

## Príbalový leták

NA DIAGNOSTICKÉ POUŽITIE IN VITRO

## Účel použitia

VeriSeq™ NIPT Solution v2 je *in-vitro* diagnostický test určený použitie ako skrínigový test na detekciu genómových fetálnych genetických anomálií zo vzoriek materskej periférnej celej krvi u tehotných žien najmenej v 10. týždni tehotenstva. VeriSeq NIPT Solution v2 využíva sekvenovanie celého genómu na detekciu čiastkových duplikácií a delécií pre všetky autozomy, ako aj stavu aneuploidie pre všetky chromozómy. Tento test ponúka možnosť vyžiadania si vykazovania aneuploidie pohlavných chromozómov (SCA). Tento produkt sa nesmie používať ako výlučný základ na diagnostiku ani iné rozhodnutia týkajúce sa riadenia tehotenstva.

VeriSeq NIPT Solution v2 obsahuje nasledujúce súčasti: aplikáciu VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 pre zariadenie VeriSeq NIPT Microlab STAR, VeriSeq NIPT Sample Prep a VeriSeq Onsite Server v2 so softvérom VeriSeq NIPT Assay Software v2. Test VeriSeq NIPT Solution v2 je určený na použitie so sekvenátorom novej generácie.

## Zhrnutie a vysvetlenie analýzy

Abnormality chromozómov plodu, konkrétne aneuploidia, čo je abnormálny počet chromozómov, sú bežnou príčinou reprodukčného zlyhania, vrodených anomálií, oneskoreného vývoja a duševných postihnutí. Aneuploidia postihuje približne 1 z 300 živo narodených detí, pričom táto miera je omnoho vyššia u potratených a mŕtvych plodov.<sup>1,2</sup> Až donedávna existovali pri týchto poruchách dva typy prenatalných testov: diagnostické testy alebo skrínig. Súčasťou diagnostických testov sú invazívne zákroky, ako je amniocentéza alebo odber choriových klkov. Tieto metódy testovania sa považujú za zlatý štandard detekcie fetálnej aneuploidie. V 0,11 až 0,22 % prípadov sú však spojené s rizikom potratu.<sup>3</sup> V prípade konvenčných vyšetrení hodnôt viacerých markerov nehrozí riziko potratu, pretože sú neinvazívne, sú však menej presné než diagnostické testy. Ich úspešnosť detekcie trizómie chromozómu 21 sa pohybuje medzi 69 až 96 % v závislosti od konkrétneho vyšetrenia, veku matky a dĺžky tehotenstva v čase testovania.<sup>4</sup> Dôležité je, že tieto vyšetrenia majú mieru falošnej pozitivity približne 5 %, čo môže viesť k potrebe potvrdenia invazívnym diagnostickým testovaním, a tým k riziku potratu v dôsledku zákroku.<sup>4</sup> Aj ultrazvukové vyšetrenia môžu zistiť abnormality chromozómov, ale presnosť tejto metódy je v porovnaní s predchádzajúcimi metódami ešte nižšia.

Neinvazívnym prenatalným testovaním (NIPT), ktoré využíva celogenómové sekvenovanie mimobunkovej DNA (cfDNA) získanej z krvnej plazmy matky v 10. týždni tehotenstva alebo neskôr, možno zistiť aneuploidiu plodu pre chromozómy 21, 18, 13, X a Y s vysokým stupňom presnosti. Nedávna metaanalýza viacerých klinických štúdií informovala o nasledujúcich vážených združených hodnotách detekcie a špecifickosti pre trizómia chromozómov 21 a 18 pri tehotenstve s jedným plodom: trizómia chromozómu 21: 99,7 % a 99,96 % a trizómia chromozómu 18: 97,9 % a 99,96 %.<sup>5</sup> Podľa jednej štúdie môže viesť použitie testu NIPT ako hlavného vyšetrenia pri všetkých tehotenstvách k zníženiu počtu invazívnych zákrokov na potvrdenie diagnózy o 89 %.<sup>6</sup>

Vzhľadom na významné zníženie miery falošnej pozitivity testu NIPT v porovnaní s konvenčným vyšetrením hodnôt viacerých markerov vydalo mnoho odborných lekárskejších organizácií stanoviská podporujúce niekoľko indikácií na použitie testu NIPT.

Ponúkanie testu NIPT všetkým tehotným ženám podporujú tieto organizácie: International Society for Prenatal Diagnosis (Medzinárodná spoločnosť pre prenatálnu diagnostiku), American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG, Americké združenie pôrodníc a gynekológov)/Society for Maternal Fetal Medicine (SMFM, Spoločnosť pre medicínu matky a plodu), American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG, Americké združenie pre lekársku genetiku a genomiku) a European Society of Human Genetics (ESHG, Európska spoločnosť pre ľudskú genetiku)/American Society of Human Genetics (ASHG, Americká spoločnosť pre ľudskú genetiku).<sup>7, 8, 9</sup> Odporúča sa poskytovať poradenstvo pred testom, získať informovaný súhlas pacientky a vykonávať diagnostické testovanie na potvrdenie pozitívneho výsledku vyšetrenia cfDNA.<sup>4</sup>

VeriSeq NIPT Solution v2 je neinvazívny diagnostický test in vitro, ktorý využíva celogenómové sekvenovanie fragmentov cfDNA získaných zo vzoriek plnej periférnej krvi tehotných matiek v 10. týždni tehotenstva a neskôr. Test ponúka dva typy vyšetrenia: základné a celogenómové. Základné vyšetrenie poskytuje informácie len o stave aneuploidie chromozómov 21, 18, 13, X a Y. Celogenómové vyšetrenia poskytujú informácie o čiastočnej duplikácii a delícii pri všetkých autozómoch a o stave aneuploidie pri všetkých chromozómoch. Oba typy vyšetrení poskytujú možnosť vykazovania aneuploidie pohlavného chromozómu (SCA) s vykazovaním pohlavia plodu alebo bez neho. Vykazovanie aneuploidie pohlavného chromozómu (SCA) možno vypnúť. Ak je možnosť vykazovania aneuploidie pohlavného chromozómu (SCA) vypnutá, nebude vykázané ani pohlavie plodu. Ďalšie informácie o možnostiach vykazovania pohlavia nájdete v Príručke k softvéru *VeriSeq NIPT Solution v2* (dokument č. 1000000067940).

## Zásady postupu

Systém VeriSeq NIPT Solution v2 je automatizované riešenie na laboratórne testovanie NIPT, ktoré pozostáva z automatizovanej prípravy vzoriek a analýzy údajov sekvenovania. Súpravy na prípravu vzoriek VeriSeq NIPT Sample Prep sú špecializované reagenty na jedno použitie, ktoré sa používajú spolu so systémom VeriSeq NIPT Microlab STAR na prípravu dávok 24, 48 alebo 96 vzoriek na sekvenovanie novej generácie.

Celogenómové údaje sekvenovania z oboch koncov sa analyzujú pomocou špecializovaného softvéru na analýzu VeriSeq NIPT Assay Software v2. Následne sa vytvorí správa, ktorá poskytuje kvalitatívne výsledky.

Pracovný postup sa skladá z týchto krokov: odber vzoriek, izolácia plazmy, extrakcia cfDNA, príprava knižníc, kvantifikácia knižníc, združovanie (pooling) knižníc, sekvenovanie a analýza, ktoré sú ďalej opísané podrobnejšie:

- **Odber vzoriek** – Do skúmavky Streck na odber bezbunkových krvných vzoriek DNA sa odoberie 7 – 10 ml periférnej plnej krvi matky, čo zabráni lýze buniek a kontaminácii genómu a stabilizuje plnú krv.
- **Izolácia plazmy** – Do 5 dní od odberu sa plazma izoluje z periférnej plnej krvi matky pomocou štandardných odstredňovacích techník. Systém VeriSeq NIPT Microlab STAR nasáva a rozdeľuje plazmu v rámci doštičky s 96 hlbokými jamkami na následné spracovanie. V prípade potreby opakovaného testovania môžu byť vzorky po spracovaní opätovne uzatvorené a skladované pri teplote 4 °C počas ďalších 5 dní (celkom 10 dní po odbere krvi).

**UPOZORNENIE**

Prekročenie uvedených časov skladovania môže negatívne ovplyvniť mieru zlyhania jednotlivých vzoriek.

- **Extrakcia cfDNA** – Purifikácia cfDNA z plazmy sa dosahuje adsorpciou na väzbovú doštičku, premytím väzbovej doštičky s cieľom odstrániť kontaminanty a elúciou.
- **Príprava knižníc** – Purifikované fragmenty cfDNA prechádzajú procesom opravy koncov, pri ktorej sa menia 5' a 3' kohézne konce (presahy) na nekohézne (tupé) konce. Následne sa k 3' koncom pridá nukleotid deoxyadenozín, čím vznikne presah tvorený jednou bázou. Indexačné adaptéry, ktoré obsahujú jednobázový 3' deoxytimidínový presah, sa potom naviažu na spracované fragmenty cfDNA. Naviazaná DNA sa purifikuje použitím guľôčok reverzibilnej imobilizácie na pevnej fáze. Každá vzorka v množine 24, 48 alebo 96 vzoriek dostane jedinečný indexovaný adaptér. Adaptéry slúžia na dva účely:

**UPOZORNENIE**

Postupujte mimoriadne opatrne, aby nedošlo ku krížovej kontaminácii indexov, ktorá by mohla viesť k nesprávnym výsledkom.

- Pomocou indexov možno identifikovať vzorky v následnom sekvenovaní.
- Indexované adaptéry obsahujú sekvencie, ktoré umožňujú zachytenie knižnice na pevnom povrchu sekvenačného prietokového článku s cieľom vytvárania klastrov a následného sekvenovania.
- **Kvantifikácia** – Produkt knižnice sa kvantifikuje pomocou fluorescenčného farbiva s koncentráciou určenou porovnaním so štandardnou krivkou DNA.
- **Združovanie knižníc a sekvenovanie** – Knižnice so vzorkami sa združujú do skupín 24 alebo 48 vzoriek v množstvách upravených tak, aby sa minimalizovala odchýlka pokrytia. Každá skupina sa potom sekvenuje použitím systému sekvenovania novej generácie.
- VeriSeq NIPT Solution v2 neobsahuje vybavenie na sekvenovanie ani spotrebný materiál.
- **Analýza** – Analýza jednotlivých vzoriek sa skladá z týchto krokov:
  - Identifikácia fragmentov knižnice sekvenciou indexu a zarovnanie čítaní z oboch koncov s referenčným ľudským genómom.
  - Odhad fetálnej frakcie knižnice spojením informácií z distribúcie dĺžok a genómových súradníc fragmentov knižnice.
  - Štatistický model po započítaní známych skreslení zistí tie oblasti genómu, ktoré sú v knižnici zastúpené v príliš malej alebo veľkej miere spôsobom, ktorý je v súlade s anomáliou na odhadovanej úrovni fetálnej frakcie.
  - Správa NIPT poskytuje súhrn výsledkov vybranej ponuky testov a okrem odhadu fetálnej frakcie vzoriek, ktoré prešli kontrolou kvality, je v nej uvedená poznámka ANOMALY DETECTED (ZISTILA SA ANOMÁLIA) alebo NO ANOMALY DETECTED (NEZISTILA SA ŽIADNA ANOMÁLIA).
  - Doplnková správa (Supplementary Report) poskytuje kvantitatívne metriky, ktoré charakterizujú každú zistenú anomáliu.

## Obmedzenia postupu

### Obmedzenia analýzy

- Dôkazy podporujúce citlivosť a špecificitu testu sa vzťahujú na tehotenstvá s jedným plodom a dvoma plodmi. Tento návod na použitie neuvádza údaje o citlivosti alebo špecificite tehotenstva s tromi a viacerými plodmi.
- Systém VeriSeq NIPT Solution v2 nie je určený na detekciu polyploidie, napríklad triploidie.
- Systém VeriSeq NIPT Solution v2 nie je určený na detekciu vyvážených chromozomálnych preusporiadaní.
- Táto analýza vyžaduje materskú periférnu celú krv od tehotných žien, ktoré sú najmenej v 10. týždni tehotenstva.
- V rámci základných skríningov sa test VeriSeq NIPT Solution v2 zameriava na vyhľadanie špecifických chromozomálnych abnormalít. Výsledky označené ako NO ANOMALY DETECTED (NEZISTILA SA ŽIADNA ANOMÁLIA) nevylučujú možnosť chromozomálnych anomálií testovaných chromozómov. Negatívny výsledok nevylučuje, že v rámci tehotenstva nedošlo k chromozomálnym anomáliám, iným genetickým poškodeniam alebo vrodeným anomáliám (napríklad anomália otvorenej neurálnej trubice).
- V rámci genómových skríningov môžu veľké delécie a duplikácie, ktoré sú menšie než 75 % veľkosti chromozómu, naznačovať aneuploidiu celého chromozómu.
- V prípade genómových testov sú niektoré oblasti z analýzy vylúčené. Zoznam vylúčených oblastí nájdete na webovej lokalite podpory spoločnosti Illumina. Detekcia genomckej anomálie sa vykonáva iba na nevylúčených oblastiach.
- Vykazovanie pohlavia plodu nie je dostupné vo všetkých oblastiach z dôvodu nariadení upravujúcich vykazovanie pohlavia.
- Podľa údajov v literatúre môžu byť výsledky skríningu bezbunkovej DNA narušené niektorými materskými a fetálnymi faktormi. Niektoré z nich (nie však všetky) uvádzame nižšie:
  - nedávna krvná transfúzia matky,
  - predchádzajúca transplantácia orgánu matky/transplantácia kmeňových buniek,
  - autoimunitné ochorenie matky,
  - novotvary v tele matky (benígne a malígne),
  - mozaicizmus matky,
  - variácie počtu kópií u matky,
  - fetoplacentálny mozaicizmus/obmedzený placentálny mozaicizmus,
  - úmrtie plodu/zánik dvojčaťa.

## Vytváranie správ v softvéri VeriSeq NIPT Solution v2

- VeriSeq NIPT Solution v2 je skriningový test, ktorý sa nemá vyhodnocovať izolovane od iných klinických nálezov a výsledkov testov. Závěry o fetálnom stave a rozhodnutia o manažmente tehotenstva sa nemajú zakladať len na výsledkoch skriningu NIPT.<sup>7</sup>
- VeriSeq NIPT Solution v2 vykazuje tieto parametre:
  - Základné vyšetrenie testuje nadmerné zastúpenie chromozómov 13, 18, a 21.
  - Celogenómové vyšetrenie testuje slabé alebo nadmerné zastúpenie všetkých autozómov vrátane čiastočných delécií a duplikácií v rozsahu aspoň 7 Mb.
  - Pri jednopočetných tehotenstvách, pri ktorých je pre vykazovanie pohlavia vybraná možnosť Yes (Áno) alebo SCA (aneuploidia pohlavných chromozómov), zisťuje tieto anomálie pohlavných chromozómov: XO, XXX, XXY a XYY.
  - Pri jednopočetných tehotenstvách, pri ktorých je pre vykazovanie pohlavia vybraná možnosť Yes (Áno), sa vykazuje pohlavie plodu.
  - Prítomnosť chromozómu Y pri dvojpočetných tehotenstvách.

## Súčasti produktu

Systém VeriSeq NIPT Solution v2 (časť č. 20030577) sa skladá z týchto súprav na prípravu vzoriek:

- Súprava na prípravu vzoriek VeriSeq NIPT Sample Prep (24 vzoriek) (č. 20025895)
- Súprava na prípravu vzoriek VeriSeq NIPT Sample Prep (48 vzoriek) (č. 15066801)
- Súprava na prípravu vzoriek VeriSeq NIPT Sample Prep (96 vzoriek) (č. 15066802)

Systém VeriSeq NIPT Solution v2 (časť č. 20030577) sa skladá z týchto súčastí softvéru:

- Softvér na analýzu VeriSeq NIPT Assay Software v2 (časť č. 20047024), predinštalovaný na miestnom serveri VeriSeq Onsite Server v2.
  - Miestny server VeriSeq Onsite Server v2 (časť č. 20028403 alebo 20047000) alebo existujúci VeriSeq Onsite Server (časť č. 15076164 alebo 20016240) aktualizovaný na verziu 2.
- Aplikácia VeriSeq NIPT Workflow Manager v2, (časť č. 20044988), predinštalovaná v systéme VeriSeq NIPT Microlab STAR.
  - Systém VeriSeq NIPT Microlab STAR (časť č. Hamilton Company Reno: 95475-01 (115 V) a 95475-02 (230 V), Hamilton Company Bonaduz: 806288).
- Modul Local Run Manager VeriSeq NIPT module (časť č. 20044989)

# Reagencie

## Dodávané reagencie

Spoločnosť Illumina dodáva tieto reagencie: Súprava na prípravu vzoriek VeriSeq NIPT Sample Prep (24 vzoriek) (časť č. 20025895), Súprava na prípravu vzoriek VeriSeq NIPT Sample Prep (48 vzoriek) (časť č. 15066801) a Súprava na prípravu vzoriek VeriSeq NIPT Sample Prep (96 vzoriek) (časť č. 15066802). Súprava na prípravu vzoriek VeriSeq NIPT Sample Prep je nakonfigurovaná na použitie so systémom VeriSeq NIPT Microlab STAR (ML STAR) (časť č. 95475-01, 95475-02 alebo 806288), ktorý poskytuje spoločnosť Hamilton.

### VeriSeq NIPT Sample Prep, Extraction Box (príprava vzoriek, balenie na extrakciu)

Tabuľka 1 Balenie na extrakciu VeriSeq NIPT Extraction Box (24) a (48), číslo súčasti 20025869 a 15066803

Názov reagentu na štítku	Počet nádob v súprave	Aktívne látky	Skladovanie
Lysis Buffer (Lyzačný pufer)	1	Guanidín-hydrochlorid v pufrovanom vodnom roztoku	15 °C až 30 °C
Wash Buffer I (Premývací pufer I)	1	Guanidín-hydrochlorid a 2-propanol v pufrovanom vodnom roztoku	15 °C až 30 °C
Wash Buffer II (Premývací pufer II)	1	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci soli	15 °C až 30 °C
Elution Buffer (Pufer na elúciu)	1	Pufrovaný vodný roztok	15 °C až 30 °C
Proteinase Buffer (Proteinázový pufer)	1	Glycerol v pufrovanom vodnom roztoku	15 °C až 30 °C
Proteinase K (Proteináza K)	3	Lyofilizovaná proteináza K	15 °C až 30 °C

Tabuľka 2 Balenie na extrakciu VeriSeq NIPT Extraction Box (96), č. súčasti 15066807

Názov reagentu na štítku	Počet nádob v súprave	Aktívne látky	Skladovanie
Lysis Buffer (Lyzačný pufer)	1	Guanidín-hydrochlorid v pufrovanom vodnom roztoku	15 °C až 30 °C
Wash Buffer I (Premývací pufer I)	1	Guanidín-hydrochlorid a 2-propanol v pufrovanom vodnom roztoku	15 °C až 30 °C

Názov reagensie na štítku	Počet nádob v súprave	Aktívne látky	Skladovanie
Wash Buffer II (Premývací pufer II)	2	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci soli	15 °C až 30 °C
Elution Buffer (Pufer na elúciu)	1	Pufrovaný vodný roztok	15 °C až 30 °C
Proteinase Buffer (Proteinázový pufer)	1	Glycerol v pufrovanom vodnom roztoku	15 °C až 30 °C
Proteinase K (Proteináza K)	4	Lyofilizovaná proteináza K	15 °C až 30 °C

### VeriSeq NIPT – príprava vzoriek, škatuľa na prípravu knižnice

Tabuľka 3 Škatuľa na prípravu knižnice VeriSeq NIPT (24) a (48), č. súčasti 20026030 a 15066809

Názov reagensie na štítku	Počet nádob v súprave	Aktívne látky	Skladovanie
End Repair Mix (Zmes na opravu koncov)	1	DNA polymeráza a dNTP v pufrovanom vodnom roztoku	-25 °C až -15 °C
Zmes A-Tailing Mix	1	DNA polymeráza a dATP v pufrovanom vodnom roztoku	-25 °C až -15 °C
Ligation Mix (Ligačná zmes)	1	DNA-ligáza v pufrovanom vodnom roztoku	-25 °C až -15 °C
Hybridization Buffer (Hybridizačný pufer)	1	Pufrovaný vodný roztok	-25 °C až -15 °C
NIPT DNA Adapter Plate (Doštička adaptéra DNA NIPT)	1	Oligonukleotidy v pufrovanom vodnom roztoku	-25 °C až -15 °C

Tabuľka 4 Balenie na prípravu knižnice VeriSeq NIPT Library Prep (96), č. súčasti 15066810

Názov reagensie na štítku	Počet nádob v súprave	Aktívne látky	Skladovanie
End Repair Mix (Zmes na opravu koncov)	1	DNA polymeráza a dNTP v pufrovanom vodnom roztoku	-25 °C až -15 °C
Zmes A-Tailing Mix	2	DNA polymeráza a dATP v pufrovanom vodnom roztoku	-25 °C až -15 °C

Názov reagensie na štítku	Počet nádob v súprave	Aktívne látky	Skladovanie
Ligation Mix (Ligačná zmes)	2	DNA-ligáza v pufrovanom vodnom roztoku	-25 °C až -15 °C
Hybridization Buffer (Hybridizačný pufer)	1	Pufrovaný vodný roztok	-25 °C až -15 °C
NIPT DNA Adapter Plate (Doštička adaptéra DNA NIPT)	1	Oligonukleotidy v pufrovanom vodnom roztoku	-25 °C až -15 °C

### VeriSeq NIPT Sample Prep, Accessory Box (príprava vzoriek, balenie s príslušenstvom)

Tabuľka 5 Balenie s príslušenstvom VeriSeq NIPT Accessory Box, č. súčasti 15066811

Názov reagensie na štítku	Počet nádob v súprave	Aktívne látky	Skladovanie
DNA Binding Plate (Doštička na viazanie DNA)	1	Propylenénová mikrodoštička s modifikovanou silikónovou membránou	2 °C až 8 °C
Resuspension Buffer (Pufer na resuspenziu)	1	Pufrovaný vodný roztok	2 °C až 8 °C
Sample Purification Beads (Gulôčky na purifikáciu vzorky)	1	Paramagnetické gulôčky v pevnom skupenstve v pufrovanom vodnom roztoku	2 °C až 8 °C
DNA Quantification Reagent (Reagencia kvantifikácie DNA)	1	Farbivo na interkaláciu do DNA v DMSO	2 °C až 8 °C
DNA Quantification Standard (Štandard kvantifikácie DNA)	1	Štandard dsDNA, nešpecifická DNA a azid sodný v pufrovanom vodnom roztoku	2 °C až 8 °C

### VeriSeq NIPT – príprava vzoriek, skúmanky pracovného toku a štítky

Tabuľka 6 Skúmanky a štítky pracovného toku, č. súčasti 15071543

Názov položky na štítku	Počet položiek v súprave	Skladovanie
Štítok (LBL) – čiarový kód doštičky	9	15 °C až 30 °C



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

## Reagencie, ktoré sa nedodávajú

### Vyžadované reagencie, ktoré sa nedodávajú

- Reagencie a spotrebný materiál vyžadovaný na sekvenovanie v systéme sekvenovania novej generácie
- Certifikovaná voda bez DNázy/RNázy
- 100 % etanol (200 proof) v kvalite vhodnej na molekulárnu biológiu

**POZNÁMKA** Etanol, ktorý nie je na úrovni určenej na molekulárnu biológiu, môže mať negatívny vplyv na výkon analýzy.

### Voliteľné reagencie, ktoré sa nedodávajú

- Dulbeccov fosfátom pufrovaný fyziologický roztok (DPBS) pre kontrolu bez šablóny (NTC)

## Skladovanie a manipulácia

1. Izbová teplota je definovaná ako teplota medzi 15 °C a 30 °C.
2. Všetky reagencie sú určené len na jedno použitie. Reagencie pripravené na použitie musia byť ihneď použité.
3. Ak sa poškodí alebo poruší balenie alebo obsah ktorejkoľvek súčasti testu VeriSeq NIPT Solution, obráťte sa na zákaznícky servis spoločnosti Illumina.
4. Reagencie sú stabilné až do dátumu expirácie uvedeného na štítku súpravy, pokiaľ sa skladujú pri predpísaných teplotách. Podmienky skladovania sú uvedené v stĺpci Skladovanie v tabuľkách v časti [Reagencie na strane 6](#). Nepoužívajte reagencie po dátume expirácie.
5. Zmeny vo fyzickom vzhľade dodaných reagentov môžu naznačovať zhoršenie kvality materiálov. Ak sa zmení fyzický vzhľad (napr. evidentná zmena farby reagentov alebo zakalenie so zrejmu mikrobiálnou kontamináciou), reagencie nepoužívajte.

6. Pri manipulácii s guľôčkami na purifikáciu vzorky dodržujte nasledujúce osvedčené postupy:
  - Guľôčky nikdy nezmrazujte.
  - Pred použitím počkajte, kým guľôčky dosiahnu izbovú teplotu.
  - Bezprostredne pred použitím guľôčky vortexujte, kým sa dobre rozptýlia a získajú homogénne sfarbenie.
7. V lyzačnom pufri, premývacom pufri I, premývacom pufri II, elučnom pufri a proteinázovom pufri sa môžu tvoriť viditeľné zrazeniny alebo kryštály. Pred použitím ich dôkladne vortexujte a potom vizuálne skontrolujte, či sa v obsahu nenachádzajú zrazeniny.
8. Plnú krv po odbere nikdy nezmrazujte.
9. Knižnice sekvenujte čo najskôr po združení. Združené knižnice sú stabilné do siedmich dní pri teplote  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  až  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nevyžaduje sa ďalšia denaturácia, ak sú skladované uvedený čas za uvedených podmienok.

## Vybavenie a materiály

### Požadované, ale nedodávané vybavenie a materiály

#### Požadované vybavenie, ktoré sa nedodáva

Vybavenie	Dodávateľ
Sekvenčný systém novej generácie (NGS) s nasledujúcimi možnosťami: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sekvenovanie <math>2 \times 36</math> bp z oboch koncov</li> <li>• Kompatibilný s duálnymi indexovacími adaptérmi VeriSeq NIPT Sample Prep</li> <li>• Automatické generovanie súborov BCL</li> <li>• Dvojkanálová biochémia</li> <li>• 400 mil. čítaní z oboch koncov na jeden chod</li> <li>• Kompatibilný so softvérom VeriSeq NIPT Assay Software v2 alebo sekvenčným systémom NextSeq 550Dx.</li> </ul>	Dodávateľ prístroja alebo Illumina, číslo súčasti 20005715
Mraznička, $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Mikrocentrifúga	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Pipetovacia pomôcka	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Chladnička, $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $8\text{ }^{\circ}\text{C}$	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
20 $\mu\text{l}$ jednokanálové pipety	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá

Vybavenie	Dodávateľ
200 µl jednokanálové pipety	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
1000 µl jednokanálové pipety	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Vírivý mixér	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
<b>Zostava centrifúgy a rotora na skúmavky na odber krvi</b>	
Ekvivalent:	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
<ul style="list-style-type: none"> <li>Chladená centrifúga s rýchlosťou 1600 g bez brzdy</li> <li>Výkyvný rotor na vedierka s vedierkami</li> <li>Vložky do vedierok, kapacita na 24, 48 alebo 96 skúmaviek, minimálna hĺbka 76 mm</li> <li>Zásuvné adaptéry na 16 skúmaviek na odber krvi (100 mm)</li> </ul>	Beckman Coulter, položka č. 392304 (120 V alebo 230 V)
Odporúčané:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Centrifúga Allegra X12R, 1600 g</li> <li>Rotor Allegra Centrifuge GH-3.8 s vedierkami</li> <li>Kryty vedierok centrifúgy Allegra, súprava dvoch kusov</li> <li>Zostava adaptéra centrifúgy Allegra, 16 mm, súprava štyroch kusov</li> </ul>	Beckman Coulter, položka č. 369704 Beckman Coulter, položka č. 392805 Beckman Coulter, položka č. 359150
<b>Zostava centrifúgy a rotora na mikrodoštičky</b>	
Ekvivalent:	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
<ul style="list-style-type: none"> <li>Centrifúga s otáčkami 5600 g</li> <li>Výkyvný rotor s doštičkou s nosičmi na doštičky s 96 jamkami, min. hĺbka 76,5 mm.</li> <li>Multifuge X4 Pro-MD 120V TX-1000BT</li> <li>Centrifúga Sorvall Legend XTR</li> </ul>	Thermo Scientific, VWR, katalógové číslo 76326-254 Thermo Fisher Scientific, katalógové číslo 75004521 (120 V) alebo 75004520 (230 V)
<ul style="list-style-type: none"> <li>Rotor na mikrodoštičky HIGHPlate 6000</li> <li>Rotor typu High Plate 6000</li> </ul>	Thermo Fisher Scientific, katalógové číslo 75003606 Thermo Scientific, VWR, katalógové číslo 97040-244
Podporný podstavec na mikrodoštičky	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Odporúčané: <ul style="list-style-type: none"> <li>Podporný podstavec MicroAmp na 96 jamiek</li> <li>Nosič doštičky PCR, 96 jamiek</li> </ul> </li> </ul>	Thermo Fisher Scientific, katalógové číslo 4379590 Thermo Fisher Scientific, katalógové číslo AB-0563/1000

Vybavenie	Dodávateľ
Jedna z nasledujúcich čítačiek mikrodostičiek alebo ekvivalent, (fluorometer) so softvérom SoftMax Pro v6.2.2 alebo novšou verzou: <ul style="list-style-type: none"> <li>Gemini XPS</li> <li>SpectraMax M2, M3, M4 a M5. <ul style="list-style-type: none"> <li>Fialová vložka je súčasťou čítačky mikrodostičiek na použitie v rámci pracovného postupu.</li> </ul> </li> </ul>	Molecular Devices, číslo súčasti XPS Molecular Devices, čísla súčastí M2, M3, M4 a M5
SpectraMax s vysokorýchlostným rozhraním USB, sériový adaptér	Molecular Devices, číslo súčasti 9000-0938
Termálny cyklér s týmito parametrami: <ul style="list-style-type: none"> <li>Nahrievaný príklop</li> <li>Rozsah teplôt 4 °C až 98 °C</li> <li>Presnosť teploty ±2 °C</li> <li>Minimálna rýchlosť stúpania 2 °C/s</li> <li>Kompatibilné s PCR doštičkou s 96 jamkami a plnou obrubou Twin.tec</li> </ul>	Všeobecný dodávateľ pre laboratória
VeriSeq NIPT Microlab STAR	Hamilton, číslo súčasti 95475-01 (115 V), číslo súčasti 95475-02 (230 V) alebo číslo súčasti 806288 (pre Hamilton Company Bonaduz)
VeriSeq Onsite Server v2 alebo inovované zariadenie VeriSeq Onsite Server	Illumina, číslo súčasti 20028403 alebo 20047000 (v2), alebo č. súčasti 15076164 alebo 20016240 (inovovaná verzia)
Ak používate sekvenčný systém NextSeq 550Dx: <ul style="list-style-type: none"> <li>Súprava NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5, 75 cyklov</li> </ul>	Illumina, číslo súčasti 20028870

### Voliteľné vybavenie, ktoré sa nedodáva

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

**Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú**

Spotrebný materiál	Dodávateľ
1000 µl vodivé nesterilné filtračné špičky	Hamilton, číslo súčasti 235905
300 µl vodivé nesterilné filtračné špičky	Hamilton, číslo súčasti 235903
50 µl vodivé nesterilné filtračné špičky	Hamilton, číslo súčasti 235948
Zásobník s hlbokými jamkami s nasledujúcimi špecifikáciami: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mikrodoštička SLAS 1-2004 s 96 jamkami s pyramídovým alebo kónickým dnom a minimálnou kapacitou 240 ml.</li> <li>• Polypropylén s preferenčne nízkou úrovňou viazania DNA pre všetky kontaktné povrchy vzoriek.</li> <li>• Vnútorne rozmery (hladina kvapaliny) sú kompatibilné s krokmi automatizovanej aspirácie a dávkovania zariadenia VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Výškové rozmery sú kompatibilné s automatizovanými pohybmi zariadenia VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> </ul>	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá  Kompatibilné zásobníky: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Corning Axygen, číslo produktu RES-SW96-HP-SI</li> <li>• Agilent, číslo produktu 201246-100</li> </ul>
Skúmavka na reagenciu s nasledujúcimi parametrami: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vanička, ktorá sa zmestí (bez tlaku) do nosiča zariadenia VeriSeq NIPT Microlab STAR so skoseným dnom a minimálnou kapacitou 20 ml.</li> <li>• Polypropylén bez obsahu RNázy/DNázy.</li> <li>• Vnútorne rozmery zásobníka (hladina kvapaliny) generujú hladiny kvapaliny použitím objemov analytickej reagenty, ktoré sú kompatibilné s krokmi automatizovanej aspirácie a dávkovania zariadenia VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Výškové rozmery sú kompatibilné s automatizovanými pohybmi zariadenia VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> </ul>	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá  Kompatibilné skúmavky: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Roche, číslo produktu 03004058001</li> </ul>

Spotrebný materiál	Dodávateľ
<p>Doštičky s hlbokými jamkami s nasledujúcimi špecifikáciami:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mikrodoštičky SLAS 1-2004, 3-2004 a 4-2004 s 96 jamkami s pyramídovým alebo kónickým dnom a minimálnou kapacitou jamky 2 ml.</li> <li>• Priehľadný polypropylén s preferenčne nízkou úrovňou viazania DNA na všetkých kontaktných povrchoch vzoriek.</li> <li>• Rozmery jamky generujú hladinu kvapaliny kompatibilnú s krokmi automatizovanej aspirácie a dávkovania zariadenia VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Obruba doštičky, ktorá umožňuje aplikovať čiarové kódy doštičky na požadované miesto, s požadovanou úrovňou adhézie.</li> <li>• Rám odolný voči torzným silám s odolnosťou min. 5600 g.</li> <li>• Výškové rozmery doštičky sú kompatibilné s automatizovanými pohybmi zariadenia VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> </ul>	<p>Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá</p> <p>Kompatibilné doštičky:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Eppendorf, číslo súčasti 0030505301</li> <li>• Eppendorf, číslo súčasti 30502302</li> <li>• USA Scientific, číslo súčasti 1896-2000</li> </ul>
<p>Doštička s 384 jamkami s nasledujúcimi špecifikáciami:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mikrodoštička s 384 jamkami optimalizovaná na malé objemy s minimálnou kapacitou jamky 50 µl.</li> <li>• Čierny nepriehľadný polystyrén s blokováním svetla a nízkou úrovňou viazania DNA na všetkých kontaktných povrchoch vzoriek.</li> <li>• Rozmery jamky generujú hladiny kvapaliny kompatibilné s krokmi automatizovanej aspirácie a dávkovania zariadenia VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Výškové rozmery doštičky sú kompatibilné s automatizovanými pohybmi zariadenia VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Obruba doštičky, ktorá umožňuje aplikovať čiarové kódy doštičky na požadované miesto, s požadovanou úrovňou adhézie.</li> </ul>	<p>Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá</p> <p>Kompatibilné doštičky:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Corning, číslo produktu 3820</li> </ul>

Spotrebný materiál	Dodávateľ
Doštička s 96 jamkami s nasledujúcimi špecifikáciami: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mikrodoštička s rámom odolným voči torzným silám s odolnosťou min. 5600 g a 96 priehľadnými jamkami so šikmými dnami, zvýšenými obrubami a minimálnou kapacitou jamky 150 µl.</li> <li>• Polypropylén bez obsahu RNázy/DNázy s nízkou úrovňou viazania DNA na všetkých kontaktných povrchoch vzorky.</li> <li>• Rozmery jamky generujú hladiny kvapaliny kompatibilné s krokmi automatizovanej aspirácie a dávkovania zariadenia VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Výškové rozmery doštičky sú kompatibilné s automatizovanými pohybmi zariadenia VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Obruba doštičky, ktorá umožňuje aplikovať čiarové kódy doštičky na požadované miesto, s požadovanou úrovňou adhézie.</li> <li>• Kompatibilné s tepelnými cyklérmi na denaturáciu.</li> </ul>	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá  Kompatibilné doštičky: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Eppendorf, číslo súčasti 0030129512</li> <li>• Eppendorf, číslo súčasti 30129580</li> <li>• Eppendorf, číslo súčasti 30129598</li> <li>• Eppendorf, číslo súčasti 30129660</li> <li>• Eppendorf, číslo súčasti 30129679</li> <li>• Bio-Rad, číslo súčasti HSP9601</li> </ul>
Niektoré z nasledujúcich fóliových tesnení: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fólia Microseal F Foil</li> <li>• Fóliové tesnenia</li> </ul>	Bio-Rad, katalógové číslo MSF1001 Beckman Coulter, položka č. 538619
Bezbanková Cell-Free DNA BCT CE	Streck, katalógové číslo 218997
Prítlačné viečka	Sarstedt, objednávacie číslo 65.802
2 ml skúmavky so skrutkovým uzáverom	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
20 µl filtračné špičky pre 20 µl pipetor	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
200 µl filtračné špičky pre 200 µl pipetor	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
1000 µl filtračné špičky pre 1000 µl pipetor	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Ekvivalent: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sprej na rýchlu dezinfekciu s obsahom alkoholu</li> <li>• Roztok na prípravu dezinfekčného prostriedku</li> </ul> Odporúčané: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Deionizovaná voda a 70 % etanol</li> </ul>	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá

## Voliteľné materiály, ktoré sa nedodávajú

Spotrebný materiál	Dodávateľ
Dulbeccov fosfátom pufrovaný fyziologický roztok (DPBS) pre kontrolu bez šablóny (NTC)	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá

Spotrebný materiál	Dodávateľ
Skúmavka, skrutkové viečko, 10 ml (iba na kontrolné vzorky)	Sarstedt, objednávacie číslo 60.551
Skúmavka, skrutkové viečko, 50 ml	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
25 ml sérologické pipety	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
10 ml sérologické pipety	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá

## Odber, preprava a skladovanie vzoriek



### UPOZORNENIE

So všetkými vzorkami zaobchádzajte ako s potenciálne infekčným materiálom.

- Vzorky plnej krvi v objeme 7 – 10 ml sa musia odobrať do skúmavky Streck na odber krvi na analýzu mimobunkovej DNA.
- Preprava plnej krvi musí spĺňať všetky platné predpisy na prepravu etiologických agens. Odporúčajú sa rýchle spôsoby zaslania/prepravy.
- Počas prepravy vzorky skladujte pri teplote 4 °C až 30 °C. Prijaté vzorky pred ďalším spracovaním skladujte pri teplote 2 °C až 8 °C. Medzi odberom krvi a počiatočnou izoláciou plazmy nesmie uplynúť viac ako 5 dní.
- V prípade potreby opakovaného testovania môžu byť vzorky po spracovaní opätovne uzatvorené a skladované pri teplote 4 °C počas ďalších 5 dní (celkom 10 dní po odbere krvi).



### UPOZORNENIE

Prekročenie uvedených časov skladovania môže negatívne ovplyvniť mieru zlyhania jednotlivých vzoriek.

## Varovania a preventívne opatrenia

- Tento test obsahuje proteínázu K. K osobným zraneniam môže dôjsť v dôsledku vdýchnutia, požitia, kontaktu s pokožkou a kontaktu s očami. Používajte v dobre vetraných priestoroch, chráňte sa ochranným odevom, vyhýbajte sa vdychovaniu prachu a všetky nádoby a ich nespotrebovaný obsah zlikvidujte v súlade s platnými štátnymi bezpečnostnými normami.
- Tento test obsahuje guanidínium-chlorid. K osobným zraneniam môže dôjsť v dôsledku vdýchnutia, požitia, kontaktu s pokožkou a kontaktu s očami. Používajte v dobre vetraných priestoroch, chráňte sa ochranným odevom a všetky nádoby a ich nespotrebovaný obsah zlikvidujte v súlade s platnými štátnymi bezpečnostnými normami.



- Tento test obsahuje horľavú chemikáliu 2-propanol. Chráňte ho pred teplom a otvoreným ohňom. K osobným zraneniam môže dôjsť v dôsledku vdýchnutia, požitia, kontaktu s pokožkou a kontaktu s očami. Používajte v dobre vetraných priestoroch, chráňte sa ochranným odevom a všetky nádoby a ich nespotrebovaný obsah zlikvidujte v súlade s platnými štátnymi bezpečnostnými normami.
- Tento test obsahuje žieravú a horľavú kvapalinu dimetylsulfoxid. K osobným zraneniam môže dôjsť v dôsledku vdýchnutia, požitia, kontaktu s pokožkou a kontaktu s očami. Používajte v dobre vetraných priestoroch, chráňte sa ochranným odevom a všetky nádoby a ich nespotrebovaný obsah zlikvidujte v súlade s platnými štátnymi bezpečnostnými normami.
- Aby ste zabránili tvorbe škodlivých plynov, nelikvidujte odpad z extrakcie cfDNA (obsahuje guanidínium-chlorid) spolu s odpadom obsahujúcim bieliace látky (chlórnan sodný).
- So všetkými vzorkami zaobchádzajte, ako keby obsahovali potenciálne infekčný materiál.
- Použite bežné laboratórne bezpečnostné opatrenia. Pipetovanie nevykonávajte ústami. Nejedzte, nepite ani nefajčite v oblastiach určených na prácu. Pri manipulácii so vzorkami a reagensiami testu noste jednorazové rukavice a laboratórny plášť. Po manipulácii so vzorkami a reagensiami testu si dôkladne umyte ruky.
- Nepoužívajte žiadne súčasti testu po uplynutí dátumu ich expirácie uvedeného na štítku na balení testu. Nenahrádzajte súčasti testu súčasťami z iných šarží testu. Šarže testu sú označené na štítku na balení testu. Súčasti testu uchovávajte pri stanovenej teplote.
- Aby ste zabránili znehodnoteniu vzorky alebo reagentie, pred začatím protokolu sa uistite, že všetky výpary chlórnanu sodného po čistení sa celkom rozptýlili.
- Nedodržovanie uvádzaných postupov môže viesť k chybným výsledkom alebo významnému zníženiu kvality vzoriek.
- Ihneď nahláste akékoľvek závažné udalosti spojené s týmto výrobkom spoločnosti Illumina a príslušným úradom v členskom štáte, v ktorom sa nachádzajú používateľ aj pacient.
- Informácie o ochrane životného prostredia, zdravia a bezpečnosti nájdete na kartách bezpečnostných údajov (SDS) na stránke [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html).

## Poznámky týkajúce sa postupov

### Vyhnutie sa kontaminácii

- Používajte nové špičky a nový laboratórny spotrebný materiál.
- Používajte špičky odolné voči aerosólu na zníženie rizika prenosu a krížovej kontaminácii vzoriek.
- V dôsledku existujúceho potenciálu kontaminácie mimoriadne dbajte na to, aby celý obsah jamiek ostal v jamkách. Dávajte pozor, aby sa obsah nerozliat/nerozstrekol. Po každom kroku miešania v mixéri vykonajte odstred'ovanie.

- Keď manipulujete s krvou a krvnými derivátmi, dodržiavajte príslušné nariadenia týkajúce sa osvedčených laboratórných postupov a hygieny.
- Počas prípravy knižnice nepoužívajte aerosólové bieliace spreje. Stopová kontaminácia bieliadlom môže viesť k zlyhaniu analýzy.
- Keď odstraňujete tesnenie z akejkoľvek doštičky, položte ju na rovný a plochý povrch, a pevne ju držte. Pomaly odstraňujte utesnenie a dbajte na to, aby nedošlo ku kontaktu tesnenia s odhalenými jamkami. Nedotýkajte sa odhalených jamiek ani ich obsahu. Krížová kontaminácia jamiek môže viesť k nesprávnym výsledkom.

## Čistenie plošiny zariadenia VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Pred začatím používania skontrolujte čistotu plošiny. Najmenej raz týždenne vykonajte týždennú údržbu a postupujte podľa nasledujúcich pokynov na čistenie.
- Odpojte všetky nosiče, ktoré nie je možné vytiahnuť, vyčistite ich alkoholovým dezinfekčným sprejom, deionizovanou vodou, 70 % roztokom etanolu a nechajte ich vyschnúť. Ak sú výrazne znečistené, následne ich namočte do roztoku dezinfekčného detergentu, opláchnite alkoholovým dezinfekčným prostriedkom a ponechajte vyschnúť.
- Otvorte predný kryt a utrite plošinu handričkou navlhčenou v deionizovanej vode a 70 % etanole. Pri kontrole čistoty je špeciálne potrebné zamerať sa na klzné bloky.
- Odpojte potrubie základného vákuového systému (BVS) a handričkou vyčistite potrubie, tesnenie a vnútorné súčasti systému BVS. Nečistite tesnenie etanolom, v opačnom prípade hrozí riziko poškodenia materiálu.
- Vyprázdňte odpadové špičky hlavy CORE 96 a nezávislého kanála.
- Odpojte výtlačnú doštičku špičiek nezávislého kanála stanice s odpadovými špičkami a vyčistite ju: priamo na povrch nastriekajte deionizovanú vodu a 70 % etanol a vykonajte čistenie. Natiahnite nový plastový vak nad rám a znova ho pripojte. Nainštalujte čistú výtlačnú doštičku špičiek naspäť na miesto.
- Nastriekajte deionizovanú vodu a 70 % etanol priamo na povrch odpadového boxu a žľabu jednotky CORE 96 a vykonajte čistenie.
  - Ak je odstránenie nánosov z odpadových špičiek problematické, utierajte ich handričkou navlhčenou vodou bez obsahu DNázy/RNázy dovedy, kým nános neodstránite. Handričku vhodným spôsobom zlikvidujte. Pokračujte sterilizáciou pomocou alkoholového dezinfekčného prípravku.
- Navlhčite handričku nezanechávajúcu vlákna alebo bavlnený tampón 70 % etanolom. Tampónom utrite okienko laserového skenera čítačky čiarových kódov. Pomocou rovnakého tampóna alebo handričky vyčistite každú jamku adaptéra doštičky CPAC. Ak používate handričku, zatlačte ju do každej jamky adaptéra (použite opačnú stranu pera), aby ste vnútro jamky riadne vyčistili.

- Vyčistíte nezávislé kanály:
  - Na nezávislých kanáloch vyčistíte manžetu vysunutia špičky (vonkajšia časť pipetovacích kanálov) handričkou nezanechávajúcou vlákna navlhčenou deionizovanou vodou a 70 % etanolom. (Prečítajte si referenčnú príručku k zariadeniu Hamilton Microlab STAR, č. 15070074.)
  - Vyčistíte koncový disk a krúžky pipetovacej hlavy (vonkajšia časť pipetovacích kanálov) handričkou nezanechávajúcou vlákna navlhčenou deionizovanou vodou a 70 % etanolom.
- Vyčistíte zariadenie CORE s 96 hlavami:
  - Použitím rovnakej handričky nezanechávajúcej vlákna navlhčenej v deionizovanej vode a 70 % etanole vyčistíte plášť zariadenia s 96 hlavami a spodnú časť koncových diskov.
  - Použitím rovnakej handričky alebo kúska inej handričky navlhčenej v deionizovanej vode a 70 % roztoku etanolu jemne pretrite bočné časti okolo pipetovacích kanálov zariadenia s 96 hlavami na vyčistenie krúžkov. Tento postup opakujte pre každý pipetovací kanál zariadenia s 96 hlavami.
- Na predný a zadný kryt nastriekajte deionizovanú vodu a 70 % etanol a kryty utrite dosucha.
- Vyčistíte ochrannú pásku automatického vkladania handričkou navlhčenou deionizovanou vodou a 70 % etanolom a povrch utrite bez vynakladania tlaku.
- Keď budú plošina a komponenty úplne suché, nainštalujte nosiče.

**POZNÁMKA** Nesprávne čistenie a údržba zariadenia ML STAR môžu viesť ku krížovej kontaminácii a k nedostatočnej kvalite analýzy.

## Kontrola kvality

Vyhodnotením kontrolného materiálu so známymi výkonnosťnými charakteristikami možno zistiť rozdiely v spracovaní a technických postupoch v laboratóriu.

Spracovanie kontrolnej vzorky alebo kontrola bez šablóny znižuje celkový počet neznámych vzoriek od matky, ktoré možno spracovať s jednotlivými súpravami na prípravu vzoriek.

Neprekračujte limit dvoch vzoriek NTC na dávku 24/48 vzoriek alebo štyroch vzoriek NTC na dávku 96 vzoriek.

## Návod na použitie

### Tipy a techniky

Ak nie je v protokole špecifikovaný bod bezpečného zastavenia, ihneď prejdite na ďalší krok.

#### Označovanie doštičiek čiarovými kódmi

- Čiarové kódy doštičiek s plnou obrubou začínajú skratkou PL.
- Čiarové kódy doštičiek s hlbokými jamkami začínajú skratkou DW.

- Nalepte čiarové kódy na doštičky s plnou obrubou a doštičky s hlbokými jamkami na bočnú stranu pri stĺpci 12.
- Doštičky vkladajte čiarovým kódom smerujúcim doprava, aby sa umožnilo automatické skenovanie.

### Zaplombovanie a odplombovanie doštičky

- Postupujte mimoriadne opatrne, aby nedošlo ku krížovej kontaminácii – na spodnej strane plomby nesmie byť viditeľná žiadna kvapalina.
  - Zabezpečte, aby sa odkrytá spodná strana plomby nedotýkala odkrytých jamôk.
  - Dbajte na to, aby ste sa nedotýkali odkrytých jamôk.
- Doštičku s 96 jamkami vždy zaplombujte pred vykonaním nasledujúcich krokov protokolu:
  - Odstredenie v centrifúge
  - Termálne cykly
- Pri plombovaní doštičky priložte na doštičku tesniacu fóliu a potom vykonajte zaplombovanie. Dbajte na to, aby ste pritlačili na celú doštičku a aby bola každá jamka dobre utesená.
- Pred odplombovaním doštičky vykonajte tieto kroky:
  - Doštičku s 96 jamkami krátko odstredujte v centrifúge 20 sekúnd pri 1000 × g.
  - Položte doštičku na rovný povrch a potom plombu pomaly odstráňte.

### VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Pred použitím vykonajte a zdokumentujte požadovanú údržbu v súlade s pokynmi výrobcu.
- Sledujte systém ML STAR počas automatizovaných krokov. Sledujte výzvy a pokyny na obsluhu v používateľskom rozhraní softvéru VeriSeq NIPT Workflow Manager v2.
- Počas prevádzky ponechajte predný kryt na mieste.
- Počas prevádzky nesmú byť na plošine žiadne predmety.
- Ak sa v priebehu spracovania chyby zobrazí tlačidlo **Exclude** (Vylúčiť), v žiadnom prípade túto možnosť nevyberajte. Ak nie je možné spustiť metódu pred spracovaním chyby alebo sú obmedzené možnosti spracovania chyby, chod prerušte.
- Ak vás počas vákuovania doštičky systém VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 vyzve, manuálne pomôžte pri vytváraní tesnenia medzi doštičkou a vákuovým manifoldom.
- Nechajte systém automaticky vysunúť špičky z adaptéra. Nevyberajte špičky ručne, ak vás na to softvér nevyzve.
- Na pokyn aplikácie Workflow Manager odstráňte spotrebované reagenty a použitý spotrebný materiál.
- Denne vyprázdňujte nádoby na odpad z vákuovania. Prvá nádoba nesmie byť nikdy zaplnená viac než spolovice. Pretečenie odpadu z vákuovania môže poškodiť vákuovaciu pumpu a znížiť podtlak použitý v systéme.
- Pred spustením metódy pre dávky s 24, 48 a 96 vzorkami vložte plný zásobník jednotlivo spočítaných 8-kanálových špičiek.

## Spracovanie vzoriek

### Postup

1. Vykonaňte nasledujúce kroky pre každú alikvotnú časť:
  - a. Odstred'ujte vzorky označené čiarovým kódom 10 minút pri 1600 × g a teplote 4 °C s odistenou brzdou.
  - b. Keď sa centrifúga celkom zastaví, vyberte skúmavky so vzorkami.Do 15 minút po odstredení začnite s izoláciou plazmy. Ak uplynie viac ako 15 minút, odstred'ovanie zopakujte.
2. Pri každej skúmavke skontrolujte vhodnosť vzorky overením týchto požiadaviek:
  - Objem vzorky zodpovedá očakávaniu.
  - Po odstredení je vo vzorkách jasne viditeľné oddelenie vrstvy červených krviniek a plazmy.
  - Úroveň plazmy je aspoň 1,5 ml nad leukocytovo-trombocytovou vrstvou (tzv. buffy coat).
  - Vzorka nie je výrazne hemolyzovaná (t. j. plazma nemá tmavú červenú farbu).
  - Vzorka nie je lipemická (t. j. plazma nemá zakalený ani mliečny nepriehľadný vzhľad).
  - Vo vzorke nie sú zrazeniny.



#### UPOZORNENIE

Vzorky, ktoré boli nesprávne skladované alebo sa s nimi nesprávne manipulovalo, môžu byť nevhodné. Ak sa v rámci pracovného postupu spracujú nevhodné vzorky, môžu pri extrakciách upchať väzbovú doštičku, čo môže viesť k pretečeniu vzoriek do susedných jamôk.

3. Odstráňte uzávery zo skúmaviek a skúmavky vložte do držiakov. Vložte všetky vzorky a prípadné kontroly plazmy danej dávky.



#### UPOZORNENIE

Ak sa v priebehu spracovania chýb zobrazí možnosť Exclude (Vylúčiť), nevyberajte ju. Ak po spracovaní chýb metóda nemôže pokračovať a sú dostupné obmedzené možnosti spracovania chýb, chod prerušte.

## Izolácia plazmy

### Príprava

1. Označte štítkom 1 doštičku s hlbokými jamkami na dočasnú plazmu a aplikujte čiarový kód.
2. Označte štítkom 1 doštičku s hlbokými jamkami na finálnu plazmu a aplikujte čiarový kód.
3. V prípade dávok s 24, 48 a 96 vzorkami vložte plný stojan individuálne spočítaných 8-kanálových špičiek pred samotným spustením metódy.

**UPOZORNENIE**

Dbajte na to, aby ste použili správny typ doštičky v prípade dočasnej plazmy a finálnej plazmy. Použitie zásobníka s hlbokými jamkami namiesto doštičky s hlbokými jamkami vedie k amalgamácií vzoriek a môže viesť k nesprávnym výsledkom.

**Postup**

1. Otvorte nástroj AppLauncher a vyberte položku **VeriSeq NIPT Method** (Metóda VeriSeq NIPT).
2. Zadajte jedinečné ID dávky a meno používateľa a vyberte možnosť **OK**.  
ID dávky môže obsahovať ≤ 26 znakov. Použiť je možné výlučne číslice, písmená, znaky podčiarknutia ( \_ ) alebo pomlčky ( - ). Napríklad: 2025-10-16\_Davka3.  
ID dávky nerozlišuje veľké a malé písmená. ID dávky s rozlíšením veľkých a malých písmen sa nepovažujú za jedinečné.  
Názvy dávok musia byť jedinečné a nesmú sa odlišovať iba v použití veľkých a malých písmen. Napríklad názvy dávok Dávka01 a dávka01 nie sú jedinečné. Rovnaké pravidlá platia aj pre pomenovanie ID vzorky.
3. Vyberte položku **New Batch** (Nová dávka).
4. Po inicializácii výberom možnosti **OK** spustíte izoláciu plazmy.
5. Vykonajte niektorý z nasledujúcich krokov:
  - Ak chcete načítať existujúci hárok údajov na analýzu, vyberte hárok údajov na analýzu priradený k dávke a potom vyberte položku **OK**.
  - Ak chcete pokračovať bez výberu hárka so vzorkou, vyberte položku **No Sample Sheet** (Žiadny hárok údajov na analýzu).

Informácie o vytváraní hárka údajov na analýzu nájdete v *softvérovej príručke k systému VeriSeq NIPT Solution v2* (č. dokumentu 1000000067940).

**POZNÁMKA** Typ vzorky (tehotenstvo s jedným plodom alebo tehotenstvo s dvoma plodmi) musí byť pre každú vzorku správne zaznamenané, aby bolo možné vykonať správnu analýzu údajov. Ak vyberiete možnosť **No Sample Sheet** (Žiadny hárok údajov na analýzu), dbajte na to, aby ste v časti Workflow Manager Service Tools (Nástroje služby Workflow Manager ) nastavili predvolené vzorové hodnoty. Ďalšie informácie nájdete v *softvérovej príručke k systému VeriSeq NIPT Solution v2* (č. dokumentu 1000000067940).

6. Vyberte veľkosť dávky a potom vyberte možnosť **OK**.
7. Vyberte počet kontrol bez šablóny (NTC) a potom vyberte možnosť **OK**.  
Úseky NTC sú vždy poslednými vybratými úsekmi. Napríklad v prípade dvoch kontrol NTC v chode s 24 vzorkami majú kontroly NTC pozície 23 a 24.

8. Overte, či sú pripojené všetky čiarové kódy a potom vložte vzorky, špičky a doštičky (s čiarovým kódom smerujúcim nahor) do nosiča.
9. Po každej výzve na vloženie vyberte možnosť **OK**.

Veľkosť dávky vzoriek	Nosič Typ	Dráha	Položka	Umiestnenie
24, 48, 96	Špička	7 – 12	1000 µl špičky	5
			1000 µl špičky (iba dávka s počtom 96)	4, 5
	Skúmavka	15	Pripravené skúmavky s krvnými vzorkami 1 – 24 (platí pre všetky veľkosti dávok)	1 – 24
	Skúmavka	16	Pripravené skúmavky s krvnými vzorkami 25 – 48 (platí iba pre veľkosť dávky 48 a 96)	25 – 48
	Skúmavka	17	Pripravené skúmavky s krvnými vzorkami 49 – 72 (platí iba pre veľkosť dávky 96)	49 – 72
	Skúmavka	18	Pripravené skúmavky s krvnými vzorkami 73 – 96 (platí iba pre veľkosť dávky 96)	73 – 96
	Multiflex	19 – 24	Prázdna doštička s hlbokými jamkami, finálna plazma (označená čiarovým kódom)	4
	Multiflex	19 – 24	Prázdna doštička s hlbokými jamkami, dočasná plazma (označená čiarovým kódom)	5
	Reagencia	47	<b>[Voliteľné]</b> Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (Dulbeccov fosfátom puľrovaný fyziologický roztok, DPBS) – používa sa v prípade kontroly bez šablóny (NTC)	5

10. Overte správnosť vloženia nosičov, laboratórneho vybavenia a reagensí.
11. Na obrazovke Pre-Spin Deck Verification (Overenie plošiny pred vírením) vyberte položku **OK**.
12. Overte, či prístroj ML STAR vykonáva automatizované kroky.
13. Po zobrazení výzvy aplikáciou Workflow Manager overte, či sa na nosnej plošine prístroja ML STAR nenachádzajú žiadne prekážky, aby mohol prístroj ML STAR vyložiť nosiče.
14. Na vyloženie plošiny vyberte položku **Unload** (Vyložiť).
15. Podľa nasledujúcich pokynov vyberte doštičku s hlbokými jamkami na dočasnú plazmu.
  - a. Skontrolujte doštičku z hľadiska konzistencie objemov v každom jamke (žiadne chyby pipetovania). Predpokladaný objem je 1000 µl.
  - b. Po dokončení procedúry izolácie plazmy zaznamenajte všetky nezrovnalosti.
  - c. Utesnite doštičku, vložte ju tak, aby bola vyvážená, a odstreďujte rýchlosťou 5600 g 10 minút (brzda je deaktivovaná alebo vyberiete najnižšiu hodnotu nastavenia).

16. Výberom možnosti **Yes** (Áno) pokračujte prípravou finálnej plazmy.

17. Odstráňte utesnenie doštičky a vložte doštičku na nosič.

Veľkosť dávky vzoriek	Nosič Typ	Dráha	Položka	Umiestnenie
24, 48, 96	Multiflex	19 – 24	Doštička s hlbokými jamkami na dočasnú plazmu	5

18. Začiarknite políčko **Intermediate Plasma plate has been spun** (Dočasná plazma bola odstredená) a potom vyberte položku **OK**.

19. Overte, či prístroj ML STAR vykonáva automatizované kroky.

20. Keď vás na to vyzve aplikácia Workflow Manager, ubezpečte sa, že na nosnej plošine systému ML STAR nie sú žiadne prekážky, aby bolo možné vyložiť nosiče.

21. Na vyloženie plošiny vyberte položku **Unload** (Vyložiť).

22. Po zobrazení výzvy aplikáciou Workflow Manager vyprázdňte nosiče a plošinu.

23. Vyberte doštičku s hlbokými jamkami na finálnu plazmu.

24. Skontrolujte prípadný výskyt chýb týkajúci sa doštičky:

- Nekonzistentné objemy v každej jamke. Predpokladaný objem je 900 µl.
- Viditeľné bunkové pelety.
- Nadmerná hemolýza.

Ak spozorujete abnormálne viditeľné bunkové pelety alebo nadmernú hemolýzu, zrušte platnosť ovplyvnenej vzorky na konci metódy izolácie plazmy alebo použite aplikáciu Batch Manager. Ďalšie informácie o aplikácii Batch Manager si prečítajte v *softvérovej príručke k systému VeriSeq NIPT Solution v2* (č. dokumentu 1000000067940).

25. Po zobrazení výzvy aplikáciou Workflow Manager vyberte položku **OK**.

26. Zadaťte komentáre o dotknutých jamkách a potom vyberte položku **OK**.

27. Vykonajte niektorý z nasledujúcich krokov.

- Ak chcete pokračovať extrakciou cfDNA, vyberte položku **Yes** (Áno).
- Ak chcete postup prerušiť, vyberte možnosť **Exit** (Skončiť).

## BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Ak postup prerušujete, doštičku s konečnou plazmou zaplombujte a skladujte pri teplote 2 °C až 8 °C maximálne 7 dní.

## Extrakcia cfDNA

### Príprava

1. Vizuálne skontrolujte škatule na extrakciu a príslušenstvo a overte, či neuplynul dátum expirácie súpravy.



2. Pripravte si nasledujúce reagenty. Označte skúmavky zásobníkov a zásobníky s hlbokými jamkami názvami reagentov.

Reagentia	Skladovanie	Pokyny
Doštička s hlbokými jamkami, finálna plazma	2 °C až 8 °C	V prípade predchádzajúceho skladovania nechajte 30 minút odstáť, aby sa dosiahla izbová teplota. Odstred'ujte rýchlosťou 1 000 × g 20 sekúnd. Pred použitím otvorte doštičku s hlbokými jamkami so finálnou plazmou.

3. Pomaly pridajte 3,75 ml proteinázového pufru do každej reagenčnej liekovky s proteinázou K.

- Pripravte si 3 liekovky na 24 a 48 vzoriek.
- Pripravte si 4 liekovky na 96 vzoriek.

4. Uzavrite liekovky s proteinázou K a miešajte ich obsah v mixéri až do resuspendácie.



#### UPOZORNENIE

Snažte sa nekontaminovať gumovú zarážku. Ak sa na gumovú zarážku dostanú iné látky, hrozí riziko kontaminácie budúcich vzoriek.

5. Nalejte pripravenú proteinázu K zo všetkých liekoviek do reagenčnej skúmavky a označte ju ako „Proteináza K“.
6. Pridajte 100 ml 100 % EtOH do každej reagenčnej fľaše s obsahom premývacieho pufru II.
- Pripravte si 1 fľašu na 24 a 48 vzoriek.
  - Pripravte si 2 fľaše na 96 vzoriek.
7. Preklápaním fliaš s premývacím roztokom II premiešajte ich obsah.
8. Začiarknite políčka na fľašiach s premývacím roztokom II.
9. Označte 1 novú doštičku s úplnou obrubou štítkom Intermediate (Dočasná) a aplikujte čiarový kód doštičky.
10. Označte 1 novú doštičku s úplnou obrubou štítkom cfDNA Elution (Elúcia cfDNA) a aplikujte čiarový kód doštičky.
11. Označte 1 novú doštičku s hlbokými jamkami štítkom Extraction Intermediate (Dočasná extrakcia) a aplikujte čiarový kód doštičky s hlbokými jamkami.
12. Na doštičku viažucu DNA aplikujte čiarový kód doštičky.
13. V prípade kúpeľov s 24 a 48 vzorkami utesnite fóliou nepoužívané jamky.
14. Pripravte si 70 % roztok EtOH (70 % EtOH, 30 % voda bez obsahu DNázy/RNázy) na čistenie vákuového systému.

15. Vákuový systém pripravte podľa nasledujúcich pokynov.
  - a. Odpojte vákuové potrubie a vyčistite ho 70 % roztokom EtOH.  
Nečistite tesnenie EtOH – v opačnom prípade hrozí riziko poškodenia materiálu.
  - b. Vyprázdnite odpad z vákuového systému.
  - c. Overtete, či je vákuový systém ML STAR zapnutý.

## Postup

1. Na spustenie extrakcie cfDNA vyberte možnosť **OK**.
2. Ak nie je otvorená aplikácia **VeriSeq NIPT Method**:
  - a. Otvorte nástroj AppLauncher a vyberte položku **VeriSeq NIPT Method** (Metóda VeriSeq NIPT).
  - b. Zadaťte ID dávky a meno používateľa a vyberte možnosť **OK**.
3. Podľa nasledujúceho návodu vložte špičky do nosiča na špičky a vyberte možnosť **OK**.



### UPOZORNENIE

Než spustíte metódu pre dávky s 24, 48 a 96 vzorkami pridajte plný stojan 8-kanálových špičiek.

Veľkosť dávky vzoriek	Nosič Typ	Dráha	Položka	Umiestnenie
24	Špička	1 – 6	1000 µl špičky	1
		7 – 12	300 µl špičky	1
48	Špička	1 – 6	1000 µl špičky	1, 2
		7 – 12	300 µl špičky	1
96	Špička	1 – 6	1000 µl špičky	1, 2, 3, 4
		7 – 12	300 µl špičky	1

4. Podľa nasledujúceho návodu vložte spočítané špičky do nosičov na špičky.

Veľkosť dávky vzoriek	Nosič Typ	Dráha	Položka	Umiestnenie
24, 48, 96	Špička	49 – 54	1000 µl špičky	1
			300 µl špičky	2
			50 µl špičky	3

5. Zadaťte umiestnenie prvej a poslednej špičky pre každý stojan so špičkami a potom vyberte možnosť **OK**.

6. Naskenujte čiarové kódy škatule na extrakciu.
7. Zadaťte meno používateľa alebo iniciály osoby, ktorá pripravovala reagencie, a potom vyberte možnosť **OK**.
8. Naskenujte čiarové kódy škatule s príslušenstvom.
9. Zadaťte meno používateľa alebo iniciály osoby, ktorá pripravovala reagencie, a potom vyberte možnosť **OK**.
10. Overte upevnenie čiarových kódov.
11. Podľa potreby odstráňte tesnenie doštičky s hlbokými jamkami s finálnou plazmou.
12. Podľa nasledujúceho návodu vložte doštičky (čiarovými kódmi smerujúcimi doprava) do nosiča doštičiek a vyberte možnosť **OK**.

Veľkosť dávky vzoriek	Nosič Typ	Dráha	Položka	Umiestnenie
24, 48, 96	Multiflex	19 – 24	Nová doštička s plnou obrubou, dočasná, označená čiarovým kódom	1
			Nová doštička s plnou obrubou, elúcia fcDNA, označená čiarovým kódom	2
			Nová doštička s hlbokými jamkami, dočasná extrakcia, označená čiarovým kódom	4
			Doštička s hlbokými jamkami, finálna plazma, označená čiarovým kódom	5

13. Overte, či je doštička viažuca DNA označená čiarovým kódom a vyberte možnosť **OK**.
14. V prípade čiastkových dávok na doštičke aplikujte upravené tesnenie na nepoužívané jamky (stĺpce 4 – 12 v prípade dávok s 24 vzorkami a stĺpce 7 – 12 v prípade dávok so 48 vzorkami).
15. Vložte doštičku viažucu DNA do vákuového manifoldu s čiarovým kódom smerujúcim doprava.
16. Než vložíte viažucu doštičku do manifoldu BVS, skontrolujte, či jamky nie sú upchané/zablokované. To by mohlo narušiť tok reagencií v prostredí vákua.
17. Ak používate dávky s 24 alebo 48 vzorkami, zakryte nepoužívané jamky a utesnite ich fóliou. Začiarknite políčko **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (Sú stĺpce doštičky viažucej DNA utesnené?) a potom vyberte možnosť **OK**.
18. Vložte skúmavky na reagencie do nosiča reagencií podľa nasledujúceho postupu a potom vyberte možnosť **OK**.

Veľkosť dávky vzoriek	Nosič Typ	Dráha	Položka	Umiestnenie
24, 48	Reagencia	47	16 ml elučný pufer (Elution Buffer)	1
			11 ml proteínáza K (Proteinase K)	2
96	Reagencia	47	16 ml elučný pufer (Elution Buffer)	1
			15 ml proteínáza K (Proteinase K)	2

19. Podľa nasledujúceho návodu preneste stanovené reagensie do zásobníkov s hlbokými jamkami.

20. Vyberte možnosť **OK**.

Veľkosť dávky vzoriek	Nosič Typ	Dráha	Položka	Umiestnenie
24, 48	Hlboké jamky	39 – 44	125 ml premývací roztok II (Wash Buffer II)	1
			125 ml premývací roztok I (Wash Buffer I)	2
			60 ml 100 % EtOH	3
			100 ml lyzačný pufer (Lysis Buffer)	4
			60 ml vody bez obsahu DNázy/RNázy	5
96	Hlboké jamky	39 – 44	200 ml premývací roztok II (Wash Buffer II)	1
			125 ml premývací roztok I (Wash Buffer I)	2
			100 ml 100 % EtOH	3
			100 ml lyzačný pufer (Lysis Buffer)	4
			100 ml vody bez obsahu DNázy/RNázy	5

21. Počkajte na dokončenie automatizovanej kontroly objemu reagensie.

22. Overte, či je vákuová odpadová fľaša prázdna (odporúča sa naplnenie do polovice) a vyberte možnosť **OK**.

23. Overte umiestnenie všetkých nosičov, laboratórneho vybavenia a reagensí a na obrazovke Extraction Deck Verification (Overenie extrakčnej plošiny) vyberte možnosť **OK**.

24. Prístroj ML STAR počas automatizovaných krokov sledujte.



Je nevyhnutné, aby ste platnosť pretečení vzoriek, ktoré systém nedokázal detegovať, manuálne zrušili predtým, než dôjde ku kontaminácii okolitých jamiek.

25. Po dokončení kroku záverečného vákua vytiahnite doštičku viažucu DNA a vyčistite spodný povrch 70 % roztokom EtOH.

26. Utesnite všetky nezakryté jamky na doštičke viažucej DNA a vložte doštičku viažucu DNA do prázdnej doštičky s hlbokými jamkami a finálnou plazmou.

27. Odstredujte zostavu doštičky viažucej DNA/doštičky s finálnou plazmou rýchlosťou 5600 g 10 minút s aktivovanou brzdou.

28. Vyberte možnosť **OK**.
29. Počas odstreďovania doštičky viažucej DNA dokončíte čistenie vákuového systému:
  - a. Odpojte vákuové potrubie a vyberte možnosť **OK**.
  - b. Počkajte na dokončenie automatickej likvidácie odpadu.
  - c. Vyčistite vákuový manifold a vnútro vákuového systému 70 % roztokom EtOH, a potom nainštalujte vákuový manifold.
  - d. Začiarknutím políčka **Manifold is on Vacuum** (V manifolde je podtlak) spustíte prenos elučnej doštičky vo vákuovom manifolde. Potom vyberte možnosť **OK**.
30. Po dokončení odstreďovania otvorte jamky obsahujúce vzorky na doštičke viažucej DNA.
31. Umiestnite doštičku viažucu DNA na doštičku na elúciu cfDNA, ktorá sa nachádza na vákuovom manifolde.
32. Vložte doštičku viažucu DNA s čiarovým kódom smerujúcim doprava a vyberte možnosť **OK**.
33. Prístroj ML STAR počas automatizovaných krokov sledujte.
34. Po dokončení kroku inkubácie začiarknite políčko **Plates are assembled as indicated** (Doštičky sú zostavené podľa indikácie). Overte, či sa zostava doštičky viažucej DNA/doštičky na elúciu cfDNA nachádza na fixačnom podstavci (ak to centrifúga vyžaduje).
35. Utesnite nezakryté jamky doštičky viažucej DNA.
36. Odstreďujte rýchlosťou 5600 g 2 minúty s aktivovanou brzdou a potom vyberte možnosť **OK**.
37. Vizuálne skontrolujte doštičku na elúciu cfDNA z hľadiska konzistentných objemov v každej jamke. Predpokladaný objem je približne 55 µl.
38. Utesnite a odložte doštičku na elúciu cfDNA na účely prípravy knižnice.
39. Po zobrazení výzvy aplikácie Workflow Manager overte, či sa na nosnej plošine prístroja ML STAR nenachádzajú žiadne prekážky, aby mohlo zariadenie ML STAR vyložiť nosiče.
40. Na vyloženie plošiny vyberte položku **Unload** (Vyložiť).
41. Vyložte všetky nosiče a vyčistite plošinu prístroja ML STAR, a potom vyberte možnosť **OK**.
42. Zadaťte komentáre o dotknutých jamkách a potom vyberte položku **OK**.
43. Vykonajte niektorý z nasledujúcich krokov:
  - Ak chcete pokračovať prípravou knižníc, vyberte možnosť **Yes** (Áno).
  - Ak chcete postup prerušiť, vyberte možnosť **Exit** (Skončiť).

#### **BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA**

Ak postup prerušujete, doštičku na elúciu cfDNA zaplombujte a skladujte ju pri teplote -25 °C až -15 °C maximálne 7 dní.

## Príprava knižníc

### Príprava

1. Vizuálne skontrolujte balenie na prípravu knižníc a balenie s príslušenstvom, aby ste sa ubezpečili, že súpravy nie sú po dátume expirácie.
2. Pripravte si nasledujúce reagenty. Označte zásobníkové skúmavky a zásobníky s hlbokými jamkami názvami reagentov.

Reagencia	Skladovanie	Pokyny
Zmes A-Tailing Mix	-25 °C až -15 °C	Nechajte rozmraziť pri izbovej teplote. Vortexujte, aby sa obsah premiešal, a potom krátko odstred'ujte v centrifúge.
cfDNA Elution Plate (Doštička na elúciu cfDNA)	-25 °C až -15 °C	Uistite sa, že doštička nebola skladovaná dlhšie ako 7 dní a nechajte ju rozmraziť pri izbovej teplote. Vortexujte 1 minútu pri 1 500 rpm. Odstred'ujte v centrifúge 20 sekúnd pri 1 000 × g.
End Repair Mix (Zmes na opravu koncov)	-25 °C až -15 °C	Nechajte rozmraziť pri izbovej teplote. Vortexujte, aby sa obsah premiešal.
Hybridization Buffer (Hybridizačný pufer)	-25 °C až -15 °C	Nechajte rozmraziť pri izbovej teplote. Vortexujte, aby sa obsah premiešal. <b>Po použití vráťte na miesto skladovania.</b>
Ligation Mix (Ligačná zmes)	-25 °C až -15 °C	Nechajte rozmraziť pri izbovej teplote. Vortexujte, aby sa obsah premiešal, a potom krátko odstred'ujte v centrifúge.
NIPT DNA Adapter Plate (Doštička adaptéra DNA NIPT)	-25 °C až -15 °C	Nechajte rozmraziť pri izbovej teplote. Vortexujte, aby sa obsah premiešal. Odstred'ujte v centrifúge 20 sekúnd pri 1 000 × g.
Resuspension Buffer (Pufer na resuspenziu)	2 °C až 8 °C	Vortexujte, aby sa obsah premiešal. <b>Po použití vráťte na miesto skladovania.</b>
Sample Purification Beads (Gulôčky na purifikáciu vzorky)	2 °C až 8 °C	Nechajte 30 minút odstáť, aby sa dosiahla izbová teplota. Pred každým použitím dôkladne vortexujte. Miešajte vortexovaním alebo otočením, kým všetky gulôčky nevytvoria suspenziu a zmes nezíska homogénny vzhľad.

**UPOZORNENIE**

Pri odplombovaní doštičky adaptéra DNA NIPT postupujte mimoriadne opatrne, aby ste predišli krížovej kontaminácii jamôk aerosólmi, čo môže spôsobiť nesprávne výsledky.

3. Ak bola doštička na elúciu cfDNA skladovaná zmrazená, pripravte ju podľa nasledujúceho postupu.
  - a. Nechajte rozmraziť pri izbovej teplote.
  - b. Vortexujte 1 minútu pri 1 500 rpm.
  - c. Odstreďujte v centrifúge 20 sekúnd pri 1 000 × g.
4. Označte jednu novú doštičku s plnou obrubou názvom „Knižnice“ a nalepte na ňu čiarový kód doštičky.
5. Pripravte 80 % roztok EtOH z čistého EtOH. Zmiešajte 40 ml 100 % EtOH a 10 ml vody bez Dnáz/Rnáz. Prevráťte, aby sa obsah premiešal.
6. Skontrolujte, že riadenie teploty v systéme ML STAR je zapnuté.

**Dilúcia enzýmov**

1. Skombinujte zmes A-Tailing Mix a pufer na resuspenziu v skúmavke so skrutkovým uzáverom. Vortexujte, aby sa obsah premiešal, a potom krátko odstred'ujte v centrifúge.

Veľkosť dávky vzoriek	A-Tailing Mix (µl)	Resuspension Buffer (µl) (Pufer na resuspenziu)
24, 48	900	1200
96	1800	2400

2. Skombinujte ligačnú zmes a pufer na resuspenziu v skúmavke so skrutkovým uzáverom. Vortexujte, aby sa obsah premiešal, a potom krátko odstred'ujte v centrifúge.

Veľkosť dávky vzoriek	Ligation Mix (µl) (Ligačná zmes)	Resuspension Buffer (µl) (Pufer na resuspenziu)
24, 48	230	1713
96	440	3278

**Postup**

1. Vyberte možnosť **OK**, aby sa začala príprava knižníc. Ak nie je otvorená aplikácia **VeriSeq NIPT Method** (Metóda VeriSeq NIPT):
  - a. Otvorte nástroj AppLauncher a vyberte možnosť **VeriSeq NIPT Method** (Metóda VeriSeq NIPT).
  - b. Zadaťte ID dávky a meno používateľa a potom vyberte možnosť **OK**.
2. Skontrolujte, či je pripravený nasledujúci spotrebný materiál podľa pokynov na obrazovke Reagent Preparation (Príprava reagensí):
  - Zmes A-Tailing, ligačná zmes a 80 % roztok EtOH
  - Gulôčky na purifikáciu vzorky, zmes na opravu koncov a doštička adaptéra DNA NIPT

3. Začiarknite príslušné políčka a potom vyberte možnosť **OK**.
4. Naskenujte čiarové kódy balenia na prípravu knižnice.
5. Zadajte meno používateľa alebo iniciály osoby, ktorá pripravuje reagentie, a potom vyberte možnosť **OK**.
6. Naskenujte čiarové kódy na balení s príslušenstvom.
7. Zadajte meno používateľa alebo iniciály osoby, ktorá pripravuje reagentie, a potom vyberte možnosť **OK**.
8. Vložte špičky do držiakov špičiek podľa nasledujúceho postupu a potom vyberte možnosť **OK** pre každý držiak.

Veľkosť dávky vzoriek	Držiak Typ	Dráha	Položka	Umiestnenie
24	Špička	1 – 6	50 µl špičky	1
		7 – 12	300 µl špičky	1, 2
48	Špička	1 – 6	50 µl špičky	1, 2
		7 – 12	300 µl špičky	1, 2, 3, 4
96	Špička	1 – 6	50 µl špičky	1, 2, 3, 4
		7 – 12	300 µl špičky	1, 2, 3, 4, 5

9. Ak ste prerušili protokol po dokončení postupu extrakcie cfDNA, vložte spočítané špičky do držiakov špičiek podľa nasledujúceho postupu.

Veľkosť dávky vzoriek	Držiak Typ	Dráha	Položka	Umiestnenie
24, 48, 96	Špička	49 – 54	1000 µl špičky	1
			300 µl špičky	2
			50 µl špičky	3

10. Zadajte umiestnenie prvej a poslednej špičky z každého zásobníka špičiek potom vyberte možnosť **OK**.
11. Skontrolujte, či sú prilepené čiarové kódy a vložte doštičky (s čiarovými kódmi smerujúcimi doprava) na držiak doštičky podľa nasledujúceho postupu. Potom vyberte možnosť **OK**.

Veľkosť dávky vzoriek	Držiak Typ	Dráha	Položka	Umiestnenie
24, 48, 96	Multiflex	19 – 24	Doštička na elúciu cfDNA, s čiarovým kódom	1
			Doštička adaptéra DNA NIPT, s čiarovým kódom	2
			Nová doštička s plnou obrubou a 96 jamkami, knižnice, s čiarovým kódom	3
			Nové doštičky s plnou obrubou a 96 jamkami	4, 5



12. Vložte držiak na hlboké jamky podľa nasledujúceho postupu a potom vyberte možnosť **OK**.

Veľkosť dávky vzoriek	Držiak Typ	Dráha	Položka	Umiestnenie
24, 48, 96	Hlboká jamka	39 – 44	50 ml 80 % roztoku EtOH v zásobníku s hlbokými jamkami	1
			Nové doštičky s plnou obrubou a 96 jamkami	2, 3, 4, 5

13. Vložte skúmavky na reagentie do držiaka reagentí podľa nasledujúceho postupu a potom vyberte **OK**.

Veľkosť dávky vzoriek	Držiak Typ	Dráha	Položka	Umiestnenie
24, 48, 96	Reagencia	47	2,5 ml zmesi na opravu koncov (End Repair Mix)	1
			Pripravená zmes A-Tailing (celkový objem)	2
			Pripravená ligačná zmes (Ligation Mix, celkový objem)	3
			10 ml guľôčok na purifikáciu vzorky (Sample Purification Beads)	4
			12 ml hybridizačného pufru (Hybridization Buffer)	5

14. Zvyšok z 12 ml hybridizačného pufru (HT1) uskladnite v nádobe na združovanie (pooling)

15. Uistite sa, že držiaky, laboratórne vybavenie a reagentie sú vložené podľa pokynov, a potom vyberte možnosť **OK** na obrazovke verifikácie plošiny knižnice.

16. Počkejte, kým sa dokončí automatizovaná kontrola objemu reagentí.

17. Sledujte systém ML STAR počas automatizovaných krokov.

18. Keď vás na to vyzve aplikácia Workflow Manager, ubezpečte sa, že na vkladacej plošine systému ML STAR nie sú žiadne prekážky, aby mohol systém vyložiť držiaky.

19. Ak chcete plošinu vyložiť, vyberte možnosť **Unload** (Vyložiť).

20. Skontrolujte, či je v každej jamke doštičky s knižnicami rovnaký objem.



#### UPOZORNENIE

Ak sú objemy jamôk nekonzistentné, môže to spôsobiť nesprávne výsledky zo vzoriek.

21. Pri skladovaní doštičku s knižnicami zaplombujte a zaistite.

22. Vyložte držiaky, vyčistite plošinu a potom vyberte možnosť **OK**.

23. Vložte komentár k dotknutým jamkám a potom vyberte možnosť **OK**.

24. Vykonaňte jeden z nasledujúcich krokov:

- Ak chcete pokračovať v kvantifikácii knižníc, vyberte možnosť **Yes** (Áno).
- Ak chcete postup prerušiť, vyberte možnosť **Exit** (Skončiť).

### BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Ak postup prerušujete, doštičku s knižnicami pred uschovaním zaplombujte. Doštička s knižnicami je stabilná až 7 dní od dátumu prípravy pri teplote -25 °C až -15 °C.

## Kvantifikácia knižníc

### Príprava

1. Pripravte si nasledujúce reagenty:

Reagencia	Skladovanie	Pokyny
DNA Quantification Reagent (Reagencia kvantifikácie DNA)	2 °C až 8 °C	Chráňte pred svetlom. Nechajte rozmraziť pri izbovej teplote 30 – 150 minút. (Na začiatku postupu prípravy knižníc sa odporúča reagentu vybrať.) Vortexujte, aby sa obsah premiešal, a potom krátko odstred'ujte v centrifúge.
DNA Quantification Standard (Štandard kvantifikácie DNA)	2 °C až 8 °C	Vortexujte, aby sa obsah premiešal, a potom krátko odstred'ujte v centrifúge.
Resuspension Buffer (Pufer na resuspenziu)	2 °C až 8 °C	Vortexujte, aby sa obsah premiešal.

2. Ak bola doštička s knižnicami skladovaná zmrazená, pripravte ju podľa nasledujúceho postupu.
  - a. Uistite sa, že doštička nebola skladovaná dlhšie ako 7 dní, a rozmrazte ju pri izbovej teplote.
  - b. Vortexujte, aby sa obsah premiešal.
  - c. Odstred'ujte doštičku pri otáčkach 1000 × g 1 minútu.
3. 10 minút pred použitím zapnite fluorometer.
4. Prilepte čiarový kód doštičky na novú doštičku s 384 jamkami.
5. Prilepte čiarový kód doštičky na novú doštičku s plným lemom.

### Postup

1. Vyberte možnosť **OK**, čím začnete kvantifikáciu.
2. Ak ešte nie je otvorená aplikácia VeriSeq NIPT Method (Metóda VeriSeq NIPT):
  - a. Otvorte Nástroj na spustenie aplikácií a vyberte možnosť **VeriSeq NIPT Method** (Metóda VeriSeq NIPT).

- b. Zadaťte ID dávky a meno používateľa a potom vyberte možnosť **OK**.
- Naskenujte čiarové kódy na balení s príslušenstvom.
  - Zadaťte meno používateľa alebo iniciály osoby, ktorá pripravuje reagenty, a potom vyberte možnosť **OK**.
  - Vložte špičky do držáka špičiek podľa nasledujúceho postupu a potom vyberte možnosť **OK**.

Veľkosť dávky vzoriek	Držiak Typ	Dráha	Položka	Umiestnenie
24, 48	Špička	1 – 6	Zásobník 300 µl špičiek	1
			Zásobník 50 µl špičiek	2
96	Špička	1 – 6	Zásobník 300 µl špičiek	1
			Zásobník 50 µl špičiek	2, 3

- Skontrolujte, či sú prilepené čiarové kódy.
- V prípade potreby odplombujte doštičku s knižnicami.
- Vložte doštičky (čiarovým kódom smerujúcim napravo) do multiflexového držáka podľa nasledujúceho postupu a potom zvolte možnosť **OK**.

Veľkosť dávky vzoriek	Držiak Typ	Dráha	Položka	Umiestnenie
24, 48, 96	Multiflex	19 – 24	Nové doštičky s plnou obrubou, s čiarovým kódom	1
			Nová doštička s 384 jamkami, s čiarovým kódom	2
			Doštička s knižnicami, s čiarovým kódom	3
			Nové doštičky s plnou obrubou a 96 jamkami	4, 5

- Vložte skúmavky na reagenty bez uzáverov do držáka skúmaviek podľa nasledujúceho postupu a potom vyberte možnosť **OK**.

Veľkosť dávky vzoriek	Držiak Typ	Dráha	Položka	Umiestnenie
24, 48, 96	Skúmavka	46	DNA Quantification Standard (Štandard kvantifikácie DNA)	1
			DNA Quantification Reagent (Reagencia kvantifikácie DNA)	2

10. Vložte skúmavky na reagentie do držača reagentí podľa nasledujúceho postupu a potom vyberte **OK**.

Veľkosť dávky vzoriek	Držiak Typ	Dráha	Položka	Umiestnenie
24, 48, 96	Reagentia	47	Nová skúmavka na reagentie (prázdna)	1
			16 ml pufer na resuspenziu	2

11. Ak ste prerušili protokol po dokončení postupu Príprava knižnice, vložte spočítané špičky do držačov špičiek podľa nasledujúceho postupu.

Veľkosť dávky vzoriek	Držiak Typ	Dráha	Položka	Umiestnenie
24, 48, 96	Špička	49 – 54	1000 µl špičky	1
			300 µl špičky	2
			50 µl špičky	3

12. Zadaťte umiestnenie prvej a poslednej špičky z každého zásobníka špičiek a potom zvolte možnosť **OK**.
13. Uistite sa, že držačky, laboratórne vybavenie a reagentie sú vložené podľa pokynov, a potom zvolte možnosť **OK** na obrazovke overenia plošiny kvantifikácie.
14. Počkajte, kým sa dokončí automatizovaná kontrola objemu reagentí.
15. Sledujte systém ML STAR počas automatizovaných krokov.
16. Keď vás na to vyzve aplikácia Workflow Manager, ubezpečte sa, že na vkladacej plošine systému ML STAR nie sú žiadne prekážky, aby mohol systém vyložiť držačky.
17. Ak chcete plošinu vyložiť, vyberte možnosť **Unload** (Vyložiť).
18. Vyložte doštičku s knižnicami.
- Skontrolujte, či je v každej jamke rovnaký objem.
  - Zaplombujte doštičku s knižnicami a uskladnite ju pri izbovej teplote, kým sa nedokončí analýza údajov z fluorometrie.
19. Vyložte zostávajúce doštičky s 96 jamkami a skontrolujte, či sú objemy v každej jamke rovnaké. Hrubé chyby objemu môžu poukazovať na problém s krokmi pipetovania.
20. Vyložte doštičku s 384 jamkami a skontrolujte, či sa v správnych jamkách nachádza kvapalina.
21. Zaplombujte doštičku tesniacou fóliou.
22. Odstredujte v centrifúge 20 sekúnd pri 1 000 × g.
23. Inkubujte 10 minút pri izbovej teplote a chráňte pred svetlom.
24. Vyložte všetky držačky.
25. Vyčistite plošinu systému ML STAR a potom zvolte možnosť **OK**.

**UPOZORNENIE**

Nelikvidujte reagenty kvantifikácie, kým nezískate údaje. Reagenty budete potrebovať v prípade, keď bude nutné zopakovať kvantifikáciu.

26. Po inkubácii odstráňte fóliovú plombu a doštičku s 384 jamkami vložte na čítačku mikrodoštičiek. Ubezpečte sa, že ste použili fialovú doštičku adaptéra (časť č. 0310-4336) dodanú spoločnosťou Molecular Devices alebo ekvivalentnú doštičku, ak to použitý prístroj umožňuje.
  - Ubezpečte sa, že pozícia A1 je pri vkladaní v ľavom hornom rohu.
27. Dvojklikom na šablónu VeriSeq NIPT ju otvorte v softvéri SoftMax Pro.
28. Zvoľte možnosť **New Experiment** (Nový pokus) na domovskej karte.
29. Zvoľte možnosť **Read** (Čítať).
30. Exportujte údaje vo formáte XML ďalej uvedeným spôsobom.
  - a. Pravým tlačidlom myši vyberte možnosť **Plate** (Doštička) a potom vyberte možnosť **Rename** (Premenovať).
  - b. Naskenujte čiarový kód doštičky na kvantifikáciu a potom vyberte možnosť **OK**.
  - c. V ľavom hornom rohu obrazovky vyberte ikonu doštičky a z ponuky vyberte možnosť **Export** (Exportovať).
  - d. Začiarknite políčko **Expt name** (Názov exportu), nastavte dátum doštičky na „nespracované“ (raw), nastavte výstupný formát na XML a potom vyberte možnosť **OK**.
  - e. Zadaťte cestu a názov výstupného súboru a potom zvoľte možnosť **Save** (Uložiť).Počítač so systémom Hamilton musí mať prístup k umiestneniu súboru. Nepoužívajte v ceste ani názve súboru medzery.

**Analýza**

1. Na obrazovke Informácie o skenere v systéme ML STAR zadajte ID fluorometra.
2. Vložte komentár k chodu fluorometra a potom vyberte možnosť **OK**.
3. Prejdite k súboru kvantifikácie \*.xml, ktorý obsahuje fluorometrické údaje, a potom vyberte možnosť **OK**.
4. Skontrolujte výsledky analýzy štandardnej krivky a koncentrácie vzorky a potom vyberte možnosť **OK**.
5. Ak je nutné doštičku opätovne preskenovať, vyberte možnosť **Rescan** (Preskenovať).

Vzorky sú citlivé na pôsobenie času a svetla. V prípade potreby vykonajte okamžité preskenovanie.
6. Vložte komentár k dotknutým jamkám a potom vyberte možnosť **OK**.
7. Vyhodnoťte výsledky a pokračujte podľa uvedeného postupu.
  - Ak sú výsledky v súlade so špecifikáciou, pokračujte na [Združovanie knižníc na strane 38](#). Špecifikácie nájdete v tabuľke Metriky a hranice kontroly kvality kvantitatívneho vyjadrenia v *Príručke k softvéru VeriSeq NIPT Solution v2 (dokument č. 1000000067940)*.
  - Ak výsledky nie sú v súlade so špecifikáciou, systém metódu preruší. Zopakujte postupy kvantifikácie od časti [Príprava na strane 34](#).

8. Vykonajte jeden z nasledujúcich krokov:

- Ak chcete prejsť na [Združovanie knižníc na strane 38](#), vyberte možnosť **Yes** (Áno).
- Ak chcete postup prerušiť, vyberte možnosť **Exit** (Skončiť).

### BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Ak postup prerušujete, doštičku s knižnicami pred uschovaním zaplombujte. Doštička s knižnicami je stabilná až 7 dní kumulatívneho skladovania pri teplote -25 °C až -15 °C.

## Združovanie knižníc

### Príprava

1. Pripravte si nasledujúce reagenty:

Reagencia	Skladovanie	Pokyny
Hybridization Buffer (Hybridizačný pufer)	-25 °C až -15 °C	Nechajte rozmraziť pri izbovej teplote. Vortexujte, aby sa obsah premiešal. Po použití vráťte na miesto skladovania.

- Ak bola doštička s knižnicami skladovaná zmrazená, pripravte ju podľa nasledujúceho postupu.
  - Uistite sa, že doštička nebola skladovaná dlhšie ako 7 dní, a rozmrazte ju pri izbovej teplote.
  - Vortexujte 1 minútu pri 1 500 rpm.
  - Odstred'ujte v centrifúge 20 sekúnd pri 1 000 × g.
  - Pipetujte, aby sa obsah premiešal.
- Označte prázdnu skúmavku na združovanie ako Skupina A. Pri 96 vzorkách označte druhú prázdnu skúmavku na združovanie ako Skupina B.
- Uložte si nasledujúci program denaturácie v termálnom cykléri s nahrievaným príklopom.
  - Vyberte možnosť predhriatia príklopu a nastavte teplotu na 102 °C.
  - Nastavte reakčný objem na 50 µl.
  - Nastavte rýchlosť zmeny hodnoty na maximum (≥ 2 °C za sekundu).
  - Inkubujte 10 minút pri 96 °C a potom 5 sekúnd pri 4 °C.
  - Udržujte pri teplote 4 °C.

### Postup

- Doštičku s knižnicami umiestnite do predprogramovaného termálneho cykléra a spustíte program denaturácie.  
Nevykonávajte denaturáciu doštičky s knižnicami pred tým, ako proces kvantifikácie schválil metriky kontroly kvality, pretože možno budete chcieť kvantifikáciu zopakovať.
- Odstred'ujte doštičku s knižnicami v centrifúge 20 sekúnd pri 1000 × g.
- Vyberte možnosť **OK**, aby sa začalo združovanie knižníc.

4. Ak nie je otvorená aplikácia VeriSeq NIPT Method (Metóda VeriSeq NIPT):
  - a. Otvorte nástroj AppLauncher a vyberte **VeriSeq NIPT Method** (Metóda VeriSeq NIPT).
  - b. Zadáajte ID dávky a meno používateľa a potom vyberte možnosť **OK**.
5. Zvoľte koncentráciu skupiny (pool) a potom vyberte **OK**.  
Cieľová hustota klastra je 220 – 260 K/mm<sup>2</sup>.

**POZNÁMKA** Koncentrácie združovania a/alebo objemy združovania môže byť potrebné zvýšiť na 24 dávok vzoriek, aby ste zachovali podobnú hustotu klastra získanú pri 48/96 dávkach vzoriek.

6. Ak vás na to vyzve aplikácia Workflow Manager (Manažér pracovného postupu), vykonajte jeden z nasledujúcich krokov:
  - Ak chcete načítať hárok údajov na analýzu, vyberte hárok údajov na analýzu súvisiaci s príslušnou dávkou a potom vyberte možnosť **Load** (Načítať).
  - Ak chcete použiť prednastavené hodnoty systému pre ostatné typy vzoriek, vykazovanie pohlavia alebo typ vyšetrenia, vyberte možnosť **Use Default** (Použiť prednastavené) pre každé nastavenie. Informácie o vytvorení hárika údajov na analýzu nájdete v *Príručke k softvéru VeriSeq NIPT Solution v2* (dokument č. 1000000067940).
7. Vyberte **Start** (Spustiť), ak chcete spustiť časovač denaturácie doštičky.
8. Nasadte špičky na držiaky špičiek podľa nasledujúceho postupu.

Veľkosť dávky vzoriek	Držiak Typ	Dráha	Položka	Umiestnenie
24, 48, 96	Špička	7 – 12	50 µl špičky filtra	1

9. Vložte doštičku s denaturovanou knižnicou (čiarovým kódom otočeným napravo) do multiflexového držiaka podľa nasledujúceho postupu a potom vyberte možnosť **OK**.

Veľkosť dávky vzoriek	Držiak Typ	Dráha	Položka	Umiestnenie
24, 48, 96	Multiflex	19 – 24	Doštička s denaturovanou knižnicou (s čiarovým kódom)	1

10. Vložte skúmavky na združovanie do držiaka skúmavky podľa nasledujúceho postupu a potom vyberte možnosť **OK**.

Veľkosť dávky vzoriek	Držiak Typ	Dráha	Položka	Umiestnenie
24, 48	Skúmavka	46	Nová 2 ml skúmavka, Skupina A	1
96	Skúmavka	46	Nová 2 ml skúmavka, Skupina A	1
			Nová 2 ml skúmavka, Skupina B	2

11. Vložte skúmavky na reagentie do držiaka reagentí podľa nasledujúceho postupu a potom vyberte **OK**.

Veľkosť dávky vzoriek	Držiak Typ	Dráha	Položka	Umiestnenie
24, 48, 96	Reagentia	47	3 ml hybridizačného pufru	1

12. Nasadte špičky na držiaky špičiek podľa nasledujúceho postupu.

Veľkosť dávky vzoriek	Držiak Typ	Dráha	Položka	Umiestnenie
24, 48, 96	Špička	49 – 54	1000 µl špičky filtra	1
			300 µl špičky filtra	2
			50 µl špičky filtra	3

13. Zadaťte umiestnenie prvej a poslednej špičky z každého zásobníka špičiek a potom vyberte možnosť **OK**.
14. Uistite sa, že držiaky, laboratórne vybavenie a reagentie sú vložené podľa pokynov.
15. Na obrazovke verifikácie plošiny združovania zvolte možnosť **OK**.
16. Sledujte systém ML STAR počas automatizovaných krokov.
17. Vložte komentár k príslušným jamkám a potom vyberte možnosť **OK**.
18. Keď vás na to vyzve aplikácia Workflow Manager, ubezpečte sa, že na vkladacej plošine systému ML STAR nie sú žiadne prekážky, aby mohol systém vyložiť držiaky.
19. Ak chcete plošinu vyložiť, vyberte možnosť **Unload** (Vyložiť).
20. Vyložte nosič skúmaviek.
21. Každú skúmavku na združovanie uzavrite, vortexujte a potom krátko odstredte v centrifúge.
22. Vyberte možnosť **OK**.
23. Knižnice sekvenujte čo najskôr po združení. Zaplombujte doštičku s knižnicami a uskladnite ju pri teplote od -25 °C do -15 °C do 7 dní, aby sa umožnilo opätovné združovanie.

## BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Ak postup prerušujete, skúmavky na združovanie (pooling) uzavrite a skladujte pri teplote -25 °C až -15 °C maximálne 7 dní.

## Príprava združených knižníc na sekvenovanie

### Príprava

1. Pripravte si nasledujúce reagentie:



Reagencia	Skladovanie	Pokyny
Skúmavky na združovanie	-25 °C až -15 °C	Ak boli predtým skladované, nechajte ich rozmraziť pri izbovej teplote. Krátko vortexujte. Krátko odstred'te v centrifúge.

2. Pripravte systém sekvenovania novej generácie vyplnením nasledujúcich polí v module Local Run Manager VeriSeq NIPT Module:
  - a. Názov chodu
  - b. **[Voliteľné]** Opis chodu
  - c. Čiarový kód skupiny



### UPOZORNENIE

Čiarový kód skupiny zadaný v module LRM musí zodpovedať čiarovému kódu skupiny zadanému v aplikácii Workflow Manager. Nesprávne konfigurácie chodu softvér na analýzu zamietne a bude sa vyžadovať opakovanie sekvenovania.

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

## Postup

1. Zmiešajte nasledujúce objemy do kazety s reagentami a pipetujte, aby sa obsah premiešal.
  - Hybridizačný pufer (900 µl)
  - 450 µl skupiny A (450 µl)
2. Pokračujte v sekvenovaní použitím systému sekvenovania novej generácie podľa príručky k systému. Referenčná príručka vášho prístroja na sekvenovanie novej generácie. Informácie k systému NextSeq 550Dx nájdete v *Referenčnej príručke prístroja NextSeq 550Dx (dokument č. 1000000009513)* alebo *Príbalovom letáku prístroja NextSeq 550Dx (dokument č. 1000000043133)*.
3. Keď sa zobrazí výzva, potvrdte správnu konfiguráciu chodu.ď sa zobrazí
4. V prípade potreby tento postup zopakujte pre skupinu B.
  - Ak chcete dosiahnuť cieľový rozsah hustoty klastra, doštičku s knižnicou môžete opätovne združiť použitím inej koncentrácie združovania v systéme Hamilton. Opätovné združenie zneplatní pôvodnú skupinu.
  - Prípadne je možné pomer skupiny k HT1 (450 µl + 900 µl) upraviť tak, aby sa dosiahol cieľový rozsah hustoty klastra.

## Sekvenovanie novej generácie

Systém VeriSeq NIPT Solution v2 je možné používať so sekvenčným systémom novej generácie s nasledujúcimi špecifikáciami:

- spracuje čítania z oboch koncov v počte  $2 \times 36$ ,
- kompatibilný s indexovými adaptérmi v súprave VeriSeq NIPT Sample Prep,
- dvojkanálový chemický proces,
- automatické generovanie súborov .BCL (nespracované údaje zo sekvenčného prístroja),
- 400 mil. čítaní z oboch koncov v rámci jedného chodu,
- kompatibilný so softvérom VeriSeq NIPT Assay Software v2.

Zariadenie NextSeq 550Dx je kompatibilné s riešením VeriSeq NIPT Solution v2.

## Analýza údajov sekvenovania

Po dokončení sekvenovania sa údaje sekvenovania automaticky odošlú do softvéru VeriSeq NIPT Assay Software v2 na analýzu a vytvorenie správy. Správa zahŕňa klasifikácie každej vzorky v dávke, ako aj hodnotenie všetkých metrík kontroly kvality chodu. Proces analýzy od dokončenia sekvenovania po konečné výsledky trvá približne 4 hodiny pri dávke 48 vzoriek. Podrobnosti o analýze údajov a výstupnom súbore nájdete v Príručke k softvéru *VeriSeq NIPT Solution v2* (dokument č. 1000000067940).

## Interpretácia výsledkov

Algoritmus VeriSeq NIPT Solution v2 využíva dômyselný štatistický model, ktorý kombinuje niekoľko typov informácií z kolekcie fragmentov knižnice, ktoré boli sekvenované z oboch koncov. Tento model sa používa na detekciu oblastí genómu, ktoré sú nedostatočne alebo nadmerne exprimované v knižnici každej vzorky. Dôležitá je však skutočnosť, že tento model zohľadňuje to, či je stupeň nedostatočnej alebo nadmernej exprimácie kvantitatívne konzistentný s udalosťou aneuploidie vo fetálnom genóme na úrovni fetálnej frakcie odhadovanej pre knižnicu.

V prípade všetkých chromozómov sa údaje sekvenovania z oboch koncov usporiadajú podľa referenčného genómu (HG19). Jedinečné neduplikované zarovnané čítania sú agregované do 100 kb skupín. Príslušné počty skupín sa upravujú z hľadiska skreslenia GC a podľa predtým vytvoreného genomického pokrytia špecifického pre danú oblasť. Použitím takýchto normalizovaných počtov skupín sa odvodí štatistické skóre pre každý autozóm formou porovnania oblastí pokrytia, ktoré môže postihnúť aneuploidia, so zvyškom autozómov. Logaritmus pomeru pravdepodobnosti (LLR) sa vypočíta pre každú vzorku tak, že sa zohľadnia tieto skóre na základe pokrytia a odhadovanej fetálnej frakcie. LLR predstavuje pravdepodobnosť postihnutia vzorky na základe pozorovaného pokrytia a fetálnej frakcie verzus pravdepodobnosť že vzorka v rámci rovnakého pozorovaného pokrytia ovplyvnená nebude. Výpočet tohto pomeru zohľadňuje aj odhadovanú nepresnosť vo fetálnej frakcii. Počas následných výpočtov sa používa prirodzený logaritmus pomeru. Assay Software zhodnotí LLR z hľadiska každého cieľového chromozómu a každej vzorky na stanovenie určenia aneuploidie.

Počas vytvárania dávky je potrebné pre každú vzorku definovať typ vzorky (jeden plod alebo dva plody), typ skríningu (základný alebo celogenómový) a vykazovanie pohlavných chromozómov (Yes (Áno), No (Nie) a SCA). Tieto možnosti spoločne určujú informácie vykazované za každú vzorku.

V prípade všetkých typov vzoriek určuje typ skríningu vykazované autozomálne anomálie. V prípade základného typu skríningu sa vykazujú iba udalosti chromozomálnej trizómie zahŕňajúce chromozómy 13, 18 a 21. V prípade celogenómového skríningu sa vykazuje celá alebo čiastočná chromozomálna delécia alebo duplikácia ľubovoľného autozomálneho chromozómu. Dĺžka najmenej vykazovateľnej čiastočnej chromozomálnej delécie alebo duplikácie je 7 Mb.

V prípade vzoriek s jedným plodom môžete vykazovanie pohlavných chromozómov zakázať. Systém môžete nakonfigurovať aj tak, aby vykazoval aneuploidie pohlavných chromozómov s vykazovaním pohlavia euploidných vzoriek, alebo bez neho.

Ak v prípade vzoriek s dvoma plodmi vyberiete v časti vykazovania pohlavných chromozómov možnosť Yes (Áno), výsledok bude obmedzený na vykazovanie prítomnosti alebo neprítomnosti chromozómu Y v knižnici. Aneuploidiu pohlavného chromozómu nie je možné vykazovať v prípade vzoriek s dvoma plodmi.

Výsledok ANOMALY DETECTED (ZISTILA SA ANOMÁLIA) indikuje pozitivitu vzorky z hľadiska jednej alebo viacerých anomálií konzistentných s vybratým typom skríningu a možnosťou vykazovania pohlavného chromozómu. Keď sa zistí anomália, správa bude obsahovať opis anomálie v rámci cytogenetického oznámenia.

Systém VeriSeq NIPT Assay Software v2 využíva štatistické informácie generované počas sekvenovania na poskytnutie odhadu fetálnej frakcie (FFE) pre každú vzorku. Frakcia FFE je odhadovaný plodový komponent cfDNA, ktorý sa v rámci analýzy obnoví a bude vykazovaný ako zaokrúhlené percento pre každú vzorku. Priemerná štandardná odchýlka tohto odhadu v rámci všetkých vzoriek dosahuje hodnotu 1,3 %. FFE sa nesmie používať počas izolácie na vylúčenie vzoriek počas vykazovania výsledkov.

Na vytvorenie analýz chromozomálnej exprimácie systém VeriSeq NIPT Assay Software v2 využíva individualizovaný test spoľahlivosti fetálnej aneuploidie (iFACT), t. j. dynamickú metriku prahovej hodnoty, ktorá indikuje, či systém generoval dostatočné pokrytie pri sekvenovaní, a to s prihliadnutím na odhad fetálnej frakcie pre každú vzorku. Negatívne analýzy sa vykazujú iba vtedy, ak vzorka spĺňa prahovú hodnotu iFACT. Ak vzorka nedosiahne túto prahovú hodnotu, hodnotenie kontroly kvality (QC) uvedie hlásenie FAILED iFACT (ZLYHANIE iFACT) a systém nebude generovať výsledok.

Okrem testu iFACT systém VeriSeq NIPT Assay Software v2 počas analýzy hodnotí aj niekoľko ďalších metrick QC. Ďalšie metriky zahŕňajú hodnotenie uniformity pokrytia na referenčných genomických oblastiach a distribúciu dĺžok fragmentov cfDNA. Hodnotenie QC zobrazí buď príznak QC, alebo zlyhanie QC v prípade, že akákoľvek metrika bude spadať mimo prijateľného rozsahu. V prípade zlyhania QC systém nebude generovať výsledok vzorky. Ak zlyhá QC vzorky, vzorku je možné znova spracovať za predpokladu, že v skúmavke na odber krvi sa bude nachádzať dostatočný objem plazmy.

Systém VeriSeq NIPT Solution v2 generuje údaje na použitie v záverečnej správe. Jeho výstupom nie je záverečná správa pre pacienta. Zákazníci sú zodpovední za charakteristiku a obsah záverečnej správy, ktorá sa doručí ošetrovateľovi. Spoločnosť Illumina nenesie zodpovednosť za správnosť znenia záverečnej správy pre zákazníkov.

**UPOZORNENIE**

Skontrolujte odhady fetálnej frakcie všetkých vzoriek. Ak sú odhady fetálnej frakcie podobné v prípade všetkých vzoriek v rámci chodu, je možné, že došlo k amalgamácií vzorky, ktorá ovplyvnila výsledky. Obráťte sa na oddelenie technickej podpory spoločnosti Illumina a požiadajte o pomoc pri riešení tohto problému.

## Výkonnostné charakteristiky

Nasledujúce údaje uvádzané v častiach s informáciami o klinickom a analytickom výkone boli generované použitím protokolov a materiálov uvádzaných v návode na použitie (počínajúc plazmou). Všetky sekvenčné údaje tejto časti boli generované v sekvenčnom systéme NextSeq 500/550 alebo v sekvenčnom systéme NextSeq 550Dx s nasledujúcimi charakteristikami:

	<b>NextSeq 500/550</b>	<b>NextSeq 550Dx</b>
Softvér v prístroji	NextSeq Control Software 4.0	NextSeq Operating Software 1.3
Verzia súpravy reagensí	Súprava reagensí NextSeq 500/550 High Output v2.5 (75 cyklov)	Súprava reagensí NextSeq 550Dx High Output v2.5 (75 cyklov)
Spôsob sekvenovania	Chod sekvenovania 2 × 36, z oboch koncov, v režime vysokého výkonu	Chod sekvenovania 2 × 36, z oboch koncov, v režime vysokého výkonu

## Klinická štúdia

Klinická presnosť testu VeriSeq NIPT Solution v2 bola hodnotená formou hodnotenia plazmatických vzoriek od tehotných žien s tehotenstvami s jedným a dvoma plodmi. Vzorky boli získané z deidentifikovaných plazmatických vzoriek z banky, ktoré boli predtým spracované zo vzoriek periférnej celej krvi. Na zahrnutie do štúdie bolo zvažovaných viac než 45 000 vzoriek. Tieto vzorky absolvovali predchádzajúci prenatálny skrining zameraný na detekciu fetálnych chromozomálnych aneuploidí a čiastočných delécií a duplikácií veľkosti 7 Mb alebo väčšej. Všetky vzorky z dotknutých tehotenstiev a podmnožina po sebe nasledujúcich vzoriek z neovplyvnených tehotenstiev boli vhodné na testovanie v prípade, ak boli k dispozícii klinické výstupy a boli splnené kritériá na vzorky. Súbor testovacej analýzy obsahoval celkom 2335 vzoriek. Z uvedeného súboru bolo 2328 vzoriek z tehotenstiev s jedným plodom a sedem vzoriek z tehotenstiev s dvoma plodmi.

Spomedzi uvedených vzoriek bola kontrola kvality počas prvej fázy analýzy dokončených sekvenčných údajov neúspešná u 28 (1,2 %, 28/2335) vzoriek:

- 27 zlyhaní iFACT (jeden prípad XO, 26 bez ovplyvnenia)
- Jedno zlyhanie v dôsledku údajov mimo predpokladaného rozsahu

## Demografické a tehotenské charakteristiky

Súhrnné informácie o materskom veku, gestačnom veku a trimestri tehotenstva uvádza [Tabuľka 7](#) za všetky vzorky v celogenómovom skríningu vrátane vzoriek so známou mozaikou. Väčšina (98 %) testovaných vzoriek predstavuje vzorky z prvého trimestra tehotenstva.

Demografické údaje boli hodnotené medzi základnými a celogenómovými kohortami a nevykazovali žiadne štatistické rozdiely. Demografické a tehotenské charakteristiky boli podobné bez ohľadu na to, či boli zahrnuté známe mozaiky, alebo nie.

Tabuľka 7 Demografické a tehotenské charakteristiky

Súhrnné štatistické údaje	Celogenómový skríning (vrátane známych mozaík)
Počet vzoriek	2307*
<b>Materský vek – v rokoch</b>	
Stredná hodnota	35,08
Štandardná odchýlka	4,04
Medián	34,95
25. percentil, 75. percentil	32,31; 37,79
Minimum, maximum	20,22; 53,02
<b>Gestačný vek pri odbere krvi – týždne</b>	
Stredná hodnota	10,93
Štandardná odchýlka	1,20
Medián	10,57
25. percentil, 75. percentil	10,29; 11,14
Minimum, maximum	10,00; 27,86
<b>Trimester tehotenstva – n (%)</b>	
< prvý (< 14 týždňov)	2252 (98 %)
Druhý	54 (2%)
Tretí (≥ 27 týždňov)	1 (0%)

\* Finálne prezentované vzorky obsahovali 7 dvojčiat.

## Klinická účinnosť

Výsledky analýzy VeriSeq NIPT Solution v2 boli porovnané s výsledkami klinického referenčného štandardu. Výsledky klinického referenčného štandardu všetkých vzoriek (klinická pravda) súviseli so stavom chromozomálnej aneuploidie plodu a čiastočnými deléciami a duplikáciami s veľkosťou 7 Mb alebo väčšou. Výsledok klinického referenčného štandardu vzoriek zahrnutých do tejto štúdie záviseli od chromozomálnej analýzy alebo fyzického vyšetrenia novorodenca s negatívnym skríningom NIPT založeným na NGS. Vyškolený personál štúdie vykonal klasifikáciu údajov klinického referenčného štandardu podľa dokumentu Medical Coding (Zdravotnícke označovanie) od zadávateľa.

Metódy chromozomálnej analýzy zahŕňali karyotypizáciu, fluorescenčnú hybridizáciu in situ (FISH) alebo chromozomálnu mikroanalýzu komparatívnej genomickú hybridizáciu (CMA). Chromozomálna analýza sa uskutočnila použitím periférnej krvi alebo slín novorodencov alebo batoliat, vzoriek vývojového tkaniva počas tehotenstva (POC), amniocytov, chorionických klkov, tkanív z placenty alebo postnatálnej pupočníkovej krvi.

Mozaicizmus je definovaný ako prítomnosť dvoch alebo viacerých bunkových radov odlišnej chromozómovej skladby u jedinca. Bunkové rady pochádzajú z rovnakej zygoty. Typ a úroveň mozaicizmu sa líšia a závisia od načasovania udalostí mozaicizmu počas embryogenézy a vývoja plodu. V rámci prenatalných diagnóz sa vyskytujú rôzne typy mozaicizmu v závislosti od distribúcie abnormálnych a normálnych bunkových radov v cytotrofoblaste, mezenchýme a plode.<sup>10</sup> Aj keď je možné pozorovať mozaicizmus v rámci akejkoľvek chromozómovej anomálie, prevalencia mozaicizmu v zriedkavých trizómiách je vyššia než v prípade trizómií chromozómov 21, 18 a 13 (T21, T18 a T13).<sup>11</sup> Počas hodnotenia účinnosti boli prípady mozaicizmu zahrnuté do celogenómovej analýzy, keďže účelom tohto typu skríningu je detegovať zriedkavé autozomálne aneuploidie (RAA).

## Účinnosť základného skríningu

Anomálie v prípade základného skríningu zahŕňajú T21, T18 a T13. Do analýzy bolo zahrnutých celkom 2243 vzoriek tehotenstiev s jedným a dvoma plodmi. Všetkých sedem tehotenstiev s dvoma plodmi bolo správne detegovaných ako T21 a nie sú uvádzané v nasledujúcej tabuľke.

Tabuľka 8 Citlivosť a špecificita testu VeriSeq NIPT Solution v2 pri detekcii trizómií 21, 18 a 13 v rámci základného skríningu tehotenstiev s jedným plodom (okrem známych mozaík)

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

Účinnosť analýzy v rámci základného skrínungu, ako uvádza [Tabuľka 8](#), sa počíta s vylúčením 64 vzoriek ovplyvnených RAA, autozomálnych čiastočných delécií alebo duplikácií, alebo známeho mozaicizmu. Uvedených 64 vzoriek zahŕňalo osem mozaík T21 a tri mozaiky T18. Päť z uvedených 11 vzoriek bolo identifikovaných ako postihnutých anomáliou detegovanou softvérom VeriSeq NIPT Assay Software v2.

## Účinnosti celogenómového skrínungu

V prípade celogenómového skrínungu zahŕňajú všetky anomálie trizómie, monozómie a čiastočné delécie alebo duplikácie veľkosti 7 Mb alebo väčšej. Vzorky na celogenómový skrínung obsahovali 36 vzoriek so známym mozaicizmom. Celkom bolo testovaných 2307 vzoriek tehotenstiev s jedným a dvoma plodmi. Všetkých sedem tehotenstiev s dvoma plodmi bolo správne detegovaných ako tehotenstvá s anomáliou na chromozóme 21 a tieto tehotenstvá neboli v nasledujúcich tabuľkách vykazované.

### Účinnosť celogenómového skrínungu – akákoľvek anomália

Tabuľka 9 Citlivosť a špecificita testu VeriSeq NIPT Solution v2 pri detekcii akejkoľvek anomálie v celogenómovom skrínungu (vrátane známych mozaík)

	Citlivosť	Špecificita
Odhad % (n/N)	95,5 % (318/333)	99,34 % (1954/1967)
2-stranný 95 % interval spoľahlivosti (CI)	92,7 %, 97,3 %	98,87 %, 99,61 %

### Účinnosť celogenómového skrínungu v prípade zriedkavej autozomálnej aneuploidie

Tabuľka 10 Citlivosť a špecificita testu VeriSeq NIPT Solution v2 z hľadiska zriedkavej autozomálnej aneuploidie (RAA) v celogenómovom skrínungu (vrátane známych mozaík)

	Citlivosť	Špecificita
Odhad % (n/N)	96,4 % (27/28)	99,80 % (2001/2005)
2-stranný 95 % interval spoľahlivosti (CI)	82,3 %, 99,4 %	99,49 %, 99,92 %

### Účinnosť celogenómového skrínungu – čiastočné delécie a duplikácie

Tabuľka 11 Citlivosť a špecificita testu VeriSeq NIPT Solution v2 z hľadiska čiastočných delécií a duplikácií veľkosti 7 Mb alebo väčšej v rámci celogenómového skrínungu (vrátane známych mozaík)

	Citlivosť	Špecificita
Odhad % (n/N)	74,1 % (20/27)	99,80 % (2000/2004)
2-stranný 95 % interval spoľahlivosti (CI)	55,3 %, 86,8 %	99,49 %, 99,92 %

## Rozdiely v účinnosti základného a celogenómového skríningu

Metodológia určovania skóre bežných trizómií a aneuploidíí pohlavných chromozómov je v rámci základného aj celogenómového skríningu rovnaká. Základný skrínung uplatňuje tento algoritmus iba na T21, T18 a T13.

Celogenómový skrínung má však v rámci tejto metodológie širší záber a jeho hodnotenie sa vzťahuje na všetky trizómie a RAA, ako aj na všetky čiastočné duplikácie a delécie.

Existujú dva základné rozdiely vykazovania účinnosti medzi základným a celogenómovým skrínungom. Po prvé: pokiaľ ide o celogenómový skrínung, vzorky so známym mozaicizmom (bežné trizómie a RAA, ako aj čiastočné delécie a duplikácie) boli zahrnuté do metriky účinnosti. Po druhé: celogenómový skrínung môže preferenčne vykazovať detekciu čiastočnej duplikácie alebo delécie v rámci úplnej trizómie. Prítomnosť úplnej trizómie okrem čiastočnej duplikácie alebo delécie je možné pozorovať podľa skóre LLR uvádzané v doplnkovej správe.

## Zahrnutie mozaiky do celogenómového skríningu

Mozaicizmus je uvádzaný ako obmedzenie tejto analýzy. Keď je mozaicizmus prítomný, plodový signál anomálie je obmedzený, a preto môže byť detekcia bez narušenia celkovej špecificity analýzy pomerne náročná. Keďže však je mozaicizmus relevantnejší pre širší rozsah, vzorky s mozaicizmom boli zahrnuté do celogenómového skríningu.

Spomedzi 64 vzoriek zahrnutých do celogenómového skríningu (nie však do základného skríningu) bolo 36 vzoriek podľa klinického referenčného štandardu identifikovaných ako vzorky s mozaicizmom. Spomedzi týchto 36 vzoriek bolo 23 analýz, ktoré sa zhodovali s klinickým referenčným štandardom.

## Čiastočná delécia alebo duplikácia v porovnaní s detekciou aneuploidie celého chromozómu

Systém VeriSeq NIPT Solution v2 ponúka možnosti ponuky týkajúce sa základného skríningu aj celogenómového skríningu. V rámci základného skríningu je výsledok ANOMALY DETECTED (ZISTILA SA ANOMÁLIA) vykazovaný iba vtedy, keď sa zistí úplná anomália na chromozómoch 21, 18 alebo 13 a ak sú splnené všetky metriky kontroly kvality. V rámci celogenómového skríningu systém zisťuje aneuploidiu vo všetkých autozómoch a udalosti delécie a duplikácie s hodnotou najmenej 7 Mb.

Keď používate celogenómový skrínung a udalosť celého chromozómu a udalosť CNV v rámci toho istého chromozómu presiahne prahovú hodnotu LLR, systém udelí prioritu vykazovaniu udalosti čiastočnej delécie alebo duplikácie pred analýzou celého chromozómu v prípade, ak veľkosť čiastočnej delécie alebo duplikácie pokryje približne 75 % alebo menšiu časť chromozómu, v ktorom bola daná udalosť zistená. Ak je detegovaná oblasť čiastočnej delécie a duplikácie väčšia než 75 % veľkosti chromozómu, udalosť sa vyказuje ako plná trizómia alebo monozómia celého chromozómu v prípade, ak súčasne dôjde aj k prekročeniu prahovej hodnoty LLR celého chromozómu. Vzhľadom na uvedené môžu veľké delécie a duplikácie, ktoré sú menšie alebo rovnajúce sa 75 % veľkosti chromozómu, naznačovať aneuploidiu celého chromozómu.



Vo všetkých vzorkách je skóre LLR pri klasifikácii celého chromozómu dostupné v doplnkovej správe. Skóre LLR je potrebné skontrolovať vzhľadom na stanovenú hraničnú hodnotu na [95 % pravdepodobnosti detekcie pre priemerné oblasti podľa veľkosti – test VeriSeq NIPT Solution v2 na strane 59](#) ešte pred interpretáciou výsledku. Napríklad analýza CNV, v rámci ktorej skóre LLR na úrovni chromozómu presahuje hraničnú hodnotu, poskytuje ďalší základ pre interpretáciu konzistentnú s aneuploidiou celého chromozómu (príklad uvádza [Tabuľka 12](#)).

V rámci klinickej štúdie existovali dve vzorky tehotenstva s jedným plodom s výrazne veľkými duplikáciami (jedna na chromozóme 21 a jedna na chromozóme 18), ktoré boli menšie než 75 % relatívnej veľkosti chromozómu (pozri [Tabuľka 12](#)). Obidve udalosti boli namiesto úplnej trizómie pre daný chromozóm vykazované ako čiastočné duplikácie. Skóre LLR pre tieto udalosti prekročovali hraničnú hodnotu konzistentne s dotknutým výsledkom pre úplnú trizómiu. V prípade analýzy čiastočnej duplikácie alebo úplnej trizómie ponúka následná správa pozitívnej analýzy NIPT konfirmačné testovanie pacienta v období prenatálnej diagnostiky.

Tabuľka 12 Príklady udalostí veľkej duplikácie identifikované počas celogenómového skríningu

	Klinický výsledok (pravda)	Celogenómový systémový výsledok	Veľkosť anomálie (Mb)	% chromozómu	Skóre LLR
Vzorka 1	Trizómia 21, jeden plod	Čiastočná duplikácia na 21	22,50	48,9	19,43
Vzorka 2	Trizómia 18, jeden plod	Čiastočná duplikácia na 18	47,00	60,2	12,99

Prečítajte si *príručku k softvéru VeriSeq NIPT Solution v2* (č. dokumentu 1000000067940), v ktorej nájdete ďalšie informácie o metrikách kontroly kvality používaných na vykazovanie výsledkov aneuploidie.

## Pohlavné chromozómy

Výsledky pohlavných chromozómov zo systému VeriSeq NIPT Solution v2 boli porovnané s výstupom klinického referenčného štandardu a ich zhrnutie obsahuje nasledujúca tabuľka. Pre každý pohlavný chromozóm v rámci každého výstupu klinického referenčného štandardu bola vypočítaná percentuálna zhoda. Percentuálna zhoda bola počítaná ako počet vzoriek, v rámci ktorých sa analýza pohlavného chromozómu VeriSeq NIPT Solution v2 zhodovala s klasifikáciou klinického referenčného štandardu, delené celkovým počtom vzoriek v rámci rovnakej klasifikácie klinického referenčného štandardu.

Tabuľka 13 Percentuálna zhoda klasifikácie pohlavia plodu\*

Klasifikácia pohlavia plodu		Fenotyp z fyzického vyšetrenia novorodenca		Cytogenetické výsledky							Chýba
Detegované	Karyotyp	Žena	Muž	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY	Iné**	Chýba
Anomália nebola zistená	XX	997	0	21	0	2	0	0	0	0	0
Anomália nebola zistená	XY	0	966	0	15	0	0	0	0	0	1
Zistená anomália	XO	0	0	0	0	19	0	0	1	0	0
Zistená anomália	XXX	0	0	0	0	0	17	0	0	1	0
Zistená anomália	XXY	0	0	0	0	0	0	23	0	1	0
Zistená anomália	XYY	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0
Spolu		997	966	21	15	21	17	23	12	2	1
Percentuálna miera zhody		100	100	100	100	90,5	100	100	91,7	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa

\* Päť tehotenstiev s dvoma plodmi bolo správne klasifikovaných ako tehotenstvá s prítomnosťou Y. Dve tehotenstvá boli správne klasifikované ako bez prítomnosti Y.

\*\* Iné cytogenetické výsledky boli XXXXX a XXYY.

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

Pozitívna prediktívna hodnota (PPV) a negatívna prediktívna hodnota (NPV) testu ponúkajú informácie o schopnosti testu poskytovať základ na prijímanie informovaných klinických rozhodnutí podľa citlivosti testu, jeho špecificity a pravdepodobnosti postihnutia plodu trizómiou (prevalencia). Keďže hodnoty PPV a NPV závisia od prevalencie a prevalencia týkajúca sa týchto aneuploidií sa v rámci rôznych populácií pacientov môže odlišovať, hodnoty PPV a NPV boli vypočítané pre rozsah hodnoverných hodnôt prevalencie na základe hodnôt citlivosti a špecificity zistených počas základného skríningu (bez známej mozaiky) v rámci štúdie klinickej presnosti. [Tabuľka 17](#) vychádza z celogenómového skríningu (so známou mozaikou).

Tabuľka 14 Prevalencia trizómie 21, PPV a NPV v rámci základného skríningu (okrem známych mozaík)

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

Tabuľka 15 Prevalencia trizómie 18, PPV a NPV v rámci základného skríningu (okrem známych mozaík)

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

Tabuľka 16 Prevalencia trizómie 13, PPV a NPV v rámci základného skríningu (okrem známych mozaík)

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

Tabuľka 17 Prevalencia akejkoľvek anomálie, PPV a NPV v rámci celogenómového skríningu (vrátane známych mozaík)

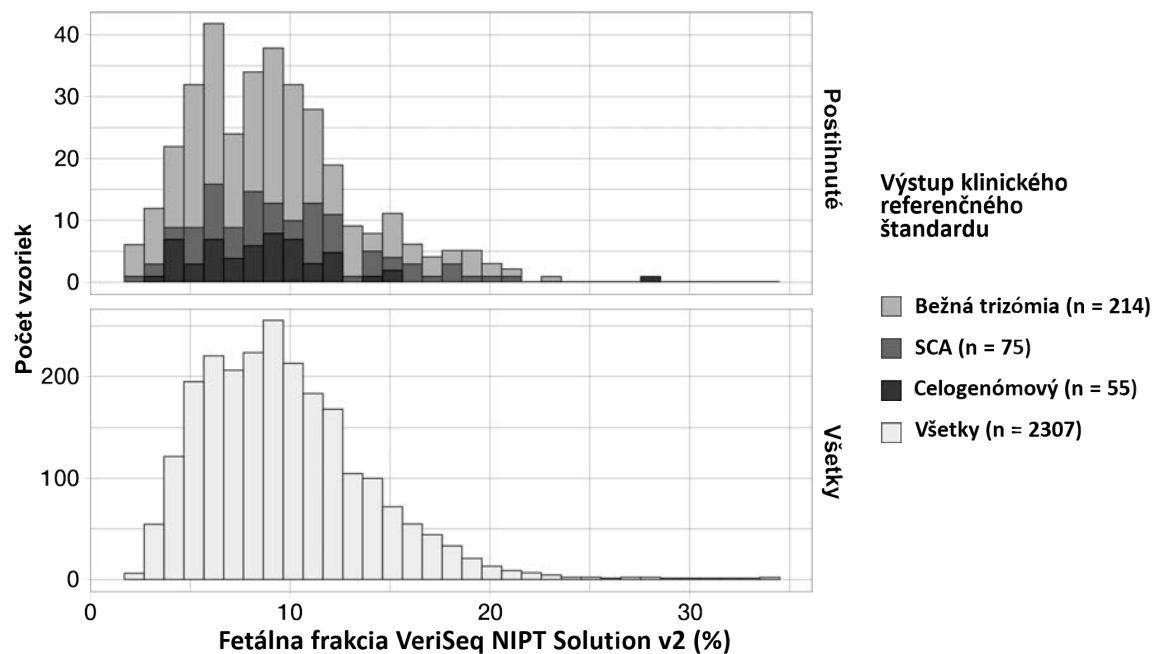
Prevalencia (%)	PPV (%)	NPV (%)
0,01	1,42	> 99,99
0,02	2,81	> 99,99
0,05	6,74	> 99,99

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

## Distribúcia fetálnej frakcie

Distribúcia odhadov fetálnej frakcie testu (FF) VeriSeq NIPT Solution v2 Fetal Fraction z genómového testu s mozaikami je vyobrazená podľa kategórie výsledkov klinického referenčného štandardu na [Obrázok 1](#).

Obrázok 1 Distribúcia fetálnej frakcie



5 vzoriek vykazovalo anomálie v rôznych kategóriách.

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

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

Celkový rozsah odhadov FF dosahoval hodnoty od 2 % do 34 % s mediánovou hodnotou 9 % a interkvartilovým (IQ) rozsahom 6 % až 12 %. Mediánový odhad FF bežných trizómií a udalostí detegovaných celogenómovým skríningom je 8 % a v prípade SCA táto hodnota dosahuje 9 %. Rozsah odhadov FF bol konzistentný pre všetky výstupy. Nedošlo k výraznejšiemu posunu distribúcie FF v rámci bežných trizómií, SCA, udalostí detegovaných celogenómovým skríningom ani všetkých vzoriek v celogenómovej analýze.

## Dosiahnuté výsledky pri tehotenstvách s dvojčiat

### Schopnosť odhadu trizómie chromozómu 13, 18 a 21 a chromozómu Y v prípade tehotenstiev s dvoma plodmi

V dôsledku nízkej prevalencie trizómie chromozómu 21, 18 a 13 v rámci tehotenstiev s dvoma plodmi bol iba nízky počet vzoriek tehotenstiev s dvoma plodmi dostupný na zaradenie do klinickej štúdie. Na odhadnutie účinnosti testu VeriSeq NIPT Solution v2 v prípade tehotenstiev s dvoma plodmi sa použili modely *in silico* na základe pozorovaní z klinických vzoriek na simuláciu populácií tehotenstiev s dvoma plodmi. Simulácia bola konzistentná s cieľovou populáciou použitia. Distribúcia fetálnej frakcie bola stanovená z približne 4500 vzoriek dvoch plodov a porovnaná s distribúciou z približne 120 000 vzoriek tehotenstiev s jedným plodom. Distribúcia fetálnej frakcie, podmienená stavom aneuploidie, bola stanovená z analýz vzoriek z tehotenstiev s jedným plodom (1044 – trizómia 21, 307 – trizómia 18 a 192 – trizómia 13). Kombinácia uvedených dvoch distribúcií umožňovala dedukovať detekciu aneuploidie u dvojčiat. Boli simulované množiny dizygotných a monozygotných dvojčiat a vytvoril sa vážený priemer reprezentujúci ich prevalenciu v cieľovej použitej populácii (2 dizygotné : 1 monozygotné) na určenie odhadu citlivosti. Na stanovenie špecificity boli simulované skupiny nepostihnutých dvojčiat.

Frakcia každej simulovanej vzorky postihnutej trizómiou (t. j. postihnutá frakcia) bola počítaná odlišne pre každú kategóriu vzorky:

- V prípade monozygotných dvojčiat bola postihnutá časť každej vzorky nastavená na hodnotu 1,0, pretože v tomto prípade trizómia postihuje obidve dvojčatá.
- V prípade dizygotných dvojčiat sa predpokladalo postihnutie iba jedného dvojčaťa (postihnutie obidvoch dizygotných dvojčiat je extrémne zriedkavé). Hodnoty postihnutej frakcie boli simulované použitím známej distribúcie pomerov fetálnej frakcie podľa určenia z klinických vzoriek pohlavne odlišných dvojčiat. Bol použitý konzervatívny prístup, v rámci ktorého sa predpokladalo, že postihnuté dvojča vždy spomedzi obidvoch dvojčiat vykazuje najmenšiu fetálnu frakciu. Bol použitý korekčný faktor na fetálnej frakcie s priemernou hodnotou nižšou v tehotenstvách s trizómiou 13 a 18.
- V prípade nepostihnutých dvojčiat bola postihnutá časť každej vzorky nastavená na hodnotu nula.

V prípade dvojčiat postihnutých trizómiou 18 alebo 13 bola fetálna frakcia korešpondujúca s postihnutou frakciou vzorky redukovaná. Toto zmenšenie bolo proporcionálne s priemernou redukciou fetálnej frakcie pozorovanou v klinických údajoch v rámci vzoriek trizómie 18 alebo 13 (jeden plod) v porovnaní s euploidnými jednoplodými tehotenstvami.

Celková fetálna frakcia a postihnutá frakcia každej simulovanej vzorky sa následne použili na výpočet skóre aneuploidie použitím štandardného algoritmu VeriSeq NIPT Solution v2. Citlivosť bola počítaná formou stanovenia toho, ako časti dosahovali skóre aneuploidie simulovaných postihnutých dvojčiat hodnoty vyššie, než stanovená hraničná hodnota aneuploidie. Podobne aj špecificita bola počítaná formou stanovenia toho, ako časti dosahovali skóre aneuploidie simulovaných nepostihnutých dvojčiat hodnoty nižšie, než stanovená

hraničná hodnota aneuploidie (Tabuľka 18). 95 % intervaly spoľahlivosti boli odhadnuté na základe počtu skutočných klinických vzoriek dvojčiat v pôvodnom súbore údajov, ktoré boli klasifikované ako postihnuté alebo nepostihnuté relevantnou trizómiou.

Na odhadnutie chromozomálnej citlivosti Y vo vzorkách dvojčiat boli simulované skupiny dvojčiat XY/XY a XX/XY. Bol vytvorený vážený priemer vyjadrujúci ich prevalenciu v cieľovej populácii použitia (1 XY/XY : 1 XX/XY). Na odhadnutie chromozomálnej špecificity Y u dvojčiat bola simulovaná skupina dvojčiat XX/XX. Boli simulované hodnoty celkovej fetálnej frakcie podľa známej distribúcie fetálnej frakcie v klinických vzorkách dvojčiat.

V prípade dvojčiat XY/XY a XX/XY boli odhadnuté skóre príslušného chromozómu Y pomocou známeho vzťahu medzi fetálnou frakciou a skóre chromozómu Y v rámci klinických vzoriek jedného plodu klasifikovaného ako plodu mužského pohlavia. Pokiaľ ide iba o dvojčatá XX/XY, hodnoty ovplyvnenej fetálnej frakcie (u mužského pohlavia) boli simulované použitím známej distribúcie pomerov fetálnych frakcií, ktoré boli pozorované medzi dvojčatami z rovnakého tehotenstva, a podľa určenia z klinických vzoriek dvojčiat s nezhodným pohlavím. Bol využitý konzervatívny prístup, v rámci ktorého bola postihnutá frakcia vybratá tak, aby korešpondovala s menším z dvojčiat. V rámci každej simulovanej vzorky XX/XY bolo skóre chromozómu Y vynásobené postihnutou frakciou.

V prípade dvojčiat XX/XX boli skóre chromozómu Y získané zo skóre pozorovaných v klinických vzorkách jedného plodu, ktorý bol klasifikovaný ako plod ženského pohlavia. Skóre chromozómu Y a celková fetálna frakcia boli následne použité na klasifikáciu každej simulovanej vzorky ako vzorka s prítomnosťou alebo neprítomnosťou chromozómu Y pomocou štandardného algoritmu VeriSeq NIPT Solution v2.

Citlivosť bola vypočítaná formou stanovenia frekvencie správneho stanovenia simulovaných dvojčiat XY/XY alebo XX/XY ako vzoriek s prítomným chromozómom Y. Špecificita bola vypočítaná formou stanovenia frekvencie správneho stanovenia simulovaných dvojčiat XY/XY ako vzoriek s neprítomným chromozómom Y. 95 % intervaly spoľahlivosti boli odhadnuté na základe počtu skutočných klinických vzoriek dvojčiat v pôvodnom súbore údajov, ktoré boli klasifikované ako vzorky s prítomnosťou alebo neprítomnosťou chromozómu Y.

Tabuľka 18 Odhady trizómie 21, 18 a 13 v simulovanej populácii tehotenstiev s dvoma plodmi

	Trizómia 21	Trizómia 18	Trizómia 13	Prítomnosť Y
Citlivosť	96,4 %	95,7 %	93,6 %	> 99,9 %
2-stranný 95 % interval spoľahlivosti (CI)	(86,4 %, > 98,9 %)	(68,3 %, > 99,4 %)	(64,1 %, > 98,9 %)	(99,9 %, > 99,9 %)
Špecificita	99,9 %	> 99,9 %	> 99,9 %	> 99,9 %
2-stranný 95 % interval spoľahlivosti (CI)	(99,8 %, > 99,9 %)	(99,9 %, > 99,9 %)	(99,9 %, > 99,9 %)	(99,7 %, > 99,9 %)

Tabuľka 18 obsahuje bodové odhady a odhadované 95 % intervaly spoľahlivosti pre citlivosť a špecificitu testu VeriSeq NIPT Solution v2 pri detekcii trizómie 21, 18, 13 a prítomnosti Y v simulovanej populácii tehotenstiev s dvoma plodmi konzistentnej s cieľovou populáciou určenia. Intervaly spoľahlivosti boli odhadnuté na základe počtu klinických vzoriek dvojčiat s úspešným absolvovaním QC, ktoré boli klasifikované ako postihnuté alebo

nepostihnuté relevantnou trizómiou. Výpočet citlivosti predpokladá, že dve tretiny postihnutých tehotenstiev s dvoma plodmi sú dizygotné s jedným postihnutým dvojčaťom a jedna tretina postihnutých tehotenstiev s dvoma plodmi je monozygotná s postihnutím oboch dvojčiat.

Odhady uvádzané v [Tabuľka 18](#) sa vzťahujú iba na tehotenstvá s dvoma plodmi. V dôsledku ešte nižšej prevalencie boli údaje týkajúce sa tehotenstiev vyššieho rádu (trojčatá alebo viac plodov) nedostatočné na stanovenie vhodných štatistických modelov na odhad presnosti detekcie aneuploidie.

## Analytická účinnosť

### Presnosť merania

Na hodnotenie a kvantifikáciu presnosti analýzy sa uskutočnila opakovaná analýza údajov pomocou analytického softvéru VeriSeq NIPT Solution v2 Analysis Pipeline z dvoch prechádzajúcich štúdií využitím testu VeriSeq NIPT Solution:

- Štúdia reprodukovateľnosti na viacerých pracoviskách, ktorá sa skladala z troch chodov realizovaných troma operátormi na troch pracoviskách použitím jednej šarže reagentie, t. j. celkom deväť chodov.
- Štúdia presnosti v rámci laboratória, ktorá sa skladala z 12 chodov na jednom pracovisku použitím dvoch prístrojov ML STAR, dvoch systémov sekvenčných prístrojov a troch šarží reagentií na sekvenovanie.

Cieľom štúdie presnosti bolo kvantifikovať presnosť analýzy vzhľadom na trizómiu 21 (T21) a chromozóm Y a odhadnúť variabilitu medzi rôznymi prístrojmi, súpravami na prípravu knižnice a šaržami reagentií na sekvenovanie.

Vytvorila sa skupina T21 5 % fetálnej frakcie formou kombinácie cfDNA extrahovanej z materskej plazmy od tehotných žien (s plodom postihnutým T21) a cfDNA extrahovanej z plazmy netehotných žien. Taktiež sa vytvorila skupina 10 % materskej fetálnej frakcie (plod XY, mužské pohlavie) cfDNA. Panel vzoriek pre každú štúdiu a každý chod zahŕňal 4 replík 5 % fetálnej frakcie skupiny vzoriek s postihnutím T21 a 20 replík 10 % materskej fetálnej frakcie poolu cfDNA. Testovanie sa uskutočňovalo 10 dní s celkom 21 chodmi v rámci dvoch kombinovaných štúdií.

T21 a prítomnosť chromozómu Y boli vybraté na hodnotenie na základe reprezentatívnosti klinických podmienok a komplexnosti detekcie anomálií. Veľkosť chromozómu 21, ktorý je najmenším ľudským autozómom, má priamy vplyv na citlivosť detekcie T21, a to najmä v prípade nízkych hodnôt fetálnej frakcie (napríklad takých, aké boli použité v tejto štúdii). Chromozóm Y, ktorý je prítomný v materskej plazme, je pôvodom výlučne fetálny, čo znamená, že analytická detekcia je teda jednoduchšia.

Pozorovaná stredná hodnota a štandardné odchýlky skóre LLR chromozómu 21 a normalizované chromozomálne hodnoty chromozómu Y (NCV) dokazujú, že štandardná odchýlka repliky (SD) bola najväčším zdrojom variability. Odchýlky medzi pracoviskami, prístrojmi a šaržami reagentie nepatrne zvýšili hodnotu variability (pozri rozdiel medzi celkovou SD a SD repliky, ktorý uvádza [Tabuľka 19](#) a [Tabuľka 20](#)).

Tabuľka 19 Súhrn štandardnej odchýlky (SD) reakcie na sekvenovanie na viacerých pracoviskách (reprodukovateľnosť)

Reakcia	N	Stredná hodnota	SD repliky	Celkové SD reprodukovateľnosti*
Skóre LLR chromozómu 21	36	34,43	11,36	11,36
Chromozóm Y – NCV	180	190,56	7,96	10,20

\* Hodnota celkom zahŕňa variabilitu spôsobenú pracoviskom, operátorom, chodom, dňom a replikou.

Tabuľka 20 Súhrn presnosti reakcie na sekvenovanie v rámci laboratória

Reakcia	N	Stredná hodnota	SD repliky	Celkové SD v rámci laboratória*
Skóre LLR chromozómu 21	48	36,01	9,07	10,25
Chromozóm Y – NCV	240	198,68	7,63	7,82

\* Hodnota celkom zahŕňa variabilitu spôsobenú sekvenačným prístrojom, šaržou reagencie, operátorom, chodom, dňom a replikou.

Ukutočnila sa ďalšia štúdia zameraná na porovnanie presnosti sekvenovania systémom VeriSeq NIPT Solution v2 (celková štandardná odchýlka) použitím prietokového článku 2.0 v porovnaní s verziou 2.5. Štúdia zahŕňala dva typy prietokových článkov (v2.0 a v2.5), tri šarže sekvenačných súprav, štyri prístrojové systémy a dva chody sekvenovania na celkovo 48 chodov na jedinom pracovisku. Jedna skupina sekvenovania bola pripravená z doštičiek cfDNA, ktoré boli manuálne pripravené. Panel vzoriek zahŕňal 4 repliky 5 % fetálnej frakcie skupiny vzoriek s postihnutím T21 a 20 replík 10 % skupiny materskej fetálnej frakcie (plod XY) cfDNA. Výsledky štúdie uvádza [Tabuľka 21](#) a potvrdzujú, že neexistuje žiadny rozdiel v presnosti sekvenovania, keď používate prietokové články v2.0 alebo v2.5.

Tabuľka 21 Súhrn presnosti reakcie na sekvenovanie pomocou prietokového článku v2.0 v porovnaní s prietokovým článkom v2.5

Reakcia	Počet pozorovaní/verzia	v2.0 – celková SD*	v2.5 – celková SD*	Štatistický výsledok**
Skóre LLR chromozómu 21	96	9,56	8,44	Štatisticky ekvivalentné (hodnota p = 0,25)
Chromozóm Y – NCV	480	7,74	7,38	Štatisticky ekvivalentné (hodnota p = 0,38)

\* Hodnota celkom zahŕňa variabilitu spôsobenú sekvenačným prístrojom, šaržou reagencie, chodom, dňom a replikou.

\*\*Na základe testu F zameraného na hodnotenie rovnakosti odchýlok (mocnina štandardných odchýlok)



## Křížová kontaminácia

Křížová kontaminácia bola hodnotená v rámci postupu prípravy vzorky VeriSeq NIPT Solution. Plazmatické skupiny/pooly od netehotných žien (XX) a dospelých mužov (XY) boli testované šachovnicovým spôsobom na doštičke s 96 jamkami (celkom na 4 doštičkách). N = 48 ženských a mužských vzoriek na jednu doštičku, t. j. celkom 192 ženských a 192 mužských vzoriek. Žiadna zo ženských vzoriek nepreukázala pokrytie chromozómu Y, ktoré by bolo štatisticky vyššie než je odhadovaná základná hodnota, čo znamená nulovú křížovú kontamináciu mužskými vzorkami v rámci rovnakej doštičky. V rámci testu VeriSeq NIPT Solution bola pozorovaná nedetegovateľná křížová kontaminácia.

## Potenciálne rušivé látky

Vplyv potenciálne rušivých látok bol v rámci testu VeriSeq NIPT Solution hodnotený formou zhodnotenia účinnosti analýzy za prítomnosti takýchto látok.

Do skupín (pool) plazmy odobratej od neovplyvnených tehotných (plod XX) boli kontrolne pridané bilirubín, hemoglobín a triglyceridy (endogénne). Vykonal sa ich testovanie vo dvoch koncentráciách pre každú testovanú látku (n = 16 pre každú látku). Nebola pozorovaná žiadna interferencia týkajúca sa účinnosti analýzy.

Tabuľka 22 Potenciálne rušivé látky (endogénne)

Testovacia látka	Najnižšia testovaná koncentrácia (mg/ml)	Najvyššia testovaná koncentrácia (mg/ml)
Albumín	35	50
Bilirubín	0,01	0,15
Hemoglobín	100	200
Triglycerid	1,5	5

Prirodzene sa vyskytujúca materská genomická DNA (gDNA) v plazme môže taktiež potenciálne rušiť účinnosť analýzy, keďže ju je možné extrahovať spolu s fetálnou cfDNA. Genomické hladiny DNA na úrovni 1,6, 3,3 a 4,9 ng/vzorka (korešpondujúce s 1, 2 a 3 štandardnými odchýlkami nad strednou očakávanou koncentráciou gDNA po uplynutí 7 dní skladovania celej krvi<sup>12</sup>) boli pridané do cfDNA extrahovanej z materskej plazmy odobratej od neovplyvnených tehotných žien (s plodom XX). Vzorky boli následne testované v rámci testu VeriSeq NIPT (n = 16 pre každú koncentráciu). Za prítomnosti zvýšených hladín gDNA neboli pozorované žiadne rušenia týkajúce sa účinnosti analýzy.

Dvadsať liekových potenciálne interferujúcich látok (exogénnych), ktoré sa bežne používajú alebo predpisujú počas tehotenstva, bolo testovaných podľa pokynov EP7-A2 (Testovanie interferencie v klinickej biochémi; schválené pokyny, druhé vydanie). Uvedených 20 potenciálne interferujúcich látok bolo skombinovaných do štyroch skupín/poolov, pridaných do materskej plazmy odobratej od neovplyvnených tehotných žien (s plodom XX) a testovaných pomocou testu VeriSeq NIPT (n = 16 pre každý pool). Za prítomnosti týchto exogénnych látok neboli pozorované žiadne rušenia týkajúce sa účinnosti analýzy.

Tabuľka 23 Potenciálne rušivé látky (exogénne)

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

## Detekčný limit

Detekčný limit (LOD) je definovaný ako úroveň fetálnej frakcie, ktorá zodpovedá 95 % pravdepodobnosti detekcie stavu záujmu (napríklad T21). Na hodnotenie limitu LOD testu VeriSeq NIPT Solution v2 v rámci rôznych bežných podmienok boli uskutočnené štúdie a štatistické analýzy.

Pravdepodobnosť detekcie stavu záujmu v postihnutej vzorke spracovanej testom VeriSeq NIPT Solution v2 primárne závisí od troch faktorov:

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

Za predpokladu konštantnej hĺbky sekvenovania je danú aberáciu jednoduchšie detegovať vo vzorke s vyšším percentom fetálnej frakcie než vo vzorke s nižším percentom fetálnej frakcie. A naopak – za predpokladu konštantnej fetálnej frakcie je danú aberáciu jednoduchšie detegovať vo vzorke s väčšou hĺbkou sekvenovania než vo vzorke s menšou hĺbkou sekvenovania. Aberácie v menších alebo komplexnejších genomických oblastiach je problematickejšie detegovať v porovnaní s aberáciami vo väčších alebo menej komplexných oblastiach (za predpokladu konštantnej fetálnej frakcie a hĺbky sekvenovania).

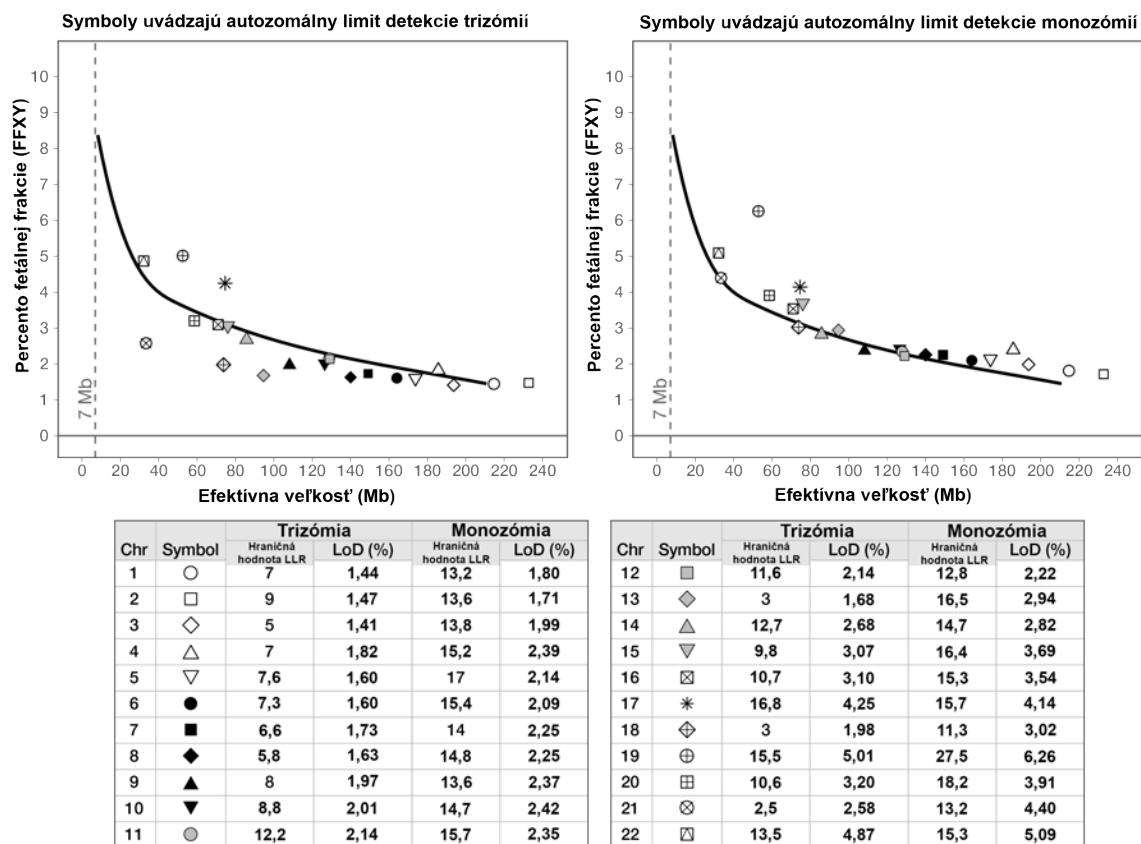
S cieľom určiť limit LOD pre detekciu T21 boli analyzované vzorky obsahujúce zmesi združených vzoriek T21 a združené nepostihnuté vzorky. Dva typy vzoriek určených na analýzu boli zmiešané v rámci titračných sérií na vytvorenie súboru siedmich úrovní fetálnej frakcie (0, 2, 3, 4, 5, 6 a 10 %). Každá úroveň bola zastúpená celkom 10 replikami.

Na ďalšie zvýšenie rozlíšenia mriežky fetálnej frakcie na analýzu LOD boli údaje z tejto štúdie obohatené údajmi získanými z dilúcie in silico. Vplyvy experimentálnej dilúcie a titrácie boli simulované riadeným kombinovaním údajov sekvenovania. Údaje z tejto titrácie in silico pokrývali súbor 14 úrovní fetálnej frakcie (1,25, 1,50, 1,75, 2,00, 2,25, 2,50, 2,75, 3,00, 3,25, 3,50, 3,75, 4,00, 4,25 a 4,50 %) s 32 replikami na každú úroveň. Na výsledné údaje bola použitá analýza ProBit na určenie limitu LOD pre T21.

Nezávisle bol vytvorený štatistický model s využitím fetálnej frakcie, hĺbky sekvenovania a genomickej veľkosti/komplexnosti a slúžil ako pomôcka na predikciu pravdepodobnosti detekcie akejkoľvek aberácie v akejkoľvek vzorke. Tento model bol vytvorený z údajov zodpovedajúcich súboru 1405 vzoriek XY. Bolo zistené, že limit LOD pre T21 podľa predikcií tohto modelu vykazuje súlad s odhadom podľa analýzy ProBit uvedenými vyššie. Na odhadnutie hodnôt LOD týkajúcich sa aneuploidií vo všetkých autozómoch a čiastočných delécií a duplikácií bol použitý štatistický model.

**Obrázok 2** uvádza 95 % pravdepodobnosť detekcie pre priemerné oblasti podľa veľkosti a autozomálne limity detekcie všetkých trizómií a všetkých monozómií.

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



# Riešenie problémov

## Riešenie problémov so systémom VeriSeq NIPT Solution v2

Režim zlyhania	Možný výsledok	Interpretácia	Oporúčaný krok	Komentáre
Nedostatok vstupnej plazmy	Zlyhanie kontroly kvality vzorky	Nedostatočný objem plazmy.	Opakovaný odber	Založené na vizuálnej kontrole objemu plazmy.
Zlyhanie krvnej skúmavky	Krv sa neseparuje do vrstiev	Vzorka nebola odstredená.	Overte, či sa centrifúga spustila a či bola skúmavka odstredená požadovanou rýchlosťou. Znova odoberte vzorku.	
		Nevhodné skladovanie vzorky alebo jej preprava (hemolýza vzorky).	Znova odoberte vzorku.	Zmrazené vzorky sa neseparujú. Nevhodná preprava alebo skladovanie môže viesť k hemolýze vzorky.

Režim zlyhania	Možný výsledok	Interpretácia	Odporúčaný krok	Komentáre
Zrážanie alebo pomalý tok vzorky	Kontaminácia plazmy	Jednotlivé vzorky sa môžu zraziť na doštičke viažúcej NK v prípade, ak došlo k významnej kontaminácii vzorky plazmy.	Skontrolujte vzorku. Ak je zvyšná plazma v skúmavke červená alebo mliečna, vzorku zrušte a vyžiadajte si opakovanie odberu. Ak je vzhľad vzorky normálny, znova vzorku testujte.	
	Pretečenie vzorky	Nedostatočná vizuálna kontrola každej skúmavky z hľadiska vhodnosti vzorky.	Zrušte platnosť všetkých vzoriek v okolitých jamkách ovplyvnených pretečením.	Môže to znamenať aj to, že vzorky boli pred spracovaním nesprávne prepravované alebo skladované. Nevhodné vzorky vylúčte zo spracovania.
	Zlyhanie hardvéru	Nedostatočné trávenie materiálu počas extrakcie.	Vzorku pretestujte. Ak problém pretrváva v mieste jamky s inými vzorkami, obráťte sa na oddelenie technickej podpory spoločnosti Illumina.	

Režim zlyhania	Možný výsledok	Interpretácia	Odporúčaný krok	Komentáre
Zlyhanie kontroly kvality analýzy individuálnej vzorky	Zlyhanie kontroly kvality sekvenovania	<p>Možné príčiny sú tieto:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Nepostačujúci genetický vstup</li> <li>Nesprávny prenos počas manipulácie so vzorkami</li> <li>Zlyhanie sekvenčnej reagentie</li> </ul>	Skontrolujte komentár ku vzorke. Zistite, či u predchádzajúcich vzoriek nebola podobná účinnosť vzhľadom na polohu doštičky. Vzorku pretestujte.	Indikuje nedostatočný vstup vzorky alebo nesprávny prenos v prístroji ML STAR. Nedostatočný genetický materiál môže pochádzať z nedostatočného množstva bezbunkovej DNA v plazme alebo bunkovej DNA, následkom čoho vzniká nadmerná dilúcia vzorky na sekvenovanie.
	Nízka hodnota FF alebo počet nevyfiltrovaných umiestnení (NES)	Na správne vykazovanie nie je generovaný dostatok údajov.	Plazmu pretestujte.	

Režim zlyhania	Možný výsledok	Interpretácia	Odporúčaný krok	Komentáre
Zlyhanie kontroly kvality pri kvantifikácii.	Zlyhanie chodu kvantifikácie. Mediánová hodnota dávky je pod minimálnou hodnotou	Nedostatočná výťažnosť procesu.	Opakujte kvantifikáciu. Ak dôjde opakovane k zlyhaniu, obráťte sa na oddelenie technickej podpory spoločnosti Illumina.	Zlyhanie v oblasti metrik štandardnej krivky indikuje problémy s prípravou knižnice (t. j. používanie etanolu inej než biologickej triedy) alebo problémy s procesom kvantifikácie.
	Zlyhanie chodu kvantifikácie	Zlyhanie štandardnej krivky.	Opakujte kvantifikáciu. Ak dôjde opakovane k zlyhaniu, obráťte sa na oddelenie technickej podpory spoločnosti Illumina.	
Zlyhanie združovania (pooling)	Nepodarilo sa dokončiť združovanie vzoriek	Analýzou združovania sa nepodarilo vypočítať správne objemy skupiny (pool).	Vykonajte opakované hodnotenie cieľovej koncentrácie skupiny (pool). Znova spustite analýzu združovania.	

## VeriSeq NIPT Microlab STAR – riešenie problémov

Krok procesu	Chybový kód	Chybové dialógové okno	Opis	Používateľské riešenie
Vytváranie dávky	EM0044	The Batch ID entered contains forbidden characters (Zadané ID dávky obsahuje zakázané znaky).	Systém VeriSeq NIPT Solution v2 vo všetkých údajových poliach akceptuje iba číslice, písmená, znaky podčiarknutia a pomlčky.	Zmeňte názov dávky a použite názov, ktorý neobsahuje zvláštne znaky.
Vytváranie dávky	EM0051	The Batch ID is greater than 36 characters in length (ID dávky je dlhšie než 36 znakov).	Systém VeriSeq NIPT Solution v2 obmedzuje dĺžku názvov dávok na max. 36 znakov.	Zmeňte názov dávky a použite názov, ktorý je kratší než 36 znakov.



Krok procesu	Chybový kód	Chybové dialógové okno	Opis	Používateľské riešenie
Vytváranie dávky	EM0076	Unable to connect to VeriSeq Onsite Server v2 (Nie je možné pripojiť sa k systému VeriSeq Onsite Server v2)	VeriSeq Onsite Server v2 nereaguje na údajové požiadavky aplikácie Workflow Manager.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Overte, či je zariadenie ML STAR pripojené do siete.</li> <li>2. Overte, či je zariadenie VeriSeq Onsite Server v2 zapnuté.</li> <li>3. Overte, či sa zariadenie ML STAR dokáže pripojiť k serveru VeriSeq Onsite Server v2 (prostredníctvom príkazu ping).</li> <li>4. Skontrolujte vákuovú odpadovú fľašu. Ak je odpadová fľaša plná nad polovicu svojho objemu, vyprázdňte ju.</li> <li>5. Ak predchádzajúce kroky nedokážu vyriešiť daný problém, obráťte sa na oddelenie technickej podpory spoločnosti Illumina.</li> </ol>
Vytváranie dávky	EM0118	This batch has been failed and cannot be further processed (Táto dávka zlyhala a nie je možné ju ďalej spracovať).	Stanovená dávka zlyhala a nie je možné ju ďalej spracovať.	Záznam o dávke v systéme VeriSeq Onsite Server v2 indikuje, že vybratá dávka zlyhala. Nie je povolené žiadne ďalšie spracovanie. Vytvorte ďalšiu dávku s požadovanými vzorkami.
Vytváranie dávky	Nepoužíva sa	This batch has already completed processing. Would you like to repool? (Spracovanie tejto dávky sa už dokončilo. Chcete opakovať združovanie?)	Indikovaná dávka bola spracovaná počas združovania. Jediným povoleným spracovaním je opakovanie združovania.	Tento postup vykonajte podľa nasledujúcich pokynov. <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vyberte položku <b>Re-Pool</b> (Opakovať združovanie).</li> <li>• Pred opakovaným združovaním zrušte metódu a overte správnosť názvu dávky.</li> </ul>

Krok procesu	Chybový kód	Chybové dialógové okno	Opis	Používateľské riešenie
Izolácia plazmy	WP0087	Duplicate sample barcodes loaded (Načítali sa duplicitné čiarové kódy vzorky).	Do systému boli načítané vzorky s identickými čiarovými kódmi.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Postupujte podľa výziev aplikácie Workflow Manager a identifikuje duplicitné vzorky.</li> <li>2. Odstráňte duplikáty a znova ich označte štítkom alebo ich vymeňte.</li> <li>3. Znova vložte vzorky.</li> </ol>
Izolácia plazmy	EP0102	Samples specified in the Sample Sheet were not loaded (Vzorky stanovené v hárku so vzorkami neboli vložené).	Vzorky uvádzané v hárku so vzorkami neboli zahrnuté do načítaných čiarových kódov.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Postupujte podľa výziev aplikácie Workflow Manager a identifikuje chýbajúce vzorky.</li> <li>2. Vykonajte niektorý z nasledujúcich krokov:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pridajte chýbajúce vzorky do dávky a vzorky znova vložte.</li> <li>• Zrušte metódu a podľa potreby upravte hárok so vzorkami. Reštartujte metódu.</li> </ul> </li> </ol>
Vkladanie doštičky	Nepoužíva sa	Venus Barcode Mask Error (Chyba masky čiarového kódu Venus)	Workflow Manager uplatňuje správne priradenie doštičky k dávke pomocou masiek čiarových kódov Venus.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Skontrolujte umiestnenie doštičky a overte správnosť rozloženia doštičky.</li> <li>2. Overte, či je vložená doštička správnou doštičkou z hľadiska indikovanej dávky.</li> </ol>

Krok procesu	Chybový kód	Chybové dialógové okno	Opis	Používateľské riešenie
Extrakcia cfDNA	WE0150	Pressure in the vacuum chamber is too low (Tlak vo vákuovej komore je príliš nízky).	Workflow Manager nebude pokračovať, ak je tlak vo vákuovom vedení < 400 torrov.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Skontrolujte, či vákuové vedenie nie je zalomené ani inak upchané.</li> <li>2. Otvorte svorky odpadového vedenia, počkajte, kým sa tlak nevypustí a potom svorky uzavrite.</li> <li>3. Overte, si je zapnutý regulátor vákua a čerpadlo.</li> <li>4. Ak problém pretrváva, obráťte sa na oddelenie technickej podpory spoločnosti Illumina.</li> </ol>
Extrakcia cfDNA	WE0153	Pressure in the vacuum chamber is too high (Tlak vo vákuovej komore je príliš vysoký).	Ak bude pred reguláciou tlaku nameraný podtlak príliš vysoký, hrozí riziko poruchy systému.	Na zadnej strane riadiacej jednotky overte, či sú všetky vákuové pripojenia a vedenia správne pripojené.

Krok procesu	Chybový kód	Chybové dialógové okno	Opis	Používateľské riešenie
Extrakcia cfDNA	WE0996	Vacuum failed to seal (Nepodarilo sa utesniť vákuum).	Než budete pokračovať, je potrebné odstrániť netesnosť.	<p>Tesnosť overte pred tým, než vyberiete možnosť <b>OK</b>.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Overte, či je väzbová doštička zarovnaná s vákuovým potrubím. Rukou v rukavici riadne zatlačte na väzbovú doštičku.</li> <li>Počúvajte šum vákuu a pozoruje tok vody cez väzbovú doštičku.</li> <li>V aplikácii Workflow Manager otvorte traktografické zobrazenie. Keď bude skutočná hodnota tlaku najmenej o 50 tlakových jednotiek nižšia, než je tlak okolia, stlačením tlačidla <b>OK</b> pokračujte extrakciou cfDNA.</li> <li>Ak sa v rámci priradeného časového intervalu nedosiahne požadovaná hodnota tlaku, vyberte možnosť <b>OK</b> a pokračujte načítaním prvého lyzátu.</li> <li>Po dokončení dávkovania lyzátu na väzbovú doštičku metódu pozastavte. Znova nainštalujte väzbovú doštičku a rukou v rukavici na ňu riadne zatlačte.</li> <li>Ak lyzáť nepretečie doštičkou, obráťte sa na oddelenie technickej podpory spoločnosti Illumina.</li> </ol>

Krok procesu	Chybový kód	Chybové dialógové okno	Opis	Používateľské riešenie
Extrakcia cfDNA	WM0219	If Vacuum is on, manually rest the pump. (Ak je vákuum zapnuté, manuálne vypnite čerpadlo.)	Podtlak môže ostať zapnutý počas prerušenia metódy v priebehu extrakcie.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Na riadiacej jednotke vákua stlačte tlačidlo <b>Power</b> (Napájanie) na vypnutie podtlaku.</li> <li>2. Počkajte 10 sekúnd a potom opätovným stlačením tlačidla <b>Power</b> (Napájanie) zapnite vákuum.</li> </ol>
Extrakcia cfDNA	EE0477	An error has occurred while moving a plate. (iSWAP error) (Počas pohybu doštičky sa vyskytla chyba (chyba iSWAP)).	Ak sa vyskytne chyba iSWAP (pád doštičky, neodobratie doštičky ap.), systém vás vyzve, aby ste presun doštičky vykonali manuálne.	<p>Overte, či je možné doštičku znova použiť (žiadny rozliaty materiál).</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ak nie, chod zrušte.</li> <li>• Ak áno, na dokončenie manuálneho presunu doštičky postupujte podľa zobrazených pokynov.</li> </ul>
Extrakcia cfDNA	EE0519	Scanned barcode does not match Binding Plate barcode on record (Naskenovaný čiarový kód sa nezhoduje s čiarovým kódom väzbovej doštičky v zázname).	Vložená väzbová doštička sa nezhoduje s čiarovým kódom odstránenej doštičky.	Overte, či sa vkladaná doštička zhoduje so zaznamenaným čiarovým kódom (prezrite si denník výpisov a zamerajte sa na očakávaný čiarový kód).

Krok procesu	Chybový kód	Chybové dialógové okno	Opis	Používateľské riešenie
Rozhranie API centra	EA0372	Unable to connect to the data server (Nie je možné pripojiť sa k údajovému serveru).	VeriSeq Onsite Server v2 nereaguje na údajové požiadavky aplikácie Workflow Manager.	<ol style="list-style-type: none"> <li>Overte, či je zariadenie ML STAR pripojené do siete.</li> <li>Overte, či je zariadenie VeriSeq Onsite Server v2 zapnuté.</li> <li>Overte, či sa zariadenie ML STAR dokáže pripojiť k serveru VeriSeq Onsite Server v2 (prostredníctvom príkazu ping).</li> </ol>
	EA0774	Connection Error. The API server connection failed to validate (Chyba pripojenia. Pripojenie k API servera nebolo možné overiť)	VeriSeq Onsite Server v2 prestal reagovať na údajové požiadavky aplikácie Workflow Manager.	Uistite sa, že: <ol style="list-style-type: none"> <li>Overte, či je zariadenie ML STAR pripojené do siete.</li> <li>Overte, či sa zariadenie ML STAR dokáže pripojiť k serveru VeriSeq Onsite Server v2 (prostredníctvom príkazu ping).</li> <li>Overte, či je zariadenie VeriSeq Onsite Server v2 zapnuté.</li> </ol>
	EA0780	403: Invalid Request The current transaction is not valid (403: neplatná požiadavka. Aktuálna transakcia je neplatná).	Odoslané údaje porušujú logiku systémového toku pracovných činností.	Prečítajte si podrobnosti o chybe, kde nájdete ďalšie informácie. Bežné príčiny zahŕňajú vstupy, ktoré sú príliš dlhé alebo porušujú ustanovenia zoznamu povolených znakov.

# Literatúra

1. Nagaoka S, Hassold T, Hunt P. Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nat Rev Genet.* 2012;13(7):493-504. doi:10.1038/nrg3245.
2. Garnder RJ, Sutherland GR, Schaffer LG. *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling.* 4th edition. New York (NY): Oxford University Press; 2012.
3. Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, Ogilvie C, D'Antonio F. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015 Jan;45(1):16-26. doi: 10.1002/uog.14636.
4. American College of Obstetricians and Gynecologists. Screening for fetal aneuploidy. *Practice Bulletin No. 163.* *Obstet Gynecol.* 2016; 127(5):e123-137.
5. Gil MM, Accurti V, Santacruz B, Plana MN, Nicolaides KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2017 Apr 11. doi: 10.1002/uog.17484.
6. Bianchi D, Parker R, Wentworth J et al. DNA Sequencing versus Standard Prenatal Aneuploidy Screening. *N Engl J Med.* 2014;370(9):799-808. doi:10.1056/nejmoa1311037.
7. Benn P, Borrell A, Chiu RW, et al. "Position statement from the Chromosome Abnormality Screening Committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis." *Prenat Diagn* 35 (2015): 725-34.
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. J 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.



## História revízií

Dokument	Dátum	Opis zmeny
Dokument č. 1000000078751 v08	August 2022	Aktualizácia čísla časti pracovného postupu Odstránený pokyn na miešanie pipetou v prípade, že doštička s knižnicami bola zmrazená.
Dokument č. 1000000078751 v07	Máj 2022	Rozdelenie kapitoly Obmedzenia postupu do časti Správy systému VeriSeq NIPT Solution v2 a zahrnutie prvých dvoch odrážok. Ostatný text je v novej hlavičke Obmedzenia analýzy. Odstránené <ul style="list-style-type: none"> <li>• „VeriSeq“ zo všetkých štítkov na reagentiách.</li> <li>• Použitie čiarového kódu doštičky na doštičke adaptéra VeriSeq NIPT Adapter Plate v časti Príprava knižnic.</li> </ul> Pridané <ul style="list-style-type: none"> <li>• Slovo „certifikovaná“ k termínu „voda bez DNáz/RNáz“.</li> <li>• Niektorá z nasledujúcich čítačiek mikrodostičiek alebo ekvivalentné zariadenie, SpectraMax M2, M3, M4, M5 a poznámka.</li> <li>• V časti VeriSeq NIPT Microlab STAR vysvetlenie postupu pri udalosti spracovania chýb.</li> <li>• Poznámka o vizuálnej kontrole jamôk.</li> <li>• Pokyny pre dávky 24 a 48 vzoriek vo všetkých častiach protokolu.</li> <li>• Kroky pri použití fialovej alebo ekvivalentnej doštičky adaptéra.</li> <li>• Doplnenie časti Demografické údaje a charakteristiky tehotenstva výsledkami z prvého trimestra tehotenstva.</li> <li>• Doplnenie špecifikácií doštičky s hlbokými jamkami o odolnosť proti skrúteniu.</li> </ul> Aktualizované

Dokument	Dátum	Opis zmeny
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vysvetlenie jedinečných názvov dávok pre lepšiu prehľadnosť a uvedenie príkladu.</li> <li>• Symboly a formátovanie poznámok, upozornení a varovaní.</li> <li>• Výsledky čiastkových testov.</li> <li>• Guanidín tiokyanát zmenený na guanidín hydrochlorid.</li> <li>• CVS zmenené na BVS (Basic Vacuum System, základná vákuovacia sústava)</li> <li>• Vysvetlenie používania celogenómového vyšetrenia a skóre LLR.</li> <li>• Špecifikácie: Špecifikácie skúmaviek na reagentie, doštičiek s hlbokými jamkami, doštičiek s 384 jamkami, doštičiek s 96 jamkami</li> </ul>
Dokument č. 1000000078751 v06	August 2021	Aktualizovaná adresa autorizovaného zástupcu v EÚ.
Dokument č. 1000000078751 v05	December 2020	<p>Časti Zásady postupu, Varovania a preventívne opatrenia a Označenie produktu boli aktualizované a doplnené ďalšími vysvetleniami s cieľom splniť regulačné požiadavky. Menšie aktualizácie obsahu protokolu, aby zodpovedal aktuálnemu štýlu a usporiadaniu podľa spoločnosti Illumina. V časti Presnosť analytického výkonu bol opravený opis chromozómu 21 z „druhého najmenšieho ľudského autozómu“ na „najmenší ľudský autozóm“.</p> <p>Do častí Príprava na izoláciu plazmy a Interpretácia výsledkov sa pridali vyhlásenia, ktoré sa týkajú nesprávneho používania zásobníkov a rizík zmiešania vzoriek.</p> <p>Pridali sa nové čísla častí servera a softvéru v rámci vydania nového modelu servera a aktualizácií čísel častí softvéru. Do protokolu a informácií o riešení problémov sa pridali upozornenia týkajúce sa riešenia a prevencie pretečenia vzoriek.</p> <p>V časti Štandard kvantifikácie DNA v rámci balenia s príslušenstvom boli aktualizované účinné látky v reagentii, aby boli v súlade s kartami bezpečnostných údajov. Aktualizovali sa konvencie na pomenovanie modulu Local Run Manager VeriSeq NIPT s cieľom konzistentnosti s ostatnou dokumentáciou.</p> <p>Pridala sa história revízií.</p>

Dokument	Dátum	Opis zmeny
Dokument č. 1000000078751 v04	Október 2020	Menšie opravy.
Dokument č. 1000000078751 v03	September 2020	Aktualizoval sa zoznam materiálov, aby obsahoval špecifikácie laboratórneho vybavenia so známymi kompatibilnými možnosťami.
Dokument č. 1000000078751 v02	Február 2020	Aktualizovala sa prezentácia informácií v časti Klinická účinnosť, aby lepšie vystihovala rozdiely medzi základným a celogenómovým typom vyšetrenia. Bola pridaná nová časť Rozdiely v účinnosti základného a celogenómového vyšetrenia. Z časti Zásady postupu boli odstránené rozporuplné informácie o voliteľnosti doplnkovej správy. V celom dokumente boli aktualizované konvencie pomenovania softvéru VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 s cieľom štylistickej konzistentnosti. Aktualizovalo sa označenie adries spoločností Illumina Australia a Illumina Netherlands, aby zodpovedalo nedávnym zmenám.
Dokument č. 1000000078751 v01	August 2019	Odstránil sa duplicitný krok v časti Extrakcia cfDNA, ktorý bol spôsobený chybou publikačného softvéru.
Dokument č. 1000000078751 v00	Máj 2019	Úvodné vydanie.

## Patenty a ochranné známky

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

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

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

SPOLOČNOSŤ ILLUMINA NEPREBERÁ ŽIADNU ZODPOVEDNOSŤ VYPLÝVAJÚCU Z NEBEZPEČNÉHO POUŽITIA TU UVÁDZANÝCH PRODUKTOV (VRÁTANE SÚČASTÍ ALEBO SOFTVÉRU).

© 2022 Illumina, Inc. Všetky práva vyhradené.

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

## Kontaktné informácie



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, California 92122 USA

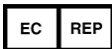
+1 800 809 ILMN (4566)

+1 858 202 4566 (okrem Severnej Ameriky)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com

CE  
2797



Illumina Netherlands B.V.

Steenoven 19

5626 DK Eindhoven

Holandsko

### Austrálsky zadávateľ

Illumina Australia Pty Ltd

Nursing Association Building

Level 3, 535 Elizabeth Street

Melbourne, VIC 3000

Austrália

## Označenie produktu

Úplné informácie o symboloch, ktoré sa nachádzajú na obale a označení produktu, nájdete vo vysvetlivkách symbolov pre vašu súpravu na stránke [support.illumina.com](http://support.illumina.com) na karte *Documentation* (Dokumentácia).

Súhrn informácií o bezpečnosti a výkone (SSP) nájdete na stránke <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> po spustení stránky Eudamed (Európska databáza zdravotníckych zariadení). Zariadenie je označené základným identifikátorom UDI-DI (0081627002NIPTRP).