99
0,50	83,29	> 99,99
1,00	90,93	> 99,99
1,50	93,79	> 99,99
2,00	95,29	> 99,99

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

Rasprostranjenost (%)	PPV (%)	NPV (%)
0,03	23,06	> 99,99
0,05	33,31	> 99,99
0,10	49,99	> 99,99
0,20	66,68	> 99,99
0,30	75,03	> 99,99
0,40	80,04	> 99,99
0,50	83,38	> 99,99

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

Rasprostranjenost (%)	PPV (%)	NPV (%)
0,01	9,10	> 99,99
0,02	16,68	> 99,99
0,05	33,37	> 99,99
0,10	50,05	> 99,99
0,20	66,73	> 99,99

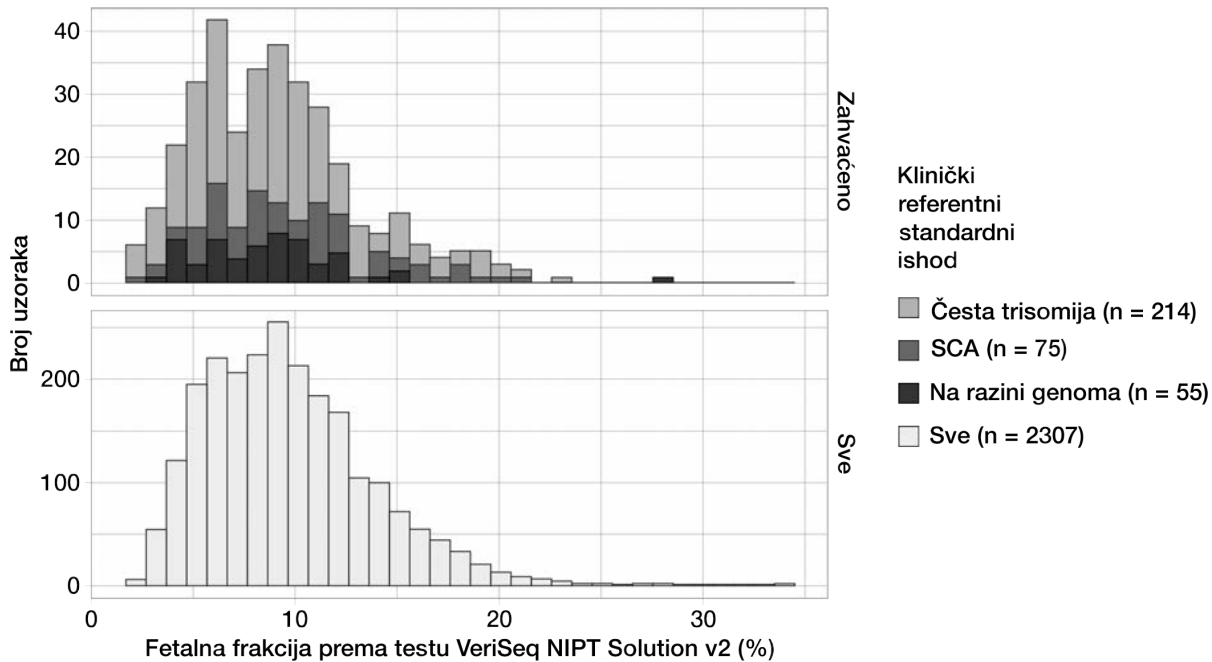
Tablica 17 Rasprostranjenost bilo koje anomalije, PPV i NPV u probiru na razini genoma (obuhvaća poznate mozaicizme)

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

Raspodjela fetalne frakcije

Procjene raspodjele fetalne frakcije (FF) dobivene testom VeriSeq NIPT Solution v2 za probir na razini genoma s mozaicizmima prikazane su po kategoriji ishoda prema kliničkom referentnom standardu na [Slika 1](#).

Slika 1 Raspodjela fetalne frakcije



5 uzoraka imalo je anomalije u više kategorija.

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

Na razini genoma obuhvaća uzorke s rijetkom autosomnom aneuploidijom ili djelomičnim delecijama i/ili dupliciranjima.

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

Učinkovitost kod blizanačkih trudnoća

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

Uslijed niske pojavnosti trisomije 21, 18 i 13 u blizanačkim trudnoćama samo je mali broj zahvaćenih uzoraka blizanaca bio dostupan za kliničko ispitivanje. Da bi se procijenio učinak testa VeriSeq NIPT Solution v2 u blizanačkim trudnoćama, za simulaciju populacija blizanačkih trudnoća upotrijebljeni su modeli *in silico* utemeljeni na opažanjima iz kliničkih uzoraka. Ta je simulacija bila dosljedna s namjenskom populacijom. Raspodjela fetalne frakcije određena je iz otprilike 4500 uzoraka blizanačke trudnoće i uspoređena s raspodjelom iz oko 120 000 uzoraka jednoplodne trudnoće. Raspodjela fetalne frakcije uvjetovane statusom aneuploidije određena je iz pretpostavljenih jednoplodnih otkrivanja (1044 trisomije 21, 307 trisomije 18 i 192 trisomije 13). Kombiniranje tih dviju raspodjela omogućilo je upućivanje na prepoznavanje aneuploidije u

blizanaca. Simulirani su skupovi dizigotnih i monozigotnih blizanaca te je uzet ponderirani prosjek koji predstavlja njihovu pojavnost u namjenskoj populaciji (2 dizigotna: 1 monozigotni) radi procjene osjetljivosti. Za specifičnost simulirani su skupovi nezahvaćenih blizanaca.

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

- Kod monozigotnih blizanaca zahvaćena frakcija svakog uzorka postavljena je na 1,0 jer u toj situaciji trisomija pogađa oba blizanca.
- Kod dizigotnih blizanaca pretpostavljeno je da je samo jedan blizanac zahvaćen (iznimno su rijetki slučajevi u kojima su zahvaćena oba dizigotna blizanca). Vrijednosti zahvaćene frakcije simulirane su uz pomoć poznate raspodjele omjera fetalne frakcije utvrđene na temelju kliničkih uzoraka blizanaca različitog spola. Upotrijebljen je konzervativni pristup u skladu s kojim je pretpostavljeno da zahvaćeni blizanac uvijek ima najnižu fetalnu frakciju među blizancima. Primijenjen je faktor korekcije za fetalne frakcije koje su u prosjeku niže u trudnoćama s trisomijom 13 i 18.
- Za nezahvaćene blizance zahvaćena frakcija svakog uzorka postavljena je na nulu.

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

Ukupna fetalna frakcija, kao i zahvaćena frakcija svakog simuliranog uzorka zatim je upotrijebljena za izračunavanje rezultata aneuploidije uz pomoć standardnog algoritma testa VeriSeq NIPT Solution v2.

Osjetljivost je izračunata određivanjem učestalosti slučajeva u kojima su rezultati aneuploidije za simulirane zahvaćene blizance bili iznad odgovarajuće granice za aneuploidiju. U skladu s time specifičnost je izračunata određivanjem koliko su često rezultati za aneuploidiju za simulirane nezahvaćene blizance bili ispod odgovarajuće granične vrijednosti za aneuploidiju ([Tablica 18](#)). Utvrđeni su intervali pouzdanosti od 95 % na temelju broja stvarnih kliničkih blizanačkih uzoraka u izvornom skupu podataka, koji su bili klasificirani kao zahvaćeni ili nezahvaćeni relevantnom trisomijom.

Radi određivanja osjetljivosti kromosoma Y u blizanačkim uzorcima simulirani su skupovi blizanaca XY/XY i XX/XY. Uzet je ponderirani prosjek koji predstavlja njihovu učestalost u namjenskoj populaciji (1 XY/XY: 1 XX/XY).

Radi određivanja specifičnosti kromosoma Y u blizanaca simuliran je skup blizanaca XX/XX. Ukupne vrijednosti fetalne frakcije simulirane su u skladu s poznatom raspodjelom fetalne frakcije u kliničkim uzorcima blizanaca.

Za blizance XY/XY i XX/XY utvrđeni su odgovarajući rezultati kromosoma Y uz pomoć poznatog odnosa između fetalne frakcije i rezultata kromosoma Y u kliničkim jednoplodnim uzorcima klasificiranima kao muškog spola.

Samo u slučaju blizanaca XX/XY simulirane su zahvaćene (tj. muške) vrijednosti fetalne frakcije uz pomoć poznate raspodjele omjera fetalne frakcije opažene između blizanaca iz iste trudnoće, kao što je utvrđeno kliničkim uzorcima blizanaca različitog spola. Upotrijebljen je konzervativni pristup, pa je odabrana zahvaćena frakcija koja je odgovarala manjem od dvaju blizanaca. Za svaki simulirani uzorak XX/XY rezultat kromosoma Y pomnožen je sa zahvaćenom frakcijom.

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

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

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

	Trisomija 21	Trisomija 18	Trisomija 13	Prisutnost kromosoma Y
Osjetljivost	96,4 %	95,7 %	93,6 %	> 99,9 %
Dvostrani 95 % CI	(86,4 %, 98,9 %)	(68,3 %, 99,4 %)	(64,1 %, 98,9 %)	(99,9 %, > 99,9 %)
Specifičnost	99,9 %	> 99,9 %	> 99,9 %	> 99,9 %
Dvostrani 95 % CI	(99,8 %, > 99,9 %)	(99,9 %, > 99,9 %)	(99,9 %, > 99,9 %)	(99,7 %, > 99,9 %)

U [Tablica 18](#) prikazuju se određene točke i određeni intervali pouzdanosti od 95 % za osjetljivost i specifičnost testa VeriSeq NIPT Solution v2 u prepoznavanju trisomije 21, 18, 13 i prisutnosti kromosoma Y u simuliranoj populaciji blizanačkih trudnoća dosljednoj namjenskoj populaciji. Intervali pouzdanosti utvrđeni su na temelju broja kontrola kvalitete koje su prošli klinički uzorci blizanaca klasificirani kao zahvaćeni ili nezahvaćeni relevantnom trisomijom. Izračun osjetljivosti podrazumijeva da su dvije trećine zahvaćenih trudnoća dizigotne s jednim zahvaćenim blizancem, dok je jedna trećina zahvaćenih blizanačkih trudnoća monozigotna sa zahvaćena oba blizanca.

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

Analitička učinkovitost

Preciznost

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

- U ispitivanju obnovljivosti na više mjesta tri su rukovatelja provela tri obrade na tri mjesta uz upotrebu jedne serije reagensa za ukupno devet obrada.
- Ispitivanja preciznosti unutar laboratorija sastojalo se od 12 obrada na jednom mjestu s pomoću dviju platformi ML STAR, dva sustava instrumenata za sekvenciranje i tri serije reagensa za sekvenciranje.

Cilj ispitivanja preciznosti bio je kvantifikacija preciznosti analize u pogledu trisomije 21 (T21) i kromosoma Y te procjenjivanje varijabilnosti između različitih instrumenata, kompleta za pripremu biblioteke i serija reagensa za sekvenciranje. Obnovljivost uvjeta koji nisu prethodno opisani nije procjenjivana u sklopu tih ispitivanja.

Stvoren je skup fetalne frakcije T21 od 5 % kombiniranjem cfDNK-a izdvojenog iz majčine plazme trudnih žena (s fetusom koji ima T21) i cfDNK-a izdvojenog iz plazme žena koje nisu trudne. Stvoren je i skup majčinog i muškog (fetus XY) cfDNK-a s fetalnom frakcijom od 10 %. Panel uzoraka za svako ispitivanje za svaku obradu obuhvaćao je 4 replikata skupa s fetalnom frakcijom od 5 % koja ima T21 i 20 replikata skupa majčinog i muškog cfDNK-a s fetalnom frakcijom od 10 %. Testiranje je provođeno 10 dana te je napravljena ukupno 21 obrada za kombinaciju dvaju ispitivanja.

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

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

Tablica 19 Sažetak standardne devijacije (SD) odgovora na sekvenciranje na više lokacija (obnovljivost)

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

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

Tablica 20 Sažetak preciznosti odgovora sekvenciranja unutar laboratorija

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

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

Provedeno je dodatno ispitivanje radi usporedbe preciznosti sekvenciranja testom VeriSeq NIPT Solution v2 (ukupna standardna devijacija) uz upotrebu verzije protočnog članka 2.0 u usporedbi s verzijom 2.5 protočnog članka. Ispitivanje je obuhvaćalo dvije vrste protočnih članaka (v2.0 i v2.5), tri serije kompleta za sekvenciranje, četiri instrumenta i dvije obrade sekvenciranjem po kombinaciji, što daje ukupno 48 obrada jednog mjesta. Pripremljen je jedan skup za sekvenciranje iz pločica cfDNK-a koje su ručno pripremljene. Panel uzorka

obuhvaćao je 4 replikata skupa s fetalnom frakcijom od 5 % koja ima T21 i 20 replikata skupa majčinog i muškog (fetus XY) cfDNK-a s fetalnom frakcijom od 10 %. Rezultati tog ispitivanja predstavljeni su u [Tablica 21](#) i podržavaju tezu da nema razlike u preciznosti sekvenciranja uz upotrebu protočnog članka v2.0 i v2.5.

Tablica 21 Sažetak preciznosti odgovora na sekvenciranje s protočnim člankom v2.0 i v2.5

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

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

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

Unakrsna kontaminacija

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

Potencijalno ometajuće tvari

Utjecaj potencijalno ometajućih tvari na VeriSeq NIPT Solution procijenjen je određivanjem učinka analize u prisutnosti takvih tvari.

U skupove majčine plazme nezahvaćenih ženskih (fetus XX) trudnoća dodani su albumin, bilirubin, hemoglobin i trigliceridi (endogeni). Testirani su pri dvije koncentracije svake testne tvari (n = 16 za svaku). Nisu opaženi ometajući utjecaji na učinkovitost analize.

Tablica 22 Potencijalno ometajuće tvari (endogene)

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

I prirodno prisutan majčinski genomski DNK (gDNK) u plazmi može potencijalno ometati učinkovitost analize jer se može izdvojiti zajedno s fetalnim cfDNK-om. Genomske razine DNK-a od 1,6, 3,3 i 4,9 ng po uzorku (što odgovara 1., 2. i 3. standardnoj devijaciji iznad srednje očekivane vrijednosti koncentracije gDNK-a nakon 7

dana skladištenja pune krvi¹²) dodane su u cfDNK izdvojen iz majčinske plazme nezahvaćenih ženskih (fetus XX) trudnoća. Uzorci su zatim testirani testom VeriSeq NIPT Solution (n = 16 za svaku koncentraciju). Nisu zamijećeni ometajući utjecaji na učinkovitost analize u prisutnosti povišenih razina gDNK-a.

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

Tablica 23 Potencijalno ometajuće tvari (egzogene)

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

Granica prepoznavanja

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

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

- fetalnoj frakciji
- dubini sekvenciranja
- veličini i složenosti genomskog promatranog područja.

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

Da bi se odredio LOD za prepoznavanje T21, analizirani su uzorci koji se sastoje od mješavine skupnih uzoraka T21 i nezahvaćenih skupnih uzoraka. Te su dvije vrste analita pomiješane putem titracijske serije radi stvaranja niza od sedam razina fetalne frakcije (0, 2, 3, 4, 5, 6 i 10 %). Svaku razinu predstavljalo je ukupno 10 replikata.

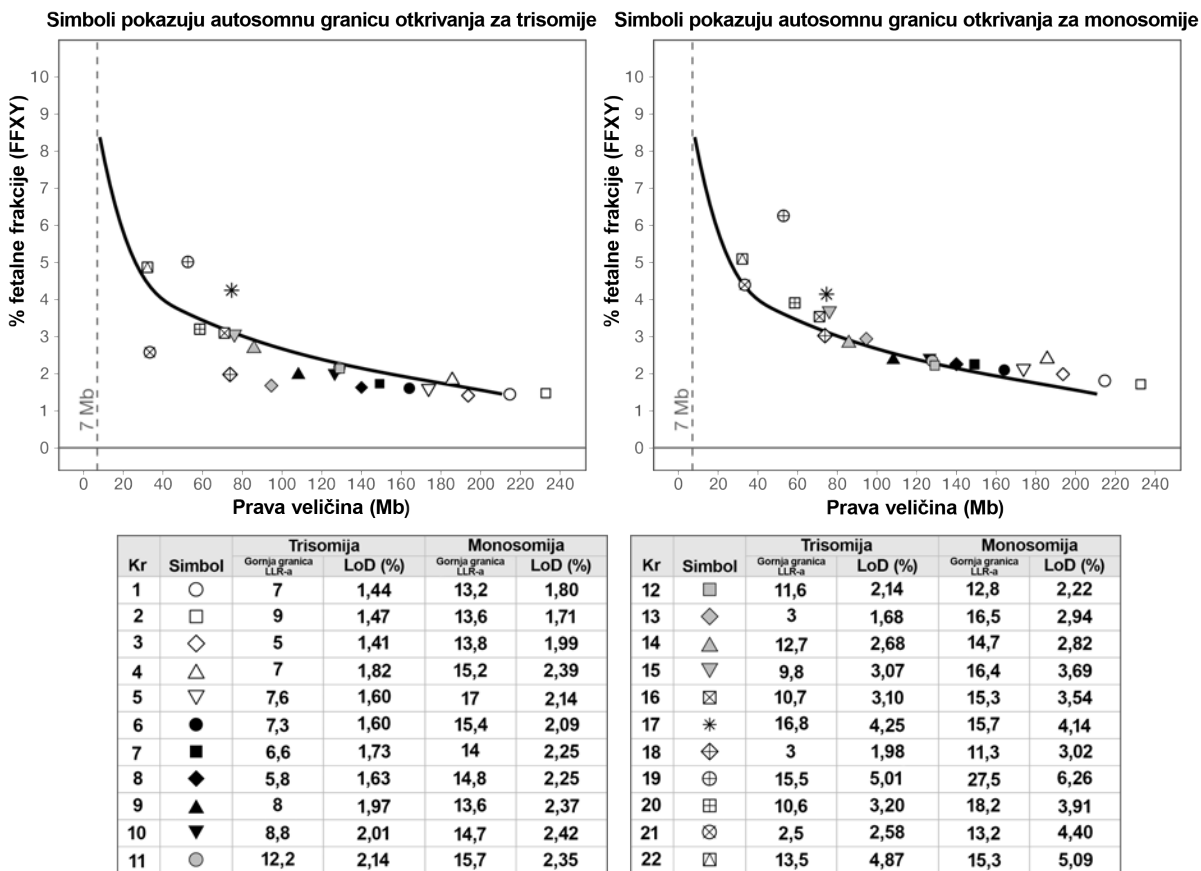
Da bi se dodatno povećala razlučivost rešetke fetalne frakcije za analizu LOD-a, podaci iz tog ispitivanja pojačani su podacima dobivenima razrjeđivanjem in silico. Učinci eksperimentalnog razrjeđivanja i titracije simulirani su kontroliranim miješanjem podataka dobivenih sekvenciranjem. Podaci dobiveni titracijom in silico

pokrili su niz od 14 razina fetalne frakcije (1,25, 1,50, 1,75, 2,00, 2,25, 2,50, 2,75, 3,00, 3,25, 3,50, 3,75, 4,00, 4,25 i 4,50 %) uz 32 replikata za svaku razinu. Na dobivene podatke primijenjena je probit analiza da bi se utvrdio LOD za T21.

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

Na [Slika 2](#) prikazuje se 95-postotna vjerojatnost prepoznavanja za prosječne regije po veličini i autosomne granice prepoznavanja za sve trisomije i sve monosomije. Granična vrijednost za CNV LLR 15,1.

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



Otklanjanje poteškoća

Otklanjanje poteškoća s testom VeriSeq NIPT Solution v2

Neuspjeli rad	Mogući rezultat	Tumačenje	Preporučena radnja	Komentari
Nedovoljno ulazne plazme	Uzorak ne prolazi kontrolu kvalitete	Nedovoljan volumen plazme	Ponovno uzmite krv	Na temelju vizualnog pregleda volumena plazme.
Neispravnost epruvete s krvlju	Krv se nije razdijelila na slojeve	Uzorak nije centrifugiran	Provjerite je li pokrenuta centrifuga i je li epruveta centrifugirana upotrebom odgovarajuće sile. Ponovno uzmite uzorak.	
		Nepravilno skladištenje ili transport uzorka (hemoliza uzorka)	Ponovno uzmite uzorak.	Smrznuti uzorci neće se razdvojiti. Nepravilni uvjeti transporta ili skladištenja mogu dovesti do hemolize uzorka.

Neuspjeli rad	Mogući rezultat	Tumačenje	Preporučena radnja	Komentari
Čep u uzorku ili spor protok	Kontaminacija plazme	Neki uzorci mogu začepiti pločicu za povezivanje ako je uzorak plazme znatno kontaminiran.	Pregledajte uzorak. Pregledajte uzorak pa, ako je preostala plazma u epruveti crvena ili mliječna, otkazite uzorak i zatražite ponovno uzimanje uzorka. Ako se uzorak čini normalan, ponovno ga testirajte.	
	Prelievanje uzorka	Neodgovarajuća vizualna provjera svake epruvete radi utvrđivanja prikladnosti uzorka.	Sve uzorke u obližnjim jažicama na koje je utjecalo prelijevanje proglasite nevaljanim.	Može upućivati na nepravilan transport ili nepravilno skladištenje uzorka prije obrade. Izuzmite neprikladne uzorke iz obrade.
	Kvar na hardveru	Neodgovarajuće uzimanje materijala tijekom izdvajanja.	Ponovno testirajte uzorak. Ako se problem na lokaciji te jažice pojavljuje i s drugim uzorcima, obratite se službi za tehničku podršku tvrtke Illumina.	

Neuspjeli rad	Mogući rezultat	Tumačenje	Preporučena radnja	Komentari
Neuspjeh analize pojedinačnog uzorka pri kontroli kvalitete	Neuspjelo sekvenciranje pri kontroli kvalitete	Mogući su uzroci sljedeći: <ul style="list-style-type: none"> • Nedovoljno genetskog materijala • Pogrešan prijenos tijekom rukovanja uzorkom • Neispravnost reagensa za sekvenciranje 	Provjerite oznake na uzorcima. Provjerite je li na prethodnim uzorcima na relativnom položaju na pločici učinak bio sličan. Ponovno testirajte uzorak.	Upućuje na nedovoljan uzorak ili pogrešan prijenos na platformi ML STAR. Uzrok tome da nema dovoljno genetskog materijala može biti nedostatak DNK-a bez stanica u plazmi ili pak DNK sa stanicama uzrokuje pretjerano razrjeđivanje uzorka za sekvenciranje.
	Mali broj FF-a ili mali broj mjesta koja nisu izuzeta (NES, Non-Excluded Sites)	Nije generirano dovoljno podataka za precizno izvješće.	Ponovite testiranje na plazmi.	
Neuspjela kvantifikacija pri kontroli kvalitete	Neuspjela kvantifikacijska obrada. Medijan serije ispod minimuma	Nedostatan prinos postupka.	Ponovite kvantifikaciju. Ako ponavljanje ne uspije, obratite se službi za tehničku podršku tvrtke Illumina.	Neprolazni mjerni podaci standardne krivulje upućuju na probleme s pripremom biblioteke (tj. na upotrebu etanola koji nije biološkog razreda) ili na probleme s postupkom kvantifikacije.
	Neuspjela kvantifikacijska obrada	Neuspjela standardna krivulja.	Ponovite kvantifikaciju. Ako ponavljanje ne uspije, obratite se službi za tehničku podršku tvrtke Illumina.	

Neuspjeli rad	Mogući rezultat	Tumačenje	Preporučena radnja	Komentari
Neuspjelo stvaranje skupova	Stvaranja skupova uzoraka nije uspjelo	Analiza stvaranja skupova ne može izračunati odgovarajuće volumene skupova.	Ponovno procijenite ciljnu koncentraciju skupa. Ponovno pokrenite analizu stvaranja skupova.	

Otklanjanje poteškoća u radu s radnom stanicom VeriSeq NIPT Microlab STAR

Korak postupka	Šifra pogreške	Dijaloški okvir pogreške	Opis	Korisničko rješenje
Stvaranje serije	EM0044	The Batch ID entered contains forbidden characters. (Uneseni ID serije sadrži zabranjene znakove.)	VeriSeq NIPT Solution v2 u svim poljima s podacima prihvaća samo brojeve, slova, podvlake i spojnice.	Preimenujte seriju i dodijelite joj naziv koji ne sadrži posebne znakove.
Stvaranje serije	EM0051	The Batch ID is greater than 36 characters in length. (ID serije dulji je od 36 znakova.)	VeriSeq NIPT Solution v2 ograničava duljinu naziva serija na maksimalno 36 znakova.	Preimenujte seriju i dodijelite joj naziv koji je kraći od 36 znakova.

Korak postupka	Šifra pogreške	Dijaloški okvir pogreške	Opis	Korisničko rješenje
Stvaranje serije	EM0076	Unable to connect to VeriSeq Onsite Server v2 (Nije moguće povezivanje s poslužiteljem VeriSeq Onsite Server v2)	VeriSeq Onsite Server v2 ne odgovara na zahtjeve za podacima softvera Workflow Manager.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Provjerite je li ML STAR povezan s mrežom. 2. Provjerite je li VeriSeq Onsite Server v2 uključen. 3. Provjerite može li se ML STAR povezati s poslužiteljem VeriSeq Onsite Server v2 (slanjem zahtjeva za odziv). 4. Ako se prethodno navedenim koracima ne riješi problem, obratite se tehničkoj podršci tvrtke Illumina.
Stvaranje serije	EM0118	This batch has been failed and cannot be further processed. (Ta je serija označena da nije valjana i ne može se dalje obrađivati.)	Za navedenu je seriju već utvrđeno da nije valjana te se ne može dalje obrađivati.	U zapisu o seriji na poslužitelju VeriSeq Onsite Server v2 zabilježeno je da odabrana serija nije valjana. Daljnja obrada nije dopuštena. Stvorite drugu seriju s uzorcima koje je potrebno obraditi.
Stvaranje serije	Nije primjenjivo	This batch has already completed processing. Would you like to repool? (Obrada te serije već je dovršena. Želite li ponovno stvoriti skup?)	Navedena serija obrađena je putem stvaranja skupova. Dopušteno je samo ponovno stvaranje skupa.	Skup ponovno stvorite na sljedeći način. <ul style="list-style-type: none"> • Odaberite Re-Pool (Ponovno stvori skup). • Obustavite metodu i prije ponovnog stvaranja skupa provjerite je li naziv serije točan.
Izoliranje plazme	WP0087	Duplicate sample barcodes loaded. (Umetnuti su uzorci s dupliciranim barkodom.)	U sustav su stavljeni uzorci s identičnim barkodom.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pratite upite alata Workflow Manager da biste prepoznali duplicirane uzorke. 2. Uklonite duplikate te na njima promijenite naljepnice ili ih zamijenite. 3. Ponovno umetnite uzorke.

Korak postupka	Šifra pogreške	Dijaloški okvir pogreške	Opis	Korisničko rješenje
Izoliranje plazme	EP0102	Samples specified in the Sample Sheet were not loaded. (Nisu umetnuti uzorci navedeni na listu uzoraka.)	Uzorci navedeni na listu uzoraka nisu među umetnutim barkodovima.	1. Pratite upite softvera Workflow Manager da biste prepoznali koji uzorci nedostaju. 2. Učinite jedno od sljedećeg. <ul style="list-style-type: none"> • U seriju dodajte uzorke koji nedostaju i ponovno umetnite uzorke. • Obustavite metodu i unesite potrebne izmjene na list uzoraka. Ponovno pokrenite metodu.
Umetanje pločica	Nije primjenjivo	Venus Barcode Mask Error (Pogreška maske Venus za barkodove)	Workflow Manager putem maski Venus za barkodove točno povezuje pločice sa serijom.	1. Provjerite kako je smještena pločica i potvrdite da je pravilno raspoređena. 2. Provjerite je li umetnuta odgovarajuća pločica za navedenu seriju.
Izdvajanje cfDNK-a	WE0150	Pressure in the vacuum chamber is too low. (Tlak u vakuumskoj komori je prenizak.)	Workflow Manager neće nastaviti s radom ako je vrijednost tlaka vakuumske cijevi u mirovanju < 400 Torr.	1. Provjerite je li vakuumska cijev presavijena te ima li drugih prepreka u njoj. 2. Otvorite stezaljke za otpuštanje cijevi za otpad, pričekajte da padne tlak, a potom posve zatvorite stezaljke za otpuštanje na cijevi. 3. Provjerite jesu li vakuumski kontroler i pumpa uključeni. 4. Provjerite vakuumsku bocu za otpad. Ako je boca za otpad više od napola puna, ispraznite je. 5. Ako time ne uklonite problem, obratite se službi za tehničku podršku tvrtke Illumina.

Korak postupka	Šifra pogreške	Dijaloški okvir pogreške	Opis	Korisničko rješenje
Izdvajanje cfDNK-a	WE0153	Pressure in the vacuum chamber is too high. (Tlak u vakuumskoj komori je previsok.)	Ako je tlak vakuuma izmjeren prije pokretanja kontrole tlaka previsok, moguće je da dolazi do kvara sustava.	Na poleđini kontrolera provjerite jesu li svi vakuumski spojevi i cijevi učvršćeni.

Korak postupka	Šifra pogreške	Dijaloški okvir pogreške	Opis	Korisničko rješenje
Izdvajanje cfDNK-a	WE0996	Vacuum failed to seal. (Vakuumska brtva ne funkcionira.)	Prije nastavka potrebno je otkloniti problem s brtvom.	<p>Provjerite je li otklonjen problem s brtvom pa odaberite OK (U redu).</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Provjerite je li pločica za povezivanje u ravnini s vakuumskom granom. Rukom u rukavici na silu pritisnite pločicu za povezivanje prema dolje. 2. Osluhnite čuje li se šum vakuuma te provjerite vidi li se tok vode kroz pločicu za povezivanje. 3. U alatu Workflow Manager otvorite prikaz praćenja. Kad očitavanje stvarnog tlaka dosegne barem 50 jedinica tlaka manje od očitavanja tlaka okoline, odaberite OK (U redu) da biste nastavili s izdvajanjem cfDNK-a. 4. Ako se u zadanom razdoblju ne dosegne potrebno očitavanje tlaka, odaberite OK (U redu) da biste nastavili s prvim umetanjem lizata. 5. Puzirajte metodu nakon što se lizat dozira na pločicu za povezivanje. Ponovno namjestite i silom pritisnite pločicu za povezivanje prema dolje. 6. Ako lizat ne protječe kroz pločicu, obratite se tehničkoj podršci tvrtke Illumina.

Korak postupka	Šifra pogreške	Dijaloški okvir pogreške	Opis	Korisničko rješenje
Izdvajanje cfDNK-a	WM0219	If Vacuum is on, manually rest the pump. (Ako je vakuum uključen, ručno stavite pumpu u mirovanje.)	Vakuum može ostati uključen nakon obustave metode tijekom izdvajanja.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Na vakuumskom kontroleru pritisnite gumb za Power (napajanje) da biste isključili vakuum. 2. Pričekajte 10 sekundi, a zatim ponovno pritisnite gumb za Power (napajanje) da biste uključili vakuum.
Izdvajanje cfDNK-a	EE0477	An error has occurred while moving a plate. (iSWAP error) (Pojavila se pogreška prilikom premještanja pločice. (iSWAP pogreška))	Ako se pojavi iSWAP pogreška (pad pločice, neuspjelo podizanje i slično), sustav će od vas zatražiti da ručno dovršite premještanje pločice.	Provjerite može li se pločica ponovno upotrijebiti (nema prolivenog materijala). <ul style="list-style-type: none"> • Ako se pločica ne može ponovno upotrijebiti, prekinite obradu. • Ako se pločica može ponovno upotrijebiti, slijedite prikazane upute da biste ručno dovršili prijenos pločice.
Izdvajanje cfDNK-a	EE0519	Scanned barcode does not match Binding Plate barcode on record. (Očitani barkod ne podudara se s barkodom pločice za povezivanje koji je u zapisu.)	Umetnuta pločica za povezivanje ne podudara se s barkodom uklonjene pločice.	Pripazite da se pločica koja se umeće podudara s barkodom koji je u zapisu (očekivani barkod provjerite u zapisniku praćenja).

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

Reference

1. Nagaoka S, Hassold T, Hunt P. Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nat Rev Genet.* 2012;13(7):493-504. doi:10.1038/nrg3245.
2. Garnder RJ, Sutherland GR, Schaffer LG. *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling.* 4th edition. New York (NY): Oxford University Press; 2012.
3. Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, Ogilvie C, D'Antonio F. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015 Jan;45(1):16-26. doi: 10.1002/uog.14636.
4. American College of Obstetricians and Gynecologists. Screening for fetal aneuploidy. Practice Bulletin No. 163. *Obstet Gynecol.* 2016; 127(5):e123-137.
5. Gil MM, Accurti V, Santacruz B, Plana MN, 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.

Povijest revizija

Dokument	Datum	Opis promjene
Broj dokumenta 1000000078751 v09	Travanj 2024.	<p>Uklonjeno</p> <ul style="list-style-type: none"> Zastarjeli broj dijela 20030577. Maksimalni kapacitet epruveta centrifuge za epruvete za prikupljanje krvi. <p>Dodano</p> <ul style="list-style-type: none"> Novi broj dijela 20101927 za VeriSeq Onsite Server v2. Jedinica dimenzije za epruvete za prikupljanje krvi od 10 ml. Pojašnjenje kompatibilnih verzija softvera SoftMax Pro. Napomena kojom se pojašnjava da se smije upotrebljavati samo kompatibilno plastično posuđe radi mogućnosti izmjene na uređaju VeriSeq NIPT Microlab STAR. Napomena s upozorenjem o miješanju/kontaminaciji uzoraka u odjeljku o tumačenju rezultata. Izjava o oprezu da se ne zamrzava uzorak pune krvi prikupljen u Streck Cell-Free DNA BCT. Izjava o oprezu da se izbjegava izlaganje uzorka povišenim temperaturama. Pojašnjenje u vezi s ograničenjima analize i uvjetima obnovljivosti. Pojašnjenje granične vrijednosti za CNV LLR na slici 2 u odjeljku Granica prepoznavanja. <p>Ažurirano</p> <ul style="list-style-type: none"> Referenca na kompatibilnu posudu za reagens promijenjena iz Roche Reagent Tub u Illumina Reagent Tub i dodan je novi broj dijela. Kataloški broj za Thermo Fisher Multifuge X4 Pro-MD promijenjen u 75016034. Izjava o oprezu da različiti volumeni jažica mogu uzrokovati neuspješnu automatiziranu kontrolu kvalitete uzoraka. Referenca na upute za upotrebu instrumenta.
Broj dokumenta 1000000078751 v08	Kolovoz 2022.	<p>Ažuriranje broja dijela tijekom rada</p> <p>Uklonjene upute za miješanje pipetiranjem ako je pločica s bibliotekama bila zamrznuta.</p>

Dokument	Datum	Opis promjene
Broj dokumenta 1000000078751 v07	Svibanj 2022.	<p>Podijeljena ograničenja postupka na Izvješćivanje o testu VeriSeq NIPT Solution v2 i dodane prve dvije grafičke oznake. Preostali tekst pod novim podnaslovom: Ograničenja analize.</p> <p>Uklonjeno</p> <ul style="list-style-type: none"> • VeriSeq iz svih oznaka reagensa. • Nalijepite barkod pločice na VeriSeq NIPT Adapter Plate u pripremi biblioteka. <p>Dodano</p> <ul style="list-style-type: none"> • Riječ „potvrđena” za vodu bez DNaze/RNaze. • Jedan od sljedećih čitača mikropločica ili ekvivalentan te SpectraMax M2, M3, M4, M5 i napomena. • U odjeljak VeriSeq NIPT Microlab STAR radi objašnjenja što učiniti tijekom otklanjanja pogreške. • Napomena da se vizualno pregledaju jažice. • Upute za serije s 24 i 48 uzoraka u svim odjeljcima o protokolu. • Upute kada upotrebljavati ljubičasti ili ekvivalentni prilagodnik. • Riječi u odjeljku o demografiji i karakteristikama trudnoće da obuhvate rezultate za prvo tromjesečje trudnoće. • Grafička oznaka u specifikacije pločice s dubokim jažicama da se obuhvati otpornost na torziju. <p>Ažurirano</p>
		<ul style="list-style-type: none"> • Riječi o jedinstvenim nazivima serija radi pojašnjenja uz primjer. • Simboli i oblikovanje za napomene, oprez i upozorenja. • Rezultati podređenih grafičkih oznaka za test. • Gvanidin tiocijanat u gvanidin-hidroklorid. • CVS u BVS (osnovni vakuumski sustav) • Tekst o upotrebi probira na razini genoma i rezultatu LLR-a. • Specifikacije: Specifikacije posude za reagens, pločica s dubokim jažicama, pločica s 384 jažice, pločica s 96 jažica
Broj dokumenta 1000000078751 v06	Kolovoz 2021.	Ažurirana adresa ovlaštenog predstavnika za EU.

Dokument	Datum	Opis promjene
<p>Broj dokumenta 1000000078751 v05</p>	<p>Prosinac 2020.</p>	<p>Ažurirani odjeljci Načela postupka, Upozorenja i mjere opreza te Oznaka proizvoda dodatnim objašnjenjima radi zadovoljenja regulatornih zahtjeva.</p> <p>Manja ažuriranja sadržaja u protokolu radi podudaranja s trenutnim stilom i organizacijom tvrtke Illumina.</p> <p>Ispravljen opis kromosoma 21 iz "drugog po redu najmanjeg ljudskog autosoma" u "najmanjeg ljudskog autosoma" u odjeljku Preciznost koji se odnosi na analitička radna svojstva.</p> <p>Dodane izjave o oprezu koje se tiču nepravilne upotrebe rezervoara i rizika od amalgamacije uzoraka u odjeljcima Priprema izolata plazme i Tumačenje rezultata.</p> <p>Dodani novi brojevi poslužiteljskih i softverskih dijelova za izdanje novog modela poslužitelja i ažuriranja brojeva softverskih dijelova.</p> <p>Dodane mjere opreza u informacije o protokolima i otklanjanju poteškoća radi bavljenja prelijevanjem uzoraka i njegovim sprječavanjem.</p> <p>Ažurirani aktivni sastojci u odjeljku Standard kvantifikacije DNK-a u kutiji dodatne opreme reagensa radi usklađenost sa sigurnosno-tehničkim listom.</p> <p>Ažurirane konvencije imenovanja modula Local Run Manager VeriSeq NIPT radi usklađenosti s ostalom dokumentacijom.</p> <p>Dodana povijest revizija.</p>
<p>Broj dokumenta 1000000078751 v04</p>	<p>Listopad 2020.</p>	<p>Manje ispravke.</p>
<p>Broj dokumenta 1000000078751 v03</p>	<p>Rujan 2020.</p>	<p>Ažuriran popis materijala tako da sadrži specifikacije laboratorijskog posuđa zajedno s poznatim kompatibilnim opcijama.</p>
<p>Broj dokumenta 1000000078751 v02</p>	<p>Veljača 2020.</p>	<p>Ažurirano predstavljanje informacija o kliničkim radnim svojstvima kako bi se bolje objasnile razlike između osnovnih probira i probira na razini genoma.</p> <p>Dodan novi odjeljak Razlike u djelovanju osnovnih probira i probira na razini genoma.</p> <p>Uklonjene kontradiktorne informacije o neobaveznosti dodatnog izvješća iz odjeljka Načela postupka.</p> <p>Ažurirana konvencija imenovanja softvera VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 u cijelom dokumentu radi stilske dosljednosti.</p> <p>Ažurirane adrese Illumine Australija i Nizozemska kako bi odražavale nedavne promjene.</p>

Dokument	Datum	Opis promjene
Broj dokumenta 1000000078751 v01	Kolovoz 2019.	Uklonjen duplicirani korak u uputama za izdvajanje cfDNK-a koji je uzrokovala pogreška softvera za grafički prijelom.
Broj dokumenta 1000000078751 v00	Svibanj 2019.	Početno izdanje.

Patenti i žigovi

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

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

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

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

© 2023. Illumina, Inc. Sva prava pridržana.

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

Podaci za kontakt



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



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

Oznaka proizvoda

Sveobuhvatno objašnjenje simbola koji se nalaze na pakiranju proizvoda i naljepnicama potražite u legendi simbola na web-mjestu support.illumina.com na kartici *Documentation* (Dokumentacija) za svoj komplet.

Sažetak o sigurnosti i učinkovitosti (SSP, Summary of Safety and Performance) nalazi se na web-mjestu <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> nakon pokretanja Europske baze podataka o medicinskim proizvodima (Eudamed). Povezan je s osnovnim UDI-DI-jem (0081627002NIPTRP).