

Ένθετο συσκευασίας

ΓΙΑ IN VITRO ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ

Προβλεπόμενη χρήση

Το VeriSeq™ NIPT Solution έκδ. 2 είναι μια *in vitro* διαγνωστική εξέταση που προορίζεται για χρήση ως εξέταση ανίχνευσης για την ανίχνευση εμβρυϊκών γενετικών ανωμαλιών σε ολόκληρο το γονιδίωμα από δείγματα μητρικού περιφερικού ολικού αίματος σε έγκυες γυναίκες οι οποίες βρίσκονται τουλάχιστον στη 10η εβδομάδα της κύησης. Το σύστημα VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2 χρησιμοποιεί αλληλούχιση σε ολόκληρο το γονιδίωμα για την ανίχνευση εν μέρει διπλότυπων και απαλοιφών για όλα τα αυτοσώματα και της κατάστασης ανευπλοειδίας για όλα τα χρωμοσώματα. Η εξέταση προσφέρει την επιλογή να ζητηθεί αναφορά της ανευπλοειδίας χρωμοσωμάτων του φύλου (sex chromosome aneuploidy – SCA). Αυτό το προϊόν δεν πρέπει να χρησιμοποιείται ως αποκλειστική βάση για τη διάγνωση ή τη λήψη άλλων αποφάσεων διαχείρισης της εγκυμοσύνης.

Το VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2 περιλαμβάνει τα εξής: το πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασιών VeriSeq NIPT έκδ. 2 για το VeriSeq NIPT Microlab STAR, το VeriSeq NIPT Sample Prep και τον επιτόπιο διακομιστή VeriSeq έκδ. 2 με το λογισμικό προσδιορισμού VeriSeq NIPT έκδ. 2. Το VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2 προορίζεται για χρήση με συσκευή αλληλούχισης επόμενης γενιάς.

Συνοπτική επεξήγηση και παρουσίαση του προσδιορισμού

Οι εμβρυϊκές χρωμοσωμικές ανωμαλίες, και ιδίως η ανευπλοειδία, η οποία είναι ο μη φυσιολογικός αριθμός χρωμοσωμάτων, είναι συνήθης αιτία αναπαραγωγικής αποτυχίας, συγγενών ανωμαλιών, αναπτυξιακής καθυστέρησης και νοητικών αναπηριών. Η ανευπλοειδία επηρεάζει περίπου 1 στις 300 γεννήσεις ζώντων νεογνών, με πολύ υψηλότερα ποσοστά να σχετίζονται με αποβολή και θνησιγενεία.^{1,2} Μέχρι πρόσφατα, υπήρχαν δύο τύποι προγεννητικών εξετάσεων για αυτές τις διαταραχές: η διαγνωστική εξέταση ή η εξέταση ανίχνευσης. Η διαγνωστική εξέταση περιλαμβάνει διαδικασίες όπως η αμνιοκέντηση ή η δειγματοληψία χοριακών λαχνών. Αυτές οι μέθοδοι ελέγχου θεωρούνται ο χρυσός κανόνας για την ανίχνευση εμβρυϊκής ανευπλοειδίας. Ωστόσο, συσχετίζονται με κίνδυνο αποβολής από 0,11% έως 0,22%.³ Οι συμβατικές εξετάσεις ανίχνευσης με πολλαπλούς δείκτες δεν ενέχουν κίνδυνο αποβολής διότι είναι μη επεμβατικές, ωστόσο είναι λιγότερο ακριβείς από τις διαγνωστικές εξετάσεις. Τα ποσοστά ανίχνευσης για την τρισωμία 21 ποικίλλουν από 69–96% ανάλογα με την εκάστοτε εξέταση ανίχνευσης, την ηλικία της μητέρας και την ηλικία κύησης κατά τη διενέργεια της εξέτασης.⁴ Είναι σημαντικό το γεγονός ότι έχουν ψευδώς θετικά ποσοστά περίπου 5%, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε επεμβατικό διαγνωστικό έλεγχο για επιβεβαίωση και, κατά συνέπεια, σε κίνδυνο αποβολής που σχετίζεται με τη διαδικασία.⁴ Οι ανιχνευτικοί έλεγχοι υπερήχων μπορούν επίσης να ανιχνεύσουν χρωμοσωμικές ανωμαλίες, ωστόσο ο βαθμός βεβαιότητας είναι ακόμη πιο χαμηλός απ' ό,τι στις άλλες μεθόδους που αναφέρονται παραπάνω.

Η εμβρυϊκή ανευπλοειδία για τα χρωμοσώματα 21, 18, 13, X και Y μπορεί να ανιχνευτεί με υψηλό βαθμό ακρίβειας με μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο (noninvasive prenatal testing – NIPT) που χρησιμοποιεί αλληλούχιση σε ολόκληρο το γονιδίωμα ελεύθερου κυττάρων DNA (cfDNA) που λαμβάνεται από μητρικό πλάσμα στις 10 εβδομάδες κύησης ή αργότερα. Σε πρόσφατη μετα-ανάλυση πολλαπλών κλινικών μελετών αναφέρθηκε ότι τα σταθμισμένα δεξαμενοποιημένα ποσοστά ανίχνευσης και οι ειδικότητες για την τρισωμία 21 και την τρισωμία 18 σε μονήρεις κυήσεις έχουν ως εξής: τρισωμία 21 99,7% και 99,96% και τρισωμία 18 97,9% και 99,96%, αντίστοιχα.⁵ Μία μελέτη υποδεικνύει ότι η χρήση του NIPT ως πρωτεύουσας εξέτασης ανίχνευσης σε όλες τις κυήσεις θα μπορούσε να οδηγήσει σε μείωση κατά 89% του αριθμού επιβεβαιωτικών επεμβατικών διαδικασιών.⁶

Δεδομένης της σημαντικής μείωσης των ψευδώς θετικών ποσοστών με NIPT σε σύγκριση με τις συμβατικές εξετάσεις ανίχνευσης με πολλαπλούς δείκτες, πολλοί επαγγελματικοί ιατρικοί οργανισμοί έχουν εκδώσει γνωμοδοτήσεις υπέρ διαφόρων ενδείξεων χρήσης του NIPT.

Πιο συγκεκριμένα, η Διεθνής Εταιρεία για την Προγεννητική Διάγνωση, το Αμερικανικό Κολέγιο Μαιευτήρων και Γυναικολόγων (American College of Obstetricians and Gynecologists – ACOG) / η Εταιρεία Εμβρυομητρικής Ιατρικής (Society for Maternal Fetal Medicine – SMFM), το Αμερικανικό Κολέγιο Ιατρικής Γενετικής και Γενωμικής (American College of Medical Genetics and Genomics – ACMG) και η Ευρωπαϊκή Εταιρεία Γενετικής Ανθρώπου / Αμερικανική Εταιρεία Γενετικής Ανθρώπου συνιστούν τη διενέργεια NIPT σε όλες τις έγκυες γυναίκες.^{7,8,9} Η παροχή συμβουλών πριν από τη διενέργεια της εξέτασης, η παροχή συναίνεσης κατόπιν ενημέρωσης και η διενέργεια διαγνωστικού ελέγχου για την επιβεβαίωση θετικού αποτελέσματος εξέτασης ανίχνευσης cfDNA συνιστώνται.⁴

Το VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2 είναι μια μη επεμβατική in vitro διαγνωστική (IVD) εξέταση που χρησιμοποιεί αλληλούχιση σε ολόκληρο το γονιδίωμα τμημάτων cfDNA από δείγματα μητρικού περιφερικού ολικού αίματος από έγκυες γυναίκες που έχουν συμπληρώσει τουλάχιστον 10 εβδομάδες κύησης. Η εξέταση προσφέρει δύο επιλογές για τους τύπους εξέτασης ανίχνευσης: τη βασική εξέταση ανίχνευσης και την εξέταση ανίχνευσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα. Η βασική εξέταση ανίχνευσης παρέχει πληροφορίες σχετικά με την κατάσταση ανευπλοειδίας μόνο των χρωμοσωμάτων 21, 18, 13, X και Y. Η εξέταση ανίχνευσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα παρέχει πληροφορίες σχετικά με εν μέρει διπλότυπα και απαλοιφές για όλα τα αυτοσώματα και την κατάσταση ανευπλοειδίας για όλα τα χρωμοσώματα. Και οι δύο τύποι εξέτασης ανίχνευσης παρέχουν την επιλογή για αναφορά ανευπλοειδίας των χρωμοσωμάτων του φύλου (SCA) με ή χωρίς αναφορά του φύλου του εμβρύου. Η επιλογή αναφοράς για SCA μπορεί να απενεργοποιηθεί. Εάν η επιλογή αναφοράς για SCA είναι απενεργοποιημένη, το φύλο του εμβρύου δεν αναφέρεται. Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τις επιλογές αναφοράς φύλου, ανατρέξτε στον *Οδηγό λογισμικού VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2 (αρ. εγγράφου 1000000067940)*.

Αρχές της διαδικασίας

Το VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2 είναι μια αυτοματοποιημένη λύση για εργαστηριακό έλεγχο NIPT, η οποία αποτελείται από αυτοματοποιημένη παρασκευή δειγμάτων και ανάλυση δεδομένων αλληλούχισης. Τα VeriSeq NIPT Sample Prep είναι εξειδικευμένα αντιδραστήρια μίας χρήσης που χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με το VeriSeq NIPT Microlab STAR για την προετοιμασία παρτίδων 24, 48 ή 96 δειγμάτων για

αλληλούχιση επόμενης γενιάς. Τα δεδομένα αλληλούχισης συζευγμένων άκρων σε ολόκληρο το γονιδίωμα αναλύονται από εξειδικευμένο λογισμικό, το λογισμικό προσδιορισμού VeriSeq NIPT έκδ. 2, και δημιουργείται μια αναφορά η οποία παρέχει ποιοτικά αποτελέσματα.

Η ροή εργασιών αποτελείται από τις ακόλουθες διαδικασίες: συλλογή δείγματος, απομόνωση πλάσματος, εξαγωγή cfDNA, προετοιμασία βιβλιοθηκών, ποσοτικός προσδιορισμός βιβλιοθηκών, δεξαμενοποίηση βιβλιοθηκών, αλληλούχιση και ανάλυση, οι οποίες περιγράφονται πιο λεπτομερώς:

- **Συλλογή δείγματος** —7–10 ml μητρικού περιφερικού ολικού αίματος συλλέγονται σε σωλήνα συλλογής αίματος (BCT) ελεύθερου κυττάρων DNA της Streck, με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η κυτταρική λύση και η γονιδιωματική μόλυνση και να σταθεροποιείται το ολικό αίμα.
- **Απομόνωση πλάσματος** —Εντός 5 ημερών από τη συλλογή, το πλάσμα απομονώνεται από το μητρικό περιφερικό ολικό αίμα με τη χρήση τυπικών τεχνικών φυγοκέντρησης. Το VeriSeq NIPT MicroLab STAR αναρροφά και διανέμει το πλάσμα σε μια πλάκα βοθρίων μεγάλου βάθους με 96 βοθρία για επακόλουθη αλληλούχιση. Σε περίπτωση που απαιτείται επανεξέταση, τα δείγματα μετά την επεξεργασία μπορούν να επαναπαρωματιστούν και να αποθηκευτούν στους 4 °C για 5 επιπλέον ημέρες (συνολικά έως και 10 ημέρες μετά τη συλλογή αίματος).

**ΠΡΟΣΟΧΗ**

Η υπέρβαση των προαναφερθέντων χρόνων αποθήκευσης μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τα ποσοστά αποτυχίας μεμονωμένων δειγμάτων.

- **Εξαγωγή cfDNA**—Ο καθαρισμός του cfDNA από το πλάσμα επιτυγχάνεται με προσρόφηση πάνω σε μια πλάκα δέσμευσης, έκπλυση της πλάκας δέσμευσης για την αφαίρεση των ρύπων και έκλυση.
- **Προετοιμασία βιβλιοθήκης**—Τα καθαρισμένα τμήματα cfDNA υποβάλλονται σε διαδικασία επιδιόρθωσης άκρων για τη μετατροπή των προεξοχών 5' και 3' σε αμβλέα άκρα. Στη συνέχεια, ένα νουκλεοτίδιο δεοξυαδενοσίνης προστίθεται στα άκρα 3' για να δημιουργηθεί μια προεξοχή ενιαίας βάσης. Προσαρμογείς ευρετηρίου που περιέχουν μια προεξοχή δεοξυθυμιδίνης 3' ενιαίας βάσης απολινώνονται στα επεξεργασμένα τμήματα cfDNA. Το απολινωμένο DNA καθαρίζεται με τη χρήση σφαιριδίων αντίστροφης ακινητοποίησης στερεάς φάσης. Κάθε δείγμα σε ένα σύνολο 24, 48 ή 96 λαμβάνει έναν μοναδικό προσαρμογέα ευρετηρίου. Οι προσαρμογείς εξυπηρετούν 2 σκοπούς:

**ΠΡΟΣΟΧΗ**

Δίνετε ιδιαίτερη προσοχή ώστε να αποφεύγετε διασταυρούμενη μόλυνση των ευρετηρίων που θα μπορούσε να οδηγήσει σε εσφαλμένα αποτελέσματα.

- Τα ευρετήρια επιτρέπουν την ταυτοποίηση των δειγμάτων στην επακόλουθη αλληλούχιση.
 - Οι προσαρμογείς ευρετηρίου περιέχουν αλληλουχίες που επιτρέπουν τη σύλληψη της βιβλιοθήκης στη στερεά επιφάνεια μιας κυψελίδας ροής αλληλούχισης για δημιουργία συστάδας και επακόλουθη αλληλούχιση.
- **Ποσοτικός προσδιορισμός**—Το προϊόν βιβλιοθήκης προσδιορίζεται ποσοτικά με τη χρήση φθορίζουσας χρωστικής με συγκέντρωση που καθορίζεται βάσει σύγκρισης με μια πρότυπη καμπύλη DNA.

- **Δεξαμενοποίηση και αλληλούχιση βιβλιοθηκών**—Οι βιβλιοθήκες του δείγματος δεξαμενοποιούνται σε δεξαμενές 24 ή 48 δειγμάτων σε προσαρμοσμένες ποσότητες για την ελαχιστοποίηση της απόκλισης στην κάλυψη. Κάθε δεξαμενή υποβάλλεται στη συνέχεια σε αλληλούχιση με τη χρήση οργάνου αλληλούχισης επόμενης γενιάς.
- Το VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2 δεν περιλαμβάνει εξοπλισμό αλληλούχισης και αναλώσιμα.
- **Ανάλυση**—Για κάθε δείγμα, η ανάλυση περιλαμβάνει τα εξής:
 - Προσδιορισμός των τμημάτων βιβλιοθήκης ανά αλληλουχία ευρετηρίου και ευθυγράμμιση των αναγνώσεων συζευγμένων άκρων σε ένα ανθρώπινο γονιδίωμα αναφοράς.
 - Εκτίμηση του εμβρυϊκού κλάσματος της βιβλιοθήκης μέσω συνδυασμού πληροφοριών από την κατανομή τόσο των μηκών και όσο και των γονιδιωματικών συντεταγμένων των τμημάτων βιβλιοθήκης.
 - Αφού ληφθούν υπόψη οι γνωστές προκαταλήψεις, ένα στατιστικό μοντέλο ανιχνεύει περιοχές του γονιδιώματος οι οποίες υποεκπροσωπούνται ή υπερεκπροσωπούνται στη βιβλιοθήκη κατά τρόπο που συνάδει με ανωμαλία στο εκτιμώμενο επίπεδο εμβρυϊκού κλάσματος.
 - Η αναφορά NIPT παρέχει συνοπτικά αποτελέσματα για το επιλεγμένο μενού της εξέτασης όπου το αποτέλεσμα «ANOMALY DETECTED» (Ανιχνεύτηκε ανωμαλία) ή «NO ANOMALY DETECTED» (Δεν ανιχνεύτηκε ανωμαλία) παρατίθεται μαζί με την εκτίμηση εμβρυϊκού κλάσματος για τα δείγματα που ολοκλήρωσαν επιτυχώς τον ποιοτικό έλεγχο.
 - Η συμπληρωματική αναφορά παρέχει ποσοτικές μετρήσεις οι οποίες χαρακτηρίζουν κάθε ανιχνευθείσα ανωμαλία.

Περιορισμοί της διαδικασίας

Περιορισμοί του προσδιορισμού

- Τα στοιχεία που υποστηρίζουν την ευαισθησία και την ειδικότητα για την εξέταση καλύπτουν τις μονήρεις και τις δίδυμες κυήσεις. Οι παρούσες οδηγίες χρήσης δεν παρέχουν δεδομένα ευαισθησίας ή ειδικότητας για τρίδυμες κυήσεις ή κυήσεις περισσότερων εμβρύων.
- Το σύστημα VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2 δεν προορίζεται για την ανίχνευση πολυπλοειδίας, όπως τριπλοειδίας.
- Το σύστημα VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2 δεν προορίζεται για την ανίχνευση ισορροπημένων χρωμοσωμικών μετατοπίσεων.
- Ο προσδιορισμός απαιτεί δείγματα μητρικού περιφερικού ολικού αίματος από έγκυο γυναίκα που έχει συμπληρώσει τουλάχιστον 10 εβδομάδες κύησης.
- Για τις βασικές εξετάσεις ανίχνευσης, η εξέταση με το σύστημα VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2 ελέγχει ειδικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Τα αποτελέσματα που αναφέρονται ως «NO ANOMALY DETECTED» (Δεν ανιχνεύτηκε ανωμαλία) δεν εξαλείφουν την πιθανότητα χρωμοσωμικών ανωμαλιών των

ελεγχόμενων χρωμοσωμάτων. Ένα αρνητικό αποτέλεσμα δεν εξαλείφει την πιθανότητα η κύηση να παρουσιάζει άλλες χρωμοσωμικές ανωμαλίες, γενετικές παθήσεις ή συγγενείς διαμαρτίες (π.χ. ανοικτή βλάβη του νευρικού σωλήνα).

- Για τις εξετάσεις ανίχνευσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα, οι μεγάλες απαλοιφές και τα διπλότυπα με μέγεθος μικρότερο του 75% του μεγέθους του χρωμοσώματος μπορεί να είναι ενδεικτικές ολικής χρωμοσωμικής ανευπλοειδίας.
- Για τις εξετάσεις ανίχνευσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα, ορισμένες περιοχές αποκλείονται από την ανάλυση. Κατάλογος αυτών των αποκλειόμενων περιοχών υπάρχει διαθέσιμος στον ιστότοπο υποστήριξης της Illumina. Η ανίχνευση γονιδιωματικών ανωμαλιών εκτελείται μόνο σε μη αποκλειόμενες περιοχές.
- Η αναφορά του φύλου του εμβρύου δεν είναι διαθέσιμη σε όλες τις περιοχές λόγω τοπικών κανονισμών που διέπουν την αναφορά του γένους.
- Βάσει των στοιχείων της βιβλιογραφίας, τα αποτελέσματα ελέγχου βάσει ελεύθερου κυττάρων DNA μπορούν να μπερδευτούν από ορισμένους μητρικούς και εμβρυϊκούς παράγοντες. Κάποιοι από αυτούς παρατίθενται παρακάτω, αλλά ο κατάλογος δεν είναι εξαντλητικός:
 - Πρόσφατη μετάγγιση αίματος στη μητέρα
 - Προηγούμενη μεταμόσχευση οργάνου/μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων στη μητέρα
 - Αυτοάνοση νόσος της μητέρας
 - Νεοπλασμάτα (καλοήθη και κακοήθη) της μητέρας
 - Μωσαϊκισμός της μητέρας
 - Παραλλαγές αριθμού αντιγράφων της μητέρας
 - Εμβρυοπλακουντικός μωσαϊκισμός/εντοπισμένος μωσαϊκισμός πλακούντα
 - Θάνατος εμβρύου/εξάλειψη διδύμου

Αναφορά VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2

- Το VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2 είναι μια εξέταση ανίχνευσης και δεν θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ξεχωριστά από άλλα κλινικά ευρήματα και αποτελέσματα εξετάσεων. Τα συμπεράσματα σχετικά με την κατάσταση του εμβρύου και οι αποφάσεις για τη διαχείριση της κύησης δεν θα πρέπει να βασίζονται μόνο στα αποτελέσματα της εξέτασης ανίχνευσης NIPT.⁷
- Το VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2 παρέχει πληροφορίες σχετικά με τα εξής:
 - Η βασική εξέταση ανίχνευσης εξετάζει την υπερεκπροσώπηση των χρωμοσωμάτων 13, 18 και 21.
 - Η εξέταση ανίχνευσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα εξετάζει την υποεκπροσώπηση και την υπερεκπροσώπηση όλων των αυτοσωμάτων, συμπεριλαμβανομένων των εν μέρει απαλοιφών και διπλότυπων μήκους τουλάχιστον 7 Mb.
 - Σε μονήρεις κυήσεις όπου έχει επιλεγεί «Ναι» ή «SCA» ως επιλογή αναφοράς φύλου, τις εξής ανωμαλίες χρωμοσωμάτων του φύλου: XO, XXX, XXY και XYY.

- Σε μονήρεις κυήσεις όπου έχει επιλεγεί «Ναι» ως επιλογή αναφοράς φύλου, αναφέρεται το φύλο του εμβρύου.
- Την παρουσία χρωμοσώματος Y σε δίδυμες κυήσεις.

Εξαρτήματα προϊόντος

Το VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2 (αρ. είδους 20030577) περιλαμβάνει τις παρακάτω προετοιμασίες δείγματος:

- VeriSeq NIPT Sample Prep (24 δείγματα) (αρ. είδους 20025895)
- VeriSeq NIPT Sample Prep (48 δείγματα) (αρ. είδους 15066801)
- VeriSeq NIPT Sample Prep (96 δείγματα) (αρ. είδους 15066802)

Το VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2 (αρ. είδους 20030577) αποτελείται από τα παρακάτω στοιχεία λογισμικού:

- Λογισμικό προσδιορισμού VeriSeq NIPT έκδ. 2 (αρ. είδους 20047024), προεγκατεστημένο στον επιτόπιο διακομιστή VeriSeq έκδ. 2.
 - Επιτόπιος διακομιστής VeriSeq έκδ. 2 (αρ. είδους 20028403 ή 20047000) ή υφιστάμενος επιτόπιος διακομιστής VeriSeq (αρ. είδους 15076164 ή 20016240) που έχει αναβαθμιστεί στην έκδ. 2.
- Πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασιών VeriSeq NIPT έκδ. 2 (αρ. είδους 20044988), προεγκατεστημένο στο VeriSeq NIPT Microlab STAR.
 - VeriSeq NIPT Microlab STAR (αρ. είδους Hamilton Company Reno: 95475-01 (115 V) και 95475-02 (230 V), Hamilton Company Bonaduz: 806288).
- Μονάδα Local Run Manager VeriSeq NIPT (αρ. είδους 20044989).

Αντιδραστήρια

Παρεχόμενα αντιδραστήρια

Η Illumina παρέχει τα παρακάτω αντιδραστήρια: VeriSeq NIPT Sample Prep (24 δείγματα) (αρ. είδους 20025895), VeriSeq NIPT Sample Prep (48 δείγματα) (αρ. είδους 15066801) και VeriSeq NIPT Sample Prep (96 δείγματα) (αρ. είδους 15066802). Τα VeriSeq NIPT Sample Prep έχουν διαμορφωθεί για χρήση με το VeriSeq NIPT Microlab STAR (ML STAR) (αρ. είδους 95475-01, 95475-02 ή 806288), το οποίο παρέχεται από τη Hamilton Company.

VeriSeq NIPT Sample Prep, κιβώτιο εξαγωγής

Πίνακας 1 Κιβώτιο εξαγωγής VeriSeq NIPT (24) και (48), αρ. είδους 20025869 και 15066803

Όνομα αντιδραστηρίου στην ετικέτα	Αριθμός περιεκτών στο κιτ	Δραστικά συστατικά	Αποθήκευση
Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης	1	Χλωριούχο γουανιδίνιο σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα	15 °C έως 30 °C
Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης I	1	Χλωριούχο γουανιδίνιο και 2-προπανόλη σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα	15 °C έως 30 °C
Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης II	1	Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει άλατα	15 °C έως 30 °C
Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης	1	Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα	15 °C έως 30 °C
Ρυθμιστικό διάλυμα πρωτεΐνωσης	1	Γλυκερόλη σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα	15 °C έως 30 °C
Πρωτεΐνωση K	3	Λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνωση K	15 °C έως 30 °C

Πίνακας 2 Κιβώτιο εξαγωγής VeriSeq NIPT (96), αρ. είδους 15066807

Όνομα αντιδραστηρίου στην ετικέτα	Αριθμός περιεκτών στο κιτ	Δραστικά συστατικά	Αποθήκευση
Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης	1	Χλωριούχο γουανιδίνιο σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα	15 °C έως 30 °C
Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης I	1	Χλωριούχο γουανιδίνιο και 2-προπανόλη σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα	15 °C έως 30 °C
Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης II	2	Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει άλατα	15 °C έως 30 °C
Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης	1	Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα	15 °C έως 30 °C

Όνομα αντιδραστηρίου στην ετικέτα	Αριθμός περιεκτών στο κιτ	Δραστικά συστατικά	Αποθήκευση
Ρυθμιστικό διάλυμα πρωτεΐνωσης	1	Γλυκερόλη σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα	15 °C έως 30 °C
Πρωτεΐνωση Κ	4	Λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνωση Κ	15 °C έως 30 °C

VeriSeq NIPT Sample Prep, κιβώτιο προετοιμασίας βιβλιοθήκης

Πίνακας 3 Κιβώτιο προετοιμασίας βιβλιοθήκης VeriSeq NIPT (24) και (48), αρ. είδους 20026030 και 15066809

Όνομα αντιδραστηρίου στην ετικέτα	Αριθμός περιεκτών στο κιτ	Δραστικά συστατικά	Αποθήκευση
Μείγμα επιδιόρθωσης άκρων	1	Πολυμεράση DNA και dNTP σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα	-25 °C έως -15 °C
Μείγμα A-tailing	1	Πολυμεράση DNA και dATP σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα	-25 °C έως -15 °C
Μείγμα απολίνωσης	1	Λιγκάση DNA σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα	-25 °C έως -15 °C
Ρυθμιστικό διάλυμα υβριδισμού	1	Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα	-25 °C έως -15 °C
Πλάκα προσαρμογέα DNA NIPT	1	Ολιγονουκλεοτίδια σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα	-25 °C έως -15 °C

Πίνακας 4 Κιβώτιο προετοιμασίας βιβλιοθήκης VeriSeq NIPT (96), αρ. είδους 15066810

Όνομα αντιδραστηρίου στην ετικέτα	Αριθμός περιεκτών στο κιτ	Δραστικά συστατικά	Αποθήκευση
Μείγμα επιδιόρθωσης άκρων	1	Πολυμεράση DNA και dNTP σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα	-25 °C έως -15 °C

Όνομα αντιδραστηρίου στην ετικέτα	Αριθμός περιεκτών στο κιτ	Δραστικά συστατικά	Αποθήκευση
Μείγμα A-tailing	2	Πολυμεράση DNA και dATP σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα	-25 °C έως -15 °C
Μείγμα απολίνωσης	2	Λιγκάση DNA σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα	-25 °C έως -15 °C
Ρυθμιστικό διάλυμα υβριδισμού	1	Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα	-25 °C έως -15 °C
Πλάκα προσαρμογέα DNA NIPT	1	Ολιγονουκλεοτίδια σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα	-25 °C έως -15 °C

VeriSeq NIPT Sample Prep, κιβώτιο βοηθητικών εξαρτημάτων

Πίνακας 5 Κιβώτιο εξαρτημάτων VeriSeq NIPT, αρ. είδους 15066811

Όνομα αντιδραστηρίου στην ετικέτα	Αριθμός περιεκτών στο κιτ	Δραστικά συστατικά	Αποθήκευση
Πλάκα «Δέσμευση DNA»	1	Μικροπλάκα προπυλενίου με τροποποιημένη μεμβράνη σιλικόνης	2 °C έως 8 °C
Ρυθμιστικό διάλυμα επανεναιώρησης	1	Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα	2 °C έως 8 °C
Σφαιρίδια καθαρισμού δειγμάτων	1	Παραμαγνητικά σφαιρίδια στερεάς φάσης σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα	2 °C έως 8 °C
Αντιδραστήριο ποσοτικού προσδιορισμού DNA	1	Χρωστική που παρεμβάλλεται στο DNA σε DMSO	2 °C έως 8 °C
Πρότυπο ποσοτικού προσδιορισμού DNA	1	Τυπικό dsDNA, μη ειδικό DNA και αζίδιο του αντρίου σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα	2 °C έως 8 °C

VeriSeq NIPT Sample Prep, σωλήνες ροής εργασιών και ετικέτες

Πίνακας 6 Σωλήνες ροής εργασιών και ετικέτες, αρ. είδους 15071543

Όνομα στοιχείου στην ετικέτα	Αριθμός στοιχείων στο κιτ	Αποθήκευση
Ετικέτα (LBL) – Γραμμωτός κωδικός πλάκας	9	15 °C έως 30 °C
Ετικέτα (LBL) – Γραμμωτός κωδικός πλάκας βοθρίων μεγάλου βάθους	12	15 °C έως 30 °C
Σωλήνας (TB) – Κενός σωλήνας δεξαμενοποίησης	5	15 °C έως 30 °C

Αντιδραστήρια που δεν παρέχονται**Απαιτούμενα αντιδραστήρια, δεν παρέχονται**

- Αντιδραστήρια και αναλώσιμα αλληλούχισης που απαιτούνται για το σύστημα αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS)
- Πιστοποιημένο νερό ελεύθερο από DNase/RNase
- Αιθανόλη, 100% (200 proof), για ποιότητα μοριακής βιολογίας

ΣΗΜΕΙΩΣΗ Η αιθανόλη που δεν είναι ποιότητας μοριακής βιολογίας ενδέχεται να επηρεάσει αρνητικά την απόδοση του προσδιορισμού.

Προαιρετικά αντιδραστήρια, δεν παρέχονται

- Αλατούχο διάλυμα με φωσφορικό άλας-ρυθμιστικό διάλυμα Dulbecco (DPBS) για αρνητικό μάρτυρα ελέγχου (no template control – NTC)

Αποθήκευση και χειρισμός

1. Η θερμοκρασία δωματίου ορίζεται ως 15 °C έως 30 °C.
2. Όλα τα αντιδραστήρια προορίζονται για μία μόνο χρήση. Τα αντιδραστήρια θα πρέπει να χρησιμοποιούνται αμέσως μετά την προετοιμασία τους για χρήση.
3. Εάν οποιαδήποτε από τις συσκευασίες ή το περιεχόμενο των εξαρτημάτων του VeriSeq NIPT Solution έχει υποστεί ζημιά ή έχει διακυβευτεί, επικοινωνήστε με το τμήμα εξυπηρέτησης πελατών της Illumina.
4. Τα αντιδραστήρια είναι σταθερά όταν αποθηκεύονται όπως υποδεικνύεται μέχρι την καθορισμένη ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στις ετικέτες των κιτ. Για τις συνθήκες αποθήκευσης, ανατρέξτε στη στήλη «Αποθήκευση» στους πίνακες στην ενότητα [Αντιδραστήρια στη σελίδα 6](#). Μην χρησιμοποιείτε ληγμένα αντιδραστήρια.

5. Οι αλλαγές στη φυσική εμφάνιση των αντιδραστηρίων που παρέχονται μπορεί να υποδεικνύουν υποβάθμιση των υλικών. Εάν προκύψουν αλλαγές στη φυσική εμφάνιση (π.χ. εμφανείς αλλαγές στο χρώμα των αντιδραστηρίων ή εμφανής θολερότητα με μικροβιακή μόλυνση), μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια.
6. Ακολουθείτε τις παρακάτω βέλτιστες πρακτικές κατά τον χειρισμό σφαιριδίων καθαρισμού δειγμάτων:
 - Μην καταψύχετε ποτέ τα σφαιρίδια.
 - Αφήνετε τα σφαιρίδια να έλθουν σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση.
 - Αμέσως πριν από τη χρήση, αναδεύστε τα σφαιρίδια μέχρι να εναιωρηθούν καλά και το χρώμα να γίνει ομοιογενές.
7. Το ρυθμιστικό διάλυμα λύσης, το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης I, το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης II, το ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης και το ρυθμιστικό διάλυμα πρωτεΐνάσης μπορεί να σχηματίσουν ορατά ιζήματα ή κρυστάλλους. Πριν από τη χρήση, αναδεύστε δυνατά και, στη συνέχεια, επιθεωρήστε οπτικά για να βεβαιωθείτε ότι δεν υπάρχουν ιζήματα.
8. Μην καταψύχετε ποτέ το ολικό αίμα μετά τη συλλογή.
9. Αλληλουχίστε τις βιβλιοθήκες το συντομότερο δυνατόν μετά τη δεξαμενοποίηση. Οι δεξαμενοποιημένες βιβλιοθήκες είναι σταθερές για έως επτά ημέρες σε θερμοκρασία $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ έως $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Δεν απαιτείται πρόσθετη αποδιάταξη εάν ήταν αποθηκευμένες για αυτό το χρονικό διάστημα σε αυτές τις συνθήκες.

Εξοπλισμός και υλικά

Εξοπλισμός και υλικά που απαιτούνται, δεν παρέχονται

Απαιτούμενος εξοπλισμός, δεν παρέχεται

Εξοπλισμός	Προμηθευτής
<p>Σύστημα αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS) με τις παρακάτω δυνατότητες:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Αλληλούχιση συζευγμένων άκρων 2 x 36 bp • Συμβατό με προσαρμογείς διπλού ευρετηρίου VeriSeq NIPT Sample Prep • Αυτόματη παραγωγή αρχείων BCL • Χημική ανάλυση δύο καναλιών • 400 εκατομμύρια αναγνώσεις συζευγμένων άκρων ανά εκτέλεση • Συμβατό με λογισμικό προσδιορισμού VeriSeq NIPT έκδ. 2 ή σύστημα αλληλούχισης NextSeq 550Dx 	Προμηθευτής οργάνου ή Illumina, αρ. είδους 20005715

Εξοπλισμός	Προμηθευτής
Καταψύκτης, -25 °C έως -15 °C	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Μικροφυγόκεντρος	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Βοήθημα πιπέτας	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Ψυγείο, 2 °C έως 8 °C	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Πιπέτες μονού καναλιού των 20 μl	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Πιπέτες μονού καναλιού των 200 μl	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Πιπέτες μονού καναλιού των 1.000 μl	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Αναδευτήρας	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Συγκρότημα φυγοκέντρου και στροφείου για σωλήνες συλλογής αίματος	
Ισοδύναμο:	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
<ul style="list-style-type: none"> Κατεψυγμένη φυγόκεντρος με δυνατότητα 1.600 × g με επιλογή χωρίς φρένο Περιστρεφόμενο στροφείο δοχείου με δοχεία Ένθετα δοχείου, χωρητικότητα 24 ,48, ή 96 σωλήνων, ελάχιστο βάθος 76 mm Προσαρμογείς ενθέτων για την υποστήριξη σωλήνων συλλογής αίματος 16 x 100 mm 	Beckman Coulter, αρ. στοιχείου 392304 (120 V ή 230 V)
Συνιστάται:	Beckman Coulter, αρ. στοιχείου 369704
<ul style="list-style-type: none"> Φυγόκεντρος σειράς Allegra X12R, 1.600 g Στροφείο GH-3.8 φυγοκέντρου Allegra με δοχεία 	Beckman Coulter, αρ. στοιχείου 392805
<ul style="list-style-type: none"> Καλύμματα δοχείων φυγοκέντρου Allegra, σετ των δύο Συγκρότημα προσαρμογέα φυγοκέντρου Allegra, 16 mm, σετ των τεσσάρων 	Beckman Coulter, αρ. στοιχείου 359150

Συγκρότημα φυγοκέντρου και στροφείου για μικροπλάκες

Εξοπλισμός	Προμηθευτής
<p>Ισοδύναμο:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Φυγόκεντρος με δυνατότητα 5.600 × g • Περιστρεφόμενο στροφέιο πλακών με φορείς πλακών 96 βοθρίων, ελάχιστο βάθος 76,5 mm. • Multifuge X4 Pro-MD 120V TX-1000BT • Φυγόκεντρος Sorvall Legend XTR <ul style="list-style-type: none"> • Στροφέιο μικροπλακών HIGHPlate 6000 • Υψηλή πλάκα στροφείου 6000 <p>Βάση στήριξης για μικροπλάκες</p> <ul style="list-style-type: none"> • Συνιστάται: <ul style="list-style-type: none"> • Βάση στήριξης 96 βοθρίων MicroAmp • Φορέας πλακών PCR 96 βοθρίων 	<p>Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου</p> <p>Thermo Scientific VWR, αρ. καταλόγου 76326-254 Thermo Fisher Scientific, αρ. καταλόγου 75004521 (120 V) ή αρ. καταλόγου 75004520 (230 V) Thermo Fisher Scientific, αρ. καταλόγου 75003606 Thermo Scientific VWR, αρ. καταλόγου 97040-244</p> <p>Thermo Fisher Scientific, αρ. καταλόγου 4379590 Thermo Fisher Scientific, αρ. καταλόγου AB-0563/1000</p>
<p>Μία από τις παρακάτω συσκευές ανάγνωσης μικροπλακών, ή αντίστοιχη, (φθορισμόμετρο) με SoftMax Pro έκδοσης 6.2.2 ή νεότερης:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gemini XPS • SpectraMax M2, M3, M4 και M5 <ul style="list-style-type: none"> • Το μοβ ένθετο περιλαμβάνεται με τη συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών για χρήση στη ροή εργασιών 	<p>Molecular Devices, αρ. είδους XPS Molecular Devices, αρ. είδους M2, M3, M4 και M5</p>
<p>USB υψηλής ταχύτητας SpectraMax, σειριακός προσαρμογέας</p>	<p>Molecular Devices, αρ. είδους 9000-0938</p>
<p>Θερμικός κυκλοποιητής με τις παρακάτω προδιαγραφές:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Θερμαινόμενο καπάκι • Εύρος θερμοκρασίας 4 °C έως 98 °C • Ακρίβεια θερμοκρασίας ±2 °C • Ελάχιστος ρυθμός μεταβολής θερμοκρασίας 2 °C ανά δευτερόλεπτο • Συμβατός με πλάκα PCR Twin.tec 96 βοθρίων, με πλήρη επένδυση 	<p>Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου</p>
<p>VeriSeq NIPT Microlab STAR</p>	<p>Hamilton, αρ. είδους 95475-01 (115 V), αρ. είδους 95475-02 (230 V) ή αρ. είδους 806288 (για τη Hamilton Company Bonaduz)</p>

Εξοπλισμός	Προμηθευτής
Επιτόπιος διακομιστής VeriSeq έκδ. 2 ή αναβαθμισμένος επιτόπιος διακομιστής VeriSeq	Illumina, αρ. είδους 20028403 ή 20047000 (έκδ. 2) ή 15076164 ή 20016240 (αναβαθμισμένος)
Εάν χρησιμοποιείτε σύστημα αλληλούχησης NextSeq 550Dx:	Illumina, αρ. είδους 20028870
<ul style="list-style-type: none"> Κιτ αντιδραστηρίων υψηλής απόδοσης NextSeq 550Dx έκδ. 2.5, 75 κύκλοι 	

Προαιρετικός εξοπλισμός, δεν παρέχεται

Εξοπλισμός	Προμηθευτής
Σύστημα αφαίρεσης πωμάτων Pluggo	LGP Consulting, αρ. είδους 4600 4450
Πλάκα επικύρωσης φθορισμού SpectraMax SpectraTest FL1	Molecular Devices, αρ. είδους 0200-5060
Στροφέιο/περιστρεφόμενος φορέας σωλήνων, σωλήνες 15 ml, 40 rpm, 100–240 V	Thermo Scientific, αρ. καταλόγου 88881001 (ΗΠΑ) ή αρ. καταλόγου 88881002 (ΕΕ)

Απαιτούμενα υλικά, δεν παρέχονται

Αναλώσιμο	Προμηθευτής
Αγώγιμα, μη αποστειρωμένα άκρα φίλτρου των 1.000 μl	Hamilton, αρ. είδους 235905
Αγώγιμα, μη αποστειρωμένα άκρα φίλτρου των 300 μl	Hamilton, αρ. είδους 235903
Αγώγιμα, μη αποστειρωμένα άκρα φίλτρου των 50 μl	Hamilton, αρ. είδους 235948
Δοχείο βοθρίων μεγάλου βάθους με τις ακόλουθες προδιαγραφές: <ul style="list-style-type: none"> Μορφή μικροπλάκας SLAS 1–2004 με 96 βοθρία πυραμιδικού ή κωνικού πυθμένα και ελάχιστη χωρητικότητα 240 ml. Πολυπροπυλένιο με προτίμηση για χαμηλή δέσμευση DNA για όλες τις επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με δείγματα. Οι εσωτερικές διαστάσεις (στάθμη υγρού) είναι συμβατές με αυτοματοποιημένα βήματα αναρρόφησης και διανομής του VeriSeq NIPT Microlab STAR. Οι διαστάσεις ύψους είναι συμβατές με αυτοματοποιημένες κινήσεις του VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου Συμβατά δοχεία: <ul style="list-style-type: none"> Corning Axygen, αρ. προϊόντος RES-SW96-HP-SI Agilent, αρ. προϊόντος 201246-100

Αναλώσιμο	Προμηθευτής
<p>Κύπελλο αντιδραστηρίων με τις ακόλουθες προδιαγραφές:</p> <ul style="list-style-type: none"> Κύπελλο που εφαρμόζει σταθερά, αλλά χωρίς άσκηση δύναμης, μέσα στον φορέα του VeriSeq NIPT Microlab STAR με κωνικό πυθμένα και ελάχιστη χωρητικότητα 20 ml. Πολυπροπυλένιο ελεύθερο από ριβονουκλεάση (RNase)/δεοξυριβονουκλεάση (DNase). Οι εσωτερικές διαστάσεις δοχείου (στάθμη υγρού) δημιουργούν στάθμες υγρών μέσω όγκων αντιδραστηρίων προσδιορισμού, που είναι συμβατές με αυτοματοποιημένα βήματα αναρρόφησης και διανομής του VeriSeq NIPT Microlab STAR. Οι διαστάσεις ύψους είναι συμβατές με αυτοματοποιημένες κινήσεις του VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	<p>Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου</p> <p>Συμβατά κύπελλα:</p> <ul style="list-style-type: none"> Roche, αρ. προϊόντος 03004058001
<p>Πλάκες βοθρίων μεγάλου βάθους με τις ακόλουθες προδιαγραφές:</p> <ul style="list-style-type: none"> Μορφή μικροπλάκας SLAS 1–2004, 3–2004 και 4–2004 με 96 βοθρία πυραμιδικού ή κωνικού πυθμένα και ελάχιστη χωρητικότητα βοθρίων 2 ml. Φωτοδιαπερατό πολυπροπυλένιο με προτίμηση για υλικό χαμηλής δέσμευσης DNA για όλες τις επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με δείγματα. Οι διαστάσεις των βοθρίων δημιουργούν στάθμη υγρού και είναι συμβατές με αυτοματοποιημένα βήματα αναρρόφησης και διανομής του VeriSeq NIPT Microlab STAR. Επένδυση πλάκας που επιτρέπει την τοποθέτηση γραμμωτών κωδικών πλακών στην απαιτούμενη θέση με σταθερή προσκόλληση σε επίπεδη επιφάνεια. Σκελετός ανθεκτικός στη ροπή για τη διατήρηση ελάχιστης τιμής 5.600 x g. Οι διαστάσεις ύψους της πλάκας είναι συμβατές με αυτοματοποιημένες κινήσεις του VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	<p>Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου</p> <p>Συμβατές πλάκες:</p> <ul style="list-style-type: none"> Erpendorf, αρ. είδους 0030505301 Erpendorf, αρ. είδους 30502302 USA Scientific, αρ. είδους 1896–2000

Αναλώσιμο	Προμηθευτής
<p>Πλάκα με 384 βοθρία με τις ακόλουθες προδιαγραφές:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Μικροπλάκα με 384 βοθρία, βελτιστοποιημένη για χαμηλούς όγκους, με ελάχιστη χωρητικότητα βοθρίων 50 μl. • Μαύρο αδιαφανές πολυστυρένιο με αποκλεισμό φωτός και χαμηλή δέσμευση DNA για όλες τις επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με δείγματα. • Οι διαστάσεις των βοθρίων δημιουργούν στάθμες υγρών και είναι συμβατές με αυτοματοποιημένα βήματα αναρρόφησης και διανομής του VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Οι διαστάσεις ύψους της πλάκας είναι συμβατές με αυτοματοποιημένες κινήσεις του VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Επένδυση πλάκας που επιτρέπει την τοποθέτηση γραμμωτών κωδικών πλακών στην απαιτούμενη θέση με σταθερή προσκόλληση σε επίπεδη επιφάνεια. 	<p>Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου</p> <p>Συμβατές πλάκες:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Corning, αρ. προϊόντος 3820
<p>Πλάκα με 96 βοθρία με τις ακόλουθες προδιαγραφές:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Μικροπλάκα με σκελετό ανθεκτικό στη ροπή για τη διατήρηση ελάχιστης τιμής 5.600 x g και 96 φωτοδιαπερατά βοθρία με κωνικούς πυθμένες, ανυψωμένο χείλος και ελάχιστη χωρητικότητα βοθρίων 150 μl. • Πολυπροπυλένιο ελεύθερο από RNase/DNase με χαμηλή δέσμευση DNA για όλες τις επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με δείγματα. • Οι διαστάσεις των βοθρίων δημιουργούν στάθμες υγρών και είναι συμβατές με αυτοματοποιημένα βήματα αναρρόφησης και διανομής του VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Οι διαστάσεις ύψους της πλάκας είναι συμβατές με αυτοματοποιημένες κινήσεις του VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Επένδυση πλάκας που επιτρέπει την τοποθέτηση γραμμωτών κωδικών πλακών στην απαιτούμενη θέση με σταθερή προσκόλληση σε επίπεδη επιφάνεια. • Συμβατό με θερμικούς κυκλοποιητές για αποδιάταξη. 	<p>Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου</p> <p>Συμβατές πλάκες:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, αρ. είδους 0030129512 • Eppendorf, αρ. είδους 30129580 • Eppendorf, αρ. είδους 30129598 • Eppendorf, αρ. είδους 30129660 • Eppendorf, αρ. είδους 30129679 • Bio-Rad, αρ. είδους HSP9601

Αναλώσιμο	Προμηθευτής
Μία από τις ακόλουθες στεγανοποιήσεις: <ul style="list-style-type: none"> Στεγανοποιήσεις αλουμινίου Microseal 'F' Στεγανοποιήσεις αλουμινίου 	Bio-Rad, αρ. καταλόγου MSF1001 Beckman Coulter, αρ. αντικειμένου 538619
Cell-Free DNA BCT CE	Streck, αρ. καταλόγου 218997
Πώματα ώθησης	Sarstedt, αρ. παραγγελίας 65.802
Σωλήνες των 2 ml με βιδωτό πώμα	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Άκρα φίλτρου των 20 ml για πιπέτα των 20 ml	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Άκρα φίλτρου των 200 ml για πιπέτα των 200 ml	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Άκρα φίλτρου των 1.000 ml για πιπέτα των 1.000 ml	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Ισοδύναμο: <ul style="list-style-type: none"> Σπρέι ταχείας απολύμανσης με βάση την αλκοόλη Διάλυμα απολυμαντικού απορρυπαντικού Συνιστάται: <ul style="list-style-type: none"> Απιονισμένο νερό και αιθανόλη 70% 	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου

Προαιρετικά υλικά, δεν παρέχονται

Αναλώσιμο	Προμηθευτής
Αλατούχο διάλυμα με φωσφορικό άλας-ρυθμιστικό διάλυμα Dulbecco (DPBS) για αρνητικό μάρτυρα ελέγχου (no template control – NTC)	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Σωλήνας, βιδωτό πώμα, 10 ml (μόνο για δείγματα μάρτυρα)	Sarstedt, αρ. παραγγελίας 60.551
Σωλήνας, βιδωτό πώμα, 50 ml	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Ορολογικές πιπέτες των 25 ml	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Ορολογικές πιπέτες των 10 ml	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου

Συλλογή, μεταφορά και αποθήκευση δειγμάτων



ΠΡΟΣΟΧΗ

Να χειρίζεστε όλα τα δείγματα ως εάν να περιείχαν δυνητικώς μολυσματικούς παράγοντες.

- Τα δείγματα ολικού αίματος 7–10 ml πρέπει να συλλέγονται σε σωλήνα BCT ελεύθερου κυττάρων DNA της Streck.

- Η μεταφορά του ολικού αίματος πρέπει να γίνεται σύμφωνα με όλους τους εφαρμοστέους κανονισμούς για τη μεταφορά αιτιολογικών παραγόντων. Συνιστώνται οι μέθοδοι ταχείας αποστολής/μεταφοράς.
- Κατά τη μεταφορά, αποθηκεύετε σε θερμοκρασίες από 4 °C έως 30 °C. Μετά την παραλαβή των δειγμάτων, αποθηκεύστε σε θερμοκρασία από 2 °C έως 8 °C μέχρι να είναι έτοιμα για επεξεργασία. Ο χρόνος μεταξύ της συλλογής αίματος και της αρχικής απομόνωσης πλάσματος δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τις 5 ημέρες.
- Σε περίπτωση που απαιτείται επανεξέταση, τα δείγματα μετά την επεξεργασία μπορούν να επαναπωματιστούν και να αποθηκευτούν στους 4 °C για 5 επιπλέον ημέρες (συνολικά έως και 10 ημέρες μετά τη συλλογή αίματος).

**ΠΡΟΣΟΧΗ**

Η υπέρβαση των προαναφερθέντων χρόνων αποθήκευσης μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τα ποσοστά αποτυχίας μεμονωμένων δειγμάτων.

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

- Αυτός ο προσδιορισμός περιέχει πρωτεΐνωση Κ. Η εισπνοή, η κατάποση και η επαφή με το δέρμα ή τα μάτια μπορεί να προκαλέσουν τραυματισμό. Χρησιμοποιείτε σε καλά αεριζόμενο χώρο, φοράτε προστατευτικό ρουχισμό, αποφεύγετε την αναπνοή σκόνης και απορρίπτετε τους περιέκτες και το αχρησιμοποίητο περιεχόμενο σύμφωνα με τα εφαρμοστέα κρατικά πρότυπα ασφάλειας.
- Αυτός ο προσδιορισμός περιέχει χλωριούχο γουανιδίνιο. Η εισπνοή, η κατάποση και η επαφή με το δέρμα ή τα μάτια μπορεί να προκαλέσουν τραυματισμό. Χρησιμοποιείτε σε καλά αεριζόμενο χώρο, φοράτε προστατευτικό ρουχισμό και απορρίπτετε τους περιέκτες και το αχρησιμοποίητο περιεχόμενο σύμφωνα με τα εφαρμοστέα τοπικά πρότυπα ασφάλειας.
- Αυτός ο προσδιορισμός περιέχει 2-προπανόλη, μια εύφλεκτη χημική ουσία. Κρατάτε τον μακριά από θερμότητα και γυμνή φλόγα. Η εισπνοή, η κατάποση και η επαφή με το δέρμα ή τα μάτια μπορεί να προκαλέσουν τραυματισμό. Χρησιμοποιείτε σε καλά αεριζόμενο χώρο, φοράτε προστατευτικό ρουχισμό και απορρίπτετε τους περιέκτες και το αχρησιμοποίητο περιεχόμενο σύμφωνα με τα εφαρμοστέα τοπικά πρότυπα ασφάλειας.
- Αυτός ο προσδιορισμός περιέχει διμεθυλοσουλφοξείδιο, ένα διαβρωτικό και καύσιμο υγρό. Η εισπνοή, η κατάποση και η επαφή με το δέρμα ή τα μάτια μπορεί να προκαλέσουν τραυματισμό. Χρησιμοποιείτε σε καλά αεριζόμενο χώρο, φοράτε προστατευτικό ρουχισμό και απορρίπτετε τους περιέκτες και το αχρησιμοποίητο περιεχόμενο σύμφωνα με τα εφαρμοστέα τοπικά πρότυπα ασφάλειας.
- Για να αποτραπεί ο σχηματισμός επιβλαβών αερίων, μην απορρίπτετε τα απόβλητα εξαγωγής cfDNA (περιέχουν θειοκυανικό γουανιδίνιο) μαζί με απόβλητα που περιέχουν χλωρίνη (υποχλωριώδες νάτριο).
- Να χειρίζεστε όλα τα δείγματα ως εάν να περιείχαν δυνητικώς μολυσματικούς παράγοντες.

- Χρησιμοποιείτε συνήθεις εργαστηριακές προφυλάξεις. Μη χρησιμοποιείτε το στόμα σας για να αναρροφήσετε υγρά στην πιπέτα. Μην τρώτε, πίνετε ή καπνίζετε σε καθορισμένους χώρους εργασίας. Φοράτε γάντια μίας χρήσης και ποδιές εργαστηρίου κατά τον χειρισμό δειγμάτων και αντιδραστηρίων προσδιορισμού. Πλένετε τα χέρια σας σχολαστικά μετά τον χειρισμό δειγμάτων και αντιδραστηρίων προσδιορισμού.
- Μη χρησιμοποιείτε τα εξαρτήματα του προσδιορισμού πέραν της ημερομηνίας λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα του κιβωτίου του προσδιορισμού. Μην ανταλλάσσετε εξαρτήματα του προσδιορισμού από διαφορετικές παρτίδες προσδιορισμού. Οι παρτίδες προσδιορισμού προσδιορίζονται στην ετικέτα του κιβωτίου του προσδιορισμού. Αποθηκεύετε τα εξαρτήματα του προσδιορισμού στην καθορισμένη θερμοκρασία.
- Για την αποτροπή υποβάθμισης των δειγμάτων ή των αντιδραστηρίων, βεβαιωθείτε ότι όλοι οι ατμοί υδροξειδίου του νατρίου από τον καθαρισμό έχουν εξανεμιστεί πριν από την έναρξη του πρωτοκόλλου.
- Η μη τήρηση των διαδικασιών όπως περιγράφονται μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα αποτελέσματα ή σημαντική μείωση της ποιότητας των δειγμάτων.
- Αναφέρετε αμέσως τυχόν σοβαρά ατυχήματα που σχετίζονται με αυτό το προϊόν στην Illumina και στις αρμόδιες αρχές των κρατών μελών στα οποία είναι εγκατεστημένοι ο χρήστης και ο ασθενής.
- Για πληροφορίες σχετικά με το περιβάλλον, την υγεία και την ασφάλεια, ανατρέξτε στα φύλλα δεδομένων ασφαλείας (SDS), στη διεύθυνση support.illumina.com/sds.html.

Σημειώσεις για τις διαδικασίες

Αποτροπή μόλυνσης

- Χρησιμοποιείτε νέα άκρα και νέο αναλώσιμο εξοπλισμό εργαστηρίου.
- Χρησιμοποιείτε ανθεκτικά στο αερόλυμα άκρα για τη μείωση του κινδύνου μεταφοράς και διασταυρούμενης μόλυνσης μεταξύ των δειγμάτων.
- Λόγω του ενδεχομένου μόλυνσης, επιδεικνύετε ιδιαίτερη προσοχή ώστε να βεβαιώνετε ότι το περιεχόμενο του βοθρίου παραμένει πλήρως εντός του βοθρίου. Μην προκαλείτε εκτίναξη του περιεχομένου. Εκτελείτε φυγοκέντριση έπειτα από κάθε βήμα ανάδευσης.
- Ακολουθείτε τους εφαρμοστέους κανονισμούς για την ορθή εργαστηριακή πρακτική και υγιεινή κατά τον χειρισμό αίματος και παραγώγων αίματος.
- Μη χρησιμοποιείτε σπρέι χλωρίνης με αερόλυμα κατά την εκτέλεση προετοιμασίας βιβλιοθηκών. Τα ίχνη μόλυνσης από χλωρίνη μπορεί να οδηγήσουν σε αποτυχία του προσδιορισμού.
- Κατά την αφαίρεση της στεγανοποίησης τυχόν πλακών, προσέχετε ώστε να τοποθετείτε την πλάκα πάνω σε μια σταθερή, επίπεδη επιφάνεια, κρατώντας την καλά. Αφαιρέστε αργά τη στεγανοποίηση, διασφαλίζοντας ότι δεν έρχεται σε επαφή με εκτεθειμένα βοθρία. Προσέχετε ώστε να μην αγγίξετε εκτεθειμένα βοθρία και να μη διαταράξετε τα περιεχόμενα. Με τη διασταυρούμενη μόλυνση μεταξύ βοθρίων μπορούν να παραχθούν εσφαλμένα αποτελέσματα.

Καθαρισμός θαλάμου VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Πριν από τη χρήση, επιθεωρήστε τον θάλαμο για να δείτε αν είναι καθαρός. Τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα, εκτελείτε την εβδομαδιαία συντήρηση και ακολουθείτε αυτές τις οδηγίες καθαρισμού.
- Αφαιρέστε όλους τους φορείς που δεν μπορούν να φέρουν φορτίο και καθαρίστε με ένα αλκοολούχο σπρέι ταχείας απολύμανσης, απιονισμένο νερό και αιθανόλη 70% και αφήστε τους να στεγνώσουν. Εάν είναι πολύ βρόμικοι, εμποτίστε τους στη συνέχεια σε ένα διάλυμα απολυμαντικού απορρυπαντικού, εκπλύνετε με αλκοολούχο απολυμαντικό και αφήστε τους να στεγνώσουν.
- Ανοίξτε το μπροστινό κάλυμμα και σκουπίστε τον θάλαμο με ένα πανί εμποτισμένο με απιονισμένο νερό και αιθανόλη 70%. Ιδίως τα μπλοκ ολίσθησης πρέπει να ελέγχονται για την καθαριότητα.
- Αφαιρέστε την πολλαπλή βασικού συστήματος κενού (BVS) και καθαρίστε την πολλαπλή, τη φλάντζα και τα εσωτερικά διαμερίσματα του BVS με πανί. Αποφύγετε να καθαρίσετε τη φλάντζα με αιθανόλη, καθώς το υλικό μπορεί να καταστεί εύθραυστο.
- Αδειάστε τα απόβλητα άκρα για την κεφαλή CORE 96 και το ανεξάρτητο κανάλι.
- Αφαιρέστε την πλάκα εξώθησης άκρου του ανεξάρτητου καναλιού στον σταθμό αποβλήτων άκρων και καθαρίστε την: ψεκάστε με απιονισμένο νερό και αιθανόλη 70% απευθείας πάνω στην επιφάνεια και σκουπίστε. Τραβήξτε μια νέα πλαστική σακούλα πάνω από τον σκελετό και επανατοποθετήστε την. Τοποθετήστε την καθαρή πλάκα εξώθησης άκρου ξανά στη θέση της.
- Ψεκάστε με απιονισμένο νερό και αιθανόλη 70% απευθείας πάνω στην επιφάνεια του κουτιού αποβλήτων και του αγωγού της κεφαλής CORE 96 και σκουπίστε την για να την καθαρίσετε.
 - Εάν είναι δύσκολο να αφαιρεθούν οι συσσωρευμένες ακαθαρσίες από τα απόβλητα άκρα, σκουπίστε με ένα πανί που έχετε υγράνει με νερό ελεύθερο από DNase/RNase, μέχρι να αφαιρεθούν οι συσσωρευμένες ακαθαρσίες. Απορρίψτε το πανί καταλλήλως. Προχωρήστε στην αποστείρωση με το αλκοολούχο απολυμαντικό.
- Υγράνετε ένα πανί που δεν αφήνει χνούδι ή έναν βαμβακοφόρο στείλειό με αιθανόλη 70%. Καθαρίστε το παράθυρο του σαρωτή laser της συσκευής ανάγνωσης γραμμωτού κωδικού. Χρησιμοποιώντας το ίδιο πανί ή στείλειό, καθαρίστε κάθε βοθρίο του προσαρμογέα πλάκας CPAC. Εάν χρησιμοποιείτε πανί, πιέστε το πανί μέσα σε κάθε βοθρίο του προσαρμογέα χρησιμοποιώντας το πίσω μέρος ενός στυλό για να βεβαιωθείτε ότι το εσωτερικό του βοθρίου έχει καθαριστεί σωστά.
- Καθαρίστε τα ανεξάρτητα κανάλια:
 - Στα ανεξάρτητα κανάλια, καθαρίστε το περίβλημα εξώθησης άκρου (εξωτερικό τμήμα των καναλιών αναρρόφησης με πιπέτα) με ένα πανί που δεν αφήνει χνούδι εμποτισμένο σε απιονισμένο νερό και αιθανόλη 70%. (Δείτε τον Οδηγό αναφοράς *Hamilton Microlab STAR αρ. 15070074*).
 - Καθαρίστε τον δίσκο διακοπής και τους κυκλικούς δακτυλίους της κεφαλής αναρρόφησης με πιπέτα (εξωτερικό τμήμα των καναλιών αναρρόφησης με πιπέτα) με ένα πανί που δεν αφήνει χνούδι εμποτισμένο σε απιονισμένο νερό και αιθανόλη 70%.

- Καθαρίστε την κεφαλή CORE 96:
 - Χρησιμοποιώντας το ίδιο πανί που δεν αφήνει χνούδι εμποτισμένο σε απιονισμένο νερό και αιθανόλη 70%, καθαρίστε το περίβλημα της κεφαλής 96 και το κάτω μέρος των δίσκων διακοπής.
 - Χρησιμοποιώντας το ίδιο πανί ή μια σκισμένη λωρίδα πανιού που έχετε εμποτίσει σε απιονισμένο νερό και αιθανόλη 70%, τρίψτε το πανί γύρω από τις πλευρές των καναλιών πιπέτας της κεφαλής 96 για να καθαρίσετε τους κυκλικούς δακτυλίους. Επαναλάβετε αυτήν τη διαδικασία για κάθε κανάλι πιπέτας στην κεφαλή 96.
- Ψεκάστε το μπροστινό και το πλευρικό κάλυμμα με απιονισμένο νερό και αιθανόλη 70% και σκουπίστε έως ότου στεγνώσει.
- Καθαρίστε την ταινία προστασίας αυτόματης φόρτωσης με ένα πανί εμποτισμένο με απιονισμένο νερό και αιθανόλη 70% και σκουπίστε χωρίς να ασκήσετε πίεση.
- Όταν ο θάλαμος και τα εξαρτήματα στεγνώσουν εντελώς, επανατοποθετήστε τους φορείς.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ Ο ακατάλληλος καθαρισμός και η ακατάλληλη συντήρηση του ML STAR μπορεί να οδηγήσουν σε διασταυρούμενη μόλυνση και ανεπαρκή απόδοση του προσδιορισμού.

Ποιοτικός έλεγχος

Ενδέχεται να αξιολογηθεί υλικό μάρτυρα με γνωστά χαρακτηριστικά απόδοσης ώστε να εντοπιστούν διαφορές στις διαδικασίες επεξεργασίας και στις τεχνικές διαδικασίες στο εργαστήριο.

Η εκτέλεση δείγματος ελέγχου ή αρνητικού μάρτυρα ελέγχου μειώνει τον συνολικό αριθμό άγνωστων μητρικών δειγμάτων που μπορούν να υποβληθούν σε επεξεργασία με κάθε προετοιμασία δειγμάτων.

Μην υπερβαίνετε τα δύο δείγματα NTC ανά παρτίδα 24 ή 48 δειγμάτων ή τα τέσσερα δείγματα NTC ανά παρτίδα 96 δειγμάτων.

Οδηγίες χρήσης

Άκρα και τεχνικές

Εάν δεν προσδιορίζεται σημείο ασφαλούς διακοπής στο πρωτόκολλο, προχωρήστε αμέσως στο επόμενο βήμα.

Επικόλληση γραμμωτών κωδικών στις πλάκες

- Οι γραμμωτοί κωδικοί για τις πλάκες με πλήρη επένδυση αρχίζουν με PL.
- Οι γραμμωτοί κωδικοί για τις πλάκες βοθρίων μεγάλου βάθους αρχίζουν με DW.
- Εφαρμόστε γραμμωτούς κωδικούς σε πλάκες με πλήρη επένδυση και πλάκες βοθρίων μεγάλου βάθους πλευρικά δίπλα στη στήλη 12.

- Φορτώστε τις πλάκες με τους γραμμωτούς κωδικούς στραμμένους προς τα δεξιά για να είναι δυνατή η αυτοματοποιημένη σάρωση.

Στεγανοποίηση και αφαίρεση στεγανοποίησης της πλάκας

- Δίνετε ιδιαίτερη προσοχή ώστε να αποφύγετε τη διασταυρούμενη μόλυνση. Δεν θα πρέπει να υπάρχει ορατό υγρό στην κάτω πλευρά της στεγανοποίησης.
 - Διασφαλίστε ότι η εκτεθειμένη κάτω πλευρά της στεγανοποίησης δεν έρχεται σε επαφή με εκτεθειμένα βοηθία.
 - Προσέχετε ώστε να μην αγγίξετε εκτεθειμένα βοηθία.
- Στεγανοποιείτε πάντα την πλάκα 96 βοθρίων προτού εκτελέσετε τα παρακάτω βήματα στο πρωτόκολλο:
 - Βήματα φυγοκέντρησης.
 - Βήματα θερμικής κυκλοποίησης.
- Για να στεγανοποιήσετε την πλάκα, εφαρμόστε τη στεγανοποίηση αλουμινίου στην πλάκα και, στη συνέχεια, στεγανοποιήστε. Διασφαλίστε ότι η πίεση εφαρμόζεται σε ολόκληρη την πλάκα και ότι η στεγανοποίηση είναι σφιχτά τοποθετημένη σε κάθε μεμονωμένο βοθρίο.
- Πριν από την αφαίρεση της στεγανοποίησης της πλάκας, εκτελέστε τα ακόλουθα:
 - Φυγοκεντρήστε σύντομα την πλάκα 96 βοθρίων στα 1.000 × g για 20 δευτερόλεπτα.
 - Τοποθετήστε την πλάκα σε μια επίπεδη επιφάνεια και, στη συνέχεια, αφαιρέστε τη στεγανοποίηση αργά.

VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Πριν από τη χρήση, εκτελέστε και καταγράψτε την απαιτούμενη συντήρηση σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- Παρατηρείτε το ML STAR κατά τη διάρκεια των αυτοματοποιημένων βημάτων. Ελέγχετε τη διεπαφή του λογισμικού του προγράμματος διαχείρισης ροής εργασιών VeriSeq NIPT έκδ. 2 για μηνύματα προτροπής και οδηγίες προς τον χειριστή.
- Διατηρείτε το μπροστινό κάλυμμα στη θέση του κατά τη διάρκεια της λειτουργίας.
- Διατηρείτε τον θάλαμο μακριά από όλα τα στοιχεία κατά τη διάρκεια της λειτουργίας.
- Αν παρουσιαστεί το κουμπί επιλογής **Exclude** (Αποκλεισμός) κατά τη διάρκεια ενός συμβάντος χειρισμού σφάλματος, αποφύγετε τον ορισμό αυτής της επιλογής υπό οποιαδήποτε κατάσταση. Αν η μέθοδος δεν μπορεί να προχωρήσει πέρα από το συμβάν χειρισμού σφάλματος ή έχετε περιορισμένες επιλογές χειρισμού σφάλματος, ματαιώστε την εκτέλεση.
- Κατά τη διάρκεια των βημάτων κενού της πλάκας, εάν σας ζητηθεί από το πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασιών VeriSeq NIPT έκδ. 2, βοηθήστε χειροκίνητα για τη δημιουργία της στεγανοποίησης μεταξύ της πλάκας και της πολλαπλής κενού.
- Αφήστε το σύστημα να απορρίψει τα άκρα από τον προσαρμογέα αυτόματα. Μην αφαιρείτε χειροκίνητα τα άκρα, εκτός εάν σας ζητηθεί από το λογισμικό.

- Αφαιρέστε τα αντιδραστήρια που καταναλώθηκαν και τα χρησιμοποιημένα αναλώσιμα όπως ζητείται από το πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασιών.
- Αδειάζετε τους περιέκτες αποβλήτων κενού καθημερινά. Ο πρώτος περιέκτης δεν θα πρέπει ποτέ να γεμίζει πάνω από το ήμισυ. Η υπερχειλίση των αποβλήτων κενού μπορεί να προκαλέσει ζημιά στην αντλία κενού και να μειώσει το εφαρμοζόμενο κενό του συστήματος.
- Για παρτίδες 24, 48 και 96 δειγμάτων, φορτώστε ένα πλήρες rack των ξεχωριστά καταμετρημένων άκρων 8 καναλιών, πριν από την έναρξη της μεθόδου.

Επεξεργασία δειγμάτων

Διαδικασία

1. Ολοκληρώστε τα παρακάτω βήματα για κάθε κλάσμα:
 - a. Φυγοκεντρήστε τα δείγματα που φέρουν γραμμωτό κωδικό στα 1.600 × g για 10 λεπτά στους 4 °C με το φρένο απενεργοποιημένο.
 - b. Αφαιρέστε τους σωλήνες δειγμάτων, όταν η φυγόκεντρος σταματήσει πλήρως. Ξεκινήστε την απομόνωση πλάσματος εντός 15 λεπτών μετά τη φυγοκέντρωση. Εάν παρέλθουν πάνω από 15 λεπτά, φυγοκεντρήστε ξανά.
2. Επιθεωρήστε κάθε σωλήνα ως προς την καταλληλότητα του δείγματος, επαληθεύοντας τις ακόλουθες απαιτήσεις:
 - Ο όγκος δείγματος είναι ο αναμενόμενος.
 - Σαφής διαχωρισμός ανάμεσα στα στρώματα ερυθρών αιμοσφαιρίων και πλάσματος των δειγμάτων είναι ορατός μετά τη φυγοκέντρωση.
 - Το επίπεδο του πλάσματος είναι τουλάχιστον 1,5 ml πάνω από τη λευκοκυτταρική στιβάδα (buffy coat).
 - Το δείγμα δεν έχει αιμολυθεί υπερβολικά (δηλ. το πλάσμα δεν έχει όψη με βαθύ κόκκινο χρώμα).
 - Το δείγμα δεν παρουσιάζει λιπαιμία (δηλ. το πλάσμα δεν έχει θολό λευκό χρώμα ή δεν είναι αδιαφανές και γαλακτώδες).
 - Το δείγμα δεν παρουσιάζει πήγματα.



ΠΡΟΣΟΧΗ

Τα δείγματα που υποβλήθηκαν σε ακατάλληλη αποθήκευση ή χειρισμό μπορεί να καταστούν ακατάλληλα. Εάν υποβληθούν σε επεξεργασία ακατάλληλα δείγματα μέσω της ροής εργασιών, μπορεί να προκαλέσουν απόφραξη της πλάκας δέσμευσης κατά τη διάρκεια εξαγωγών, καθώς και υπερχειλίση δειγμάτων σε παρακείμενα βιοθία.

3. Αποπωματίστε τους σωλήνες και φορτώστε τους στους φορείς σωλήνων. Φορτώστε όλα τα δείγματα και τυχόν μάρτυρες πλάσματος για την παρτίδα.

**ΠΡΟΣΟΧΗ**

Κατά τη διάρκεια ενός συμβάντος χειρισμού σφάλματος, αν παρουσιαστεί με την επιλογή Exclude (Αποκλεισμός), μην το επιλέξετε. Αν η μέθοδος δεν μπορεί να προχωρήσει πέρα από το συμβάν χειρισμού σφάλματος και έχετε περιορισμένες επιλογές χειρισμού σφάλματος, ματαιώστε την εκτέλεση.

Απομόνωση πλάσματος

Προετοιμασία

1. Επισημάνετε 1 πλάκα βοθρίων μεγάλου βάθους με την ένδειξη «Ενδιάμεσο πλάσμα» και εφαρμόστε έναν γραμμωτό κωδικό.
2. Επισημάνετε 1 πλάκα βοθρίων μεγάλου βάθους με την ένδειξη «Τελικό πλάσμα» και εφαρμόστε έναν γραμμωτό κωδικό.
3. Για παρτίδες 24, 48 και 96 δειγμάτων, φορτώστε ένα πλήρες rack των ξεχωριστά καταμετρημένων άκρων 8 καναλιών, πριν από την έναρξη της μεθόδου.

**ΠΡΟΣΟΧΗ**

Βεβαιωθείτε ότι έχετε χρησιμοποιήσει τον σωστό τύπο πλάκας για τις πλάκες «Ενδιάμεσο πλάσμα» και «Τελικό πλάσμα». Η χρήση δοχείου βοθρίων μεγάλου βάθους αντί πλάκας βοθρίων μεγάλου βάθους οδηγεί σε αμαλγάμωση των δειγμάτων και μπορεί να παραγάγει εσφαλμένα αποτελέσματα.

Διαδικασία

1. Ανοίξτε το AppLauncher και, στη συνέχεια, επιλέξτε **VeriSeq NIPT Method** (Μέθοδος VeriSeq NIPT).
2. Εισαγάγετε ένα μοναδικό αναγνωριστικό παρτίδας και όνομα χρήστη και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**. Το αναγνωριστικό παρτίδας μπορεί να περιέχει ≤ 26 χαρακτήρες. Μπορείτε να χρησιμοποιείτε αριθμούς, γράμματα, κάτω παύλες (_) ή παύλες (-). Για παράδειγμα: 2025-10-16_Batch3. Για το αναγνωριστικό παρτίδας δεν ισχύει διάκριση πεζών-κεφαλαίων. Τα αναγνωριστικά παρτίδας με διάκριση πεζών-κεφαλαίων δεν θεωρούνται μοναδικά. Τα ονόματα παρτίδας πρέπει να είναι μοναδικά και δεν πρέπει να διαφέρουν μόνο ως προς τα πεζά/κεφαλαία γράμματα. Για παράδειγμα, τα ονόματα Batch01 και batch01 δεν είναι μοναδικά. Αυτός ο ίδιος κανόνας ισχύει για την ονομασία των αναγνωριστικών δειγμάτων.
3. Επιλέξτε **New Batch** (Νέα παρτίδα).
4. Μετά την έναρξη, επιλέξτε **OK** για να ξεκινήσει η απομόνωση του πλάσματος.
5. Εκτελέστε ένα από τα παρακάτω βήματα:
 - Για να φορτώσετε ένα υπάρχον φύλλο δείγματος, επιλέξτε το φύλλο δείγματος που σχετίζεται με την παρτίδα και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.

- Για να προχωρήσετε χωρίς να επιλέξετε φύλλο δείγματος, επιλέξτε **No Sample Sheet** (Χωρίς φύλλο δείγματος).

Για πληροφορίες σχετικά με τη δημιουργία φύλλου δείγματος, ανατρέξτε στον *Οδηγό λογισμικού VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2* (αρ. εγγράφου 1000000067940).

ΣΗΜΕΙΩΣΗ Ο τύπος δείγματος, μονήρους ή διδύμου κύησης, πρέπει να καταγράφεται με ακρίβεια για κάθε δείγμα ώστε να διασφαλίζεται σωστή ανάλυση των δεδομένων. Εάν επιλέξετε **No Sample Sheet** (Χωρίς φύλλο δείγματος), βεβαιωθείτε ότι έχετε ορίσει προεπιλεγμένες τιμές δείγματος στα εργαλεία τεχνικής υποστήριξης του προγράμματος διαχείρισης ροής εργασιών. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στον *Οδηγό λογισμικού VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2* (αρ. εγγράφου 1000000067940).

6. Επιλέξτε το μέγεθος παρτίδας και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
7. Επιλέξτε τον αριθμό αρνητικών μαρτύρων ελέγχου (no template controls –NTC) και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
Οι υποδοχές των NTC είναι πάντα οι τελευταίες υποδοχές που επιλέγονται. Για παράδειγμα, με δύο NTC σε μια εκτέλεση 24 δειγμάτων, οι θέσεις 23 και 24 είναι NTC.
8. Επιβεβαιώστε ότι όλοι οι γραμμωτοί κωδικοί έχουν επικολληθεί και, στη συνέχεια, φορτώστε τα δείγματα, τα άκρα και τις πλάκες (με τον γραμμωτό κωδικό στραμμένο προς τα δεξιά) πάνω στον φορέα.

9. Επιλέξτε **OK** μετά από κάθε μήνυμα προτροπής για φόρτωση.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Στοιχείο	Θέση εργαστηρίου
24, 48, 96	Άκρο	7–12	Άκρα των 1.000 μl	5
			Άκρα των 1.000 μl (μόνο παρτίδα των 96)	4, 5
	Σωλήνας	15	Προετοιμασμένοι σωλήνες δειγμάτων αίματος 1–24 (για όλα τα μεγέθη παρτίδων)	1–24
	Σωλήνας	16	Προετοιμασμένοι σωλήνες δειγμάτων αίματος 25–48 (μόνο μέγεθος παρτίδας 48 και 96)	25–48
	Σωλήνας	17	Προετοιμασμένοι σωλήνες δειγμάτων αίματος 49–72 (μόνο μέγεθος παρτίδας 96)	49–72
	Σωλήνας	18	Προετοιμασμένοι σωλήνες δειγμάτων αίματος 73–96 (μόνο μέγεθος παρτίδας 96)	73–96
	Multiflex	19–24	Κενή πλάκα βοθρίων μεγάλου βάθους, Τελικό πλάσμα – με γραμμωτό κωδικό	4
	Multiflex	19–24	Κενή πλάκα βοθρίων μεγάλου βάθους, Ενδιάμεσο πλάσμα – με γραμμωτό κωδικό	5
	Αντιδραστήριο	47	[Προαιρετικά] Αλατούχο διάλυμα με φωσφορικό άλας-ρυθμιστικό διάλυμα Dulbecco (DPBS) – χρησιμοποιείται για αρνητικό μάρτυρα ελέγχου (no template control – NTC)	5

- Βεβαιωθείτε ότι οι φορείς, ο εξοπλισμός του εργαστηρίου και τα αντιδραστήρια έχουν φορτωθεί σωστά.
- Στην οθόνη Pre-Spin Deck Verification (Επαλήθευση θαλάμου προ περιστροφής), επιλέξτε **OK**.
- Παρατηρήστε το ML STAR να εκτελεί τα αυτοματοποιημένα βήματα.
- Όταν σας ζητηθεί από το πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασιών, βεβαιωθείτε ότι ο θάλαμος φόρτωσης του ML STAR είναι απαλλαγμένος από εμπόδια ώστε το ML STAR να μπορέσει να εκφορτώσει τους φορείς.
- Επιλέξτε **Unload** (Εκφόρτωση) για να εκφορτώσετε τον θάλαμο.

15. Αφαιρέστε την πλάκα βοθρίων μεγάλου βάθους «Ενδιάμεσο πλάσμα» ως εξής.
 - a. Επιθεωρήστε την πλάκα για να διαπιστώσετε αν υπάρχει συνέπεια όσον αφορά τους όγκους σε κάθε βοθρίο (κανένα σφάλμα πιπέτας). Ο αναμενόμενος όγκος είναι 1.000 μλ.
 - b. Καταγράψτε τυχόν ασυνέπειες όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία Plasma Isolation (Απομόνωση πλάσματος).
 - c. Στεγανοποιήστε την πλάκα, φορτώστε με ισορροπία και φυγοκεντρήστε στα $5.600 \times g$ για 10 λεπτά με το φρένο απενεργοποιημένο ή στη χαμηλότερη ρύθμιση.
16. Επιλέξτε **Yes** (Ναι) για να προχωρήσετε στην τελική διαδικασία Plasma Preparation (Προετοιμασία πλάσματος).
17. Αφαιρέστε τη στεγανοποίηση της πλάκας και φορτώστε την ξανά πάνω στον φορέα.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Στοιχείο	Θέση εργαστηρίου
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Πλάκα βοθρίων μεγάλου βάθους «Ενδιάμεσο πλάσμα»	5

18. Επιλέξτε το πλαίσιο ελέγχου **Intermediate Plasma plate has been spun** (Η πλάκα «Ενδιάμεσο πλάσμα» έχει περιστραφεί) και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
19. Παρατηρήστε το ML STAR να εκτελεί τα αυτοματοποιημένα βήματα.
20. Όταν σας ζητηθεί από το πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασιών, βεβαιωθείτε ότι ο θάλαμος φόρτωσης του ML STAR είναι απαλλαγμένος από εμπόδια ώστε το ML STAR να μπορέσει να εκφορτώσει τους φορείς.
21. Επιλέξτε **Unload** (Εκφόρτωση) για να εκφορτώσετε τον θάλαμο.
22. Όταν σας ζητηθεί από το πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασιών, αδειάστε τους φορείς και τον θάλαμο.
23. Αφαιρέστε την πλάκα βοθρίων μεγάλου βάθους «Τελικό πλάσμα».
24. Επιθεωρήστε την πλάκα για τα ακόλουθα σφάλματα:
 - ασυνεπείς όγκοι σε κάθε βοθρίο. Ο αναμενόμενος όγκος είναι 900 μλ.
 - Ορατά ιζήματα κυττάρων.
 - Υπερβολική αιμόλυση.
 Εάν παρατηρήσετε μη φυσιολογικά ορατά ιζήματα κυττάρων ή υπερβολική αιμόλυση, ακυρώστε το επηρεαζόμενο δείγμα στο τέλος της μεθόδου Plasma Isolation (Απομόνωση πλάσματος) ή χρησιμοποιήστε το πρόγραμμα διαχείρισης παρτίδων. Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με το πρόγραμμα διαχείρισης παρτίδων, ανατρέξτε στον *Οδηγό λογισμικού VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2 (αρ. εγγράφου 1000000067940)*.
25. Όταν σας ζητηθεί από το πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασιών, επιλέξτε **OK**.
26. Εισαγάγετε σχόλια σχετικά με επηρεαζόμενα βοθρία και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
27. Εκτελέστε ένα από τα παρακάτω βήματα.
 - Για να προχωρήσετε στην εξαγωγή cfDNA, επιλέξτε **Yes** (Ναι).

- Για να διακόψετε, επιλέξτε **Exit** (Έξοδος).

ΣΗΜΕΙΟ ΑΣΦΑΛΟΥΣ ΔΙΑΚΟΠΗΣ

Εάν διακόψετε, στεγανοποιήστε την πλάκα «Τελικό πλάσμα» και αποθηκεύστε σε θερμοκρασία 2 °C έως 8 °C για έως 7 ημέρες.

Εξαγωγή cfDNA

Προετοιμασία

1. Επιθεωρήστε οπτικά τα κιβώτια εξαγωγής και βοηθητικών εξαρτημάτων για να βεβαιωθείτε ότι το κιτ δεν έχει λήξει.
2. Προετοιμάστε τα παρακάτω αντιδραστήρια. Επισημάνετε τα κύπελλα των δοχείων και τα δοχεία βοθρίων μεγάλου βάθους με το όνομα των αντιδραστηρίων.

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες
Πλάκα βοθρίων μεγάλου βάθους «Τελικό πλάσμα»	2 °C έως 8 °C	Εάν ήταν αποθηκευμένη προηγουμένως, αφήστε τη για 30 λεπτά ώστε να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Φυγοκεντρήστε στα 1.000 × g για 20 δευτερόλεπτα. Αφαιρέστε τη στεγανοποίηση της πλάκας βοθρίων μεγάλου βάθους «Τελικό πλάσμα» πριν από τη χρήση.

3. Προσθέστε αργά 3,75 ml ρυθμιστικό διάλυμα πρωτεΐνάσης σε κάθε φιαλίδιο αντιδραστηρίου πρωτεΐνάσης K.
 - Προετοιμάστε 3 φιαλίδια για 24 και 48 δείγματα.
 - Προετοιμάστε 4 φιαλίδια για 96 δείγματα.
4. Πωματίστε τα φιαλίδια πρωτεΐνάσης K και αναδεύστε μέχρι να επανεναιωρηθούν.



ΠΡΟΣΟΧΗ

Μη μολύνετε το ελαστικό πώμα. Η επαφή άλλων ουσιών με το ελαστικό πώμα μπορεί να προκαλέσει μόλυνση μελλοντικών δειγμάτων.

5. Δεξαμενοποιήστε την προετοιμασμένη πρωτεΐνάση K από όλα τα φιαλίδια σε ένα κύπελλο αντιδραστηρίων και επισημάνετε το ως «Πρωτεΐνάση K».
6. Προσθέστε 100 ml EtOH 100% σε κάθε φιάλη αντιδραστηρίων του ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης II.
 - Προετοιμάστε 1 φιάλη για 24 και 48 δείγματα.
 - Προετοιμάστε 2 φιάλες για 96 δείγματα.
7. Αναστρέψτε τις φιάλες ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης II για να αναμείξετε.

8. Σημειώστε τα πλαίσια ελέγχου στις φιάλες ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης II.
9. Επισημάνετε 1 νέα πλάκα με πλήρη επένδυση με την ένδειξη «Ενδιάμεση» και εφαρμόστε έναν γραμμωτό κωδικό πλάκας.
10. Επισημάνετε 1 νέα πλάκα με πλήρη επένδυση με την ένδειξη «Έκλυση cfDNA» και εφαρμόστε έναν γραμμωτό κωδικό πλάκας.
11. Επισημάνετε 1 νέα πλάκα βοθρίων μεγάλου βάθους με την ένδειξη «Εξαγωγή, Ενδιάμεση» και εφαρμόστε έναν γραμμωτό κωδικό πλάκας βοθρίων μεγάλου βάθους.
12. Εφαρμόστε έναν γραμμωτό κωδικό πλάκας στην πλάκα «Δέσμευση DNA».
13. Εφαρμόστε μια στεγανοποίηση αλουμινίου στα μη χρησιμοποιημένα βοθρία για παρτίδες 24 και 48 δειγμάτων.
14. Προετοιμάστε ένα καθαριστικό διάλυμα EtOH 70% (70% EtOH, 30% νερό ελεύθερο από DNase/RNase) για τον καθαρισμό του συστήματος κενού.
15. Προετοιμάστε το σύστημα κενού ως εξής.
 - a. Αφαιρέστε την πολλαπλή κενού και καθαρίστε με EtOH 70%.
Αποφύγετε να καθαρίσετε τη φλάντζα με EtOH διότι το υλικό μπορεί να καταστεί εύθραυστο.
 - b. Καθαρίστε τα απόβλητα κενού.
 - c. Βεβαιωθείτε ότι το σύστημα κενού του ML STAR είναι ενεργοποιημένο.

Διαδικασία

1. Επιλέξτε **OK** για να ξεκινήσει η εξαγωγή cfDNA.
2. Εάν δεν είναι ανοικτό το **VeriSeq NIPT Method** (Μέθοδος VeriSeq NIPT):
 - a. Ανοίξτε το AppLauncher και, στη συνέχεια, επιλέξτε **VeriSeq NIPT Method** (Μέθοδος VeriSeq NIPT).
 - b. Εισαγάγετε το αναγνωριστικό παρτίδας και το όνομα χρήστη και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
3. Φορτώστε τα άκρα στους φορείς άκρων ως εξής και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.



ΠΡΟΣΟΧΗ

Πριν από την έναρξη της μεθόδου για παρτίδες 24, 48 και 96 δειγμάτων, προσθέστε πλήρες rack άκρων 8 καναλιών.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Στοιχείο	Θέση εργαστηρίου
24	Άκρο	1–6	Άκρα των 1.000 µl	1
		7–12	Άκρα των 300 µl	1
48	Άκρο	1–6	Άκρα των 1.000 µl	1, 2
		7–12	Άκρα των 300 µl	1
96	Άκρο	1–6	Άκρα των 1.000 µl	1, 2, 3, 4
		7–12	Άκρα των 300 µl	1

4. Φορτώστε τα μετρημένα άκρα στους φορείς άκρων ως εξής.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Στοιχείο	Θέση εργαστηρίου
24, 48, 96	Άκρο	49–54	Άκρα των 1.000 μl	1
			Άκρα των 300 μl	2
			Άκρα των 50 μl	3

5. Εισαγάγετε τη θέση του πρώτου και τελευταίου άκρου για κάθε rack άκρων και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
6. Σαρώστε τους γραμμωτούς κωδικούς του κιβωτίου εξαγωγής.
7. Εισαγάγετε το όνομα χρήστη ή τα αρχικά του ατόμου που προετοιμάζει το αντιδραστήριο και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
8. Σαρώστε τους γραμμωτούς κώδικες του κιβωτίου βοηθητικών εξαρτημάτων.
9. Εισαγάγετε το όνομα χρήστη ή τα αρχικά του ατόμου που προετοιμάζει το αντιδραστήριο και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
10. Επιβεβαιώστε ότι οι γραμμωτοί κωδικοί είναι επικολλημένοι.
11. Αφαιρέστε τη στεγανοποίηση της πλάκας βοθρίων μεγάλου βάθους «Τελικό πλάσμα» αν είναι απαραίτητο.
12. Φορτώστε τις πλάκες (με τον γραμμωτό κωδικό στραμμένο προς τα δεξιά) στον φορέα πλακών ως εξής και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Στοιχείο	Θέση εργαστηρίου
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Νέα πλάκα με πλήρη επένδυση, «Ενδιάμεση», με γραμμωτό κωδικό	1
			Νέα πλάκα με πλήρη επένδυση, «Έκλυση cfDNA», με γραμμωτό κωδικό	2
			Νέα πλάκα βοθρίων μεγάλου βάθους, «Εξαγωγή, ενδιάμεση», με γραμμωτό κωδικό	4
			Πλάκα βοθρίων μεγάλου βάθους «Τελικό πλάσμα», με γραμμωτό κωδικό	5

13. Επιβεβαιώστε ότι η πλάκα «Δέσμευση DNA» φέρει γραμμωτό κωδικό και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
14. Για τις παρτίδες μερικών πλακών, εφαρμόστε μια περικυκλωμένη στεγανοποίηση πλάκας πάνω στα μη χρησιμοποιούμενα βοθρία (στήλες 4–12 για τις παρτίδες 24 δειγμάτων και στήλες 7–12 για τις παρτίδες 48 δειγμάτων).
15. Φορτώστε την πλάκα «Δέσμευση DNA» πάνω στην πολλαπλή κενού με τον γραμμωτό κωδικό στραμμένο προς τα δεξιά.


16. Πριν από την τοποθέτηση της πλάκας δέσμευσης στην πολλαπλή BVS, επιθεωρήστε οπτικά τα βοθρία για τυχόν πιθανά εμπόδια.
Αυτά μπορούν να παρεμποδίσουν τη ροή αντιδραστηρίων υπό κενό.
17. Αν χρησιμοποιούνται παρτίδες 24 ή 48 δειγμάτων, καλύψτε τα μη χρησιμοποιημένα βοθρία και στεγανοποιήστε με στεγανοποίηση αλουμινίου. Επιλέξτε το πλαίσιο ελέγχου **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (Οι στήλες των πλακών «Δέσμευση DNA» είναι στεγανοποιημένες;) και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
18. Φορτώστε τα κύπελλα αντιδραστηρίων στον φορέα αντιδραστηρίων ως εξής και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Στοιχείο	Θέση εργαστηρίου
24, 48	Αντιδραστήριο	47	16 ml ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης	1
			11 ml πρωτεΐνάσης K	2
96	Αντιδραστήριο	47	16 ml ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης	1
			15 ml πρωτεΐνάσης K	2

19. Μεταφέρετε τα καθορισμένα αντιδραστήρια στα δοχεία βοθρίων μεγάλου βάθους και, στη συνέχεια, φορτώστε τα δοχεία πάνω στους φορείς βοθρίων μεγάλου βάθους ως εξής.

20. Επιλέξτε **OK**.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Στοιχείο	Θέση εργαστηρίου
24, 48	Βοθρίων μεγάλου βάθους	39–44	125 ml ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης II	1
			125 ml ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης I	2
			60 ml EtOH 100%	3
			100 ml ρυθμιστικού διαλύματος λύσης	4
			60 ml νερού ελεύθερου από DNase/RNase	5
96	Βοθρίων μεγάλου βάθους	39–44	200 ml ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης II	1
			125 ml ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης I	2
			100 ml EtOH 100%	3
			100 ml ρυθμιστικού διαλύματος λύσης	4
			100 ml νερού ελεύθερου από DNase/RNase	5

21. Περιμένετε μέχρι να ολοκληρωθεί ο αυτοματοποιημένος έλεγχος όγκου αντιδραστηρίων.
22. Επιβεβαιώστε ότι η φιάλη απόβλητων κενού είναι κενή (συνιστάται να είναι γεμάτη κατά το ήμισυ) και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
23. Επιβεβαιώστε την τοποθέτηση όλων των φορέων, του εξοπλισμού εργαστηρίου και των αντιδραστηρίων και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK** στην οθόνη «Extraction Deck Verification» (Επαλήθευση θαλάμου εξαγωγής) .
24. Παρατηρείτε το ML STAR κατά τη διάρκεια των αυτοματοποιημένων βημάτων.
-  Πρέπει να ακυρώνετε χειροκίνητα τις υπερχειλίσσεις δειγμάτων που δεν ανιχνεύει το σύστημα προτού προκληθεί μόλυνση των παρακείμενων βοθρίων.
25. Μετά το τελικό βήμα κενού, αφαιρέστε την πλάκα «Δέσμευση DNA» και καθαρίστε την κάτω επιφάνεια με EtOH 70%.
26. Στεγανοποιήστε τυχόν ακάλυπτα βοθρία στην πλάκα «Δέσμευση DNA» και, στη συνέχεια, τοποθετήστε την πλάκα «Δέσμευση DNA» στην κενή πλάκα βοθρίων μεγάλου βάθους «Τελικό πλάσμα».
27. Φυγοκεντρήστε το συγκρότημα πλακών «Δέσμευση DNA»/«Τελικό πλάσμα» στα 5.600 × g για 10 λεπτά με το φρένο ενεργοποιημένο.

28. Επιλέξτε **OK**.
29. Κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρισης της πλάκας «Δέσμευση DNA», ολοκληρώστε τον καθαρισμό κενού:
- Αφαιρέστε την πολλαπλή κενού και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
 - Περιμένετε μέχρι να ολοκληρωθεί η αυτοματοποιημένη απόρριψη αποβλήτων.
 - Καθαρίστε την πολλαπλή κενού και το εσωτερικό του συστήματος κενού με EtOH 70% και, στη συνέχεια, αντικαταστήστε την πολλαπλή κενού.
 - Επιλέξτε το πλαίσιο ελέγχου **Manifold is on Vacuum** (Η πολλαπλή είναι στη λειτουργία κενού) για να ξεκινήσει η μεταφορά της πλάκας έκλουσης στην πολλαπλή κενού και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
30. Μετά τη φυγοκέντρωση, αφαιρέστε τη στεγανοποίηση από τα βοηθία που περιέχουν δείγματα στην πλάκα «Δέσμευση DNA».
31. Τοποθετήστε την πλάκα «Δέσμευση DNA» επάνω από την πλάκα «Έκλουση cfDNA» που βρίσκεται πάνω στην πολλαπλή κενού.
32. Φορτώστε την πλάκα «Δέσμευση DNA» με τον γραμμωτό κωδικό στραμμένο προς τα δεξιά και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
33. Παρατηρείτε το ML STAR κατά τη διάρκεια των αυτοματοποιημένων βημάτων.
34. Μετά το βήμα επώασης, επιλέξτε το πλαίσιο ελέγχου **Plates are assembled as indicated** (Οι πλάκες είναι συγκεντρωμένες όπως υποδεικνύεται). Επιβεβαιώστε ότι το συγκρότημα πλακών «Δέσμευση DNA»/«Έκλουση cfDNA» βρίσκεται πάνω σε μια βάση στήριξης (εάν απαιτείται από τη φυγόκεντρο).
35. Στεγανοποιήστε τα ακάλυπτα βοηθία πάνω στην πλάκα «Δέσμευση DNA».
36. Φυγοκεντρήστε στα 5.600 × g για 2 λεπτά με το φρένο ενεργοποιημένο και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
37. Επιθεωρήστε οπτικά την πλάκα «Έκλουση cfDNA» για να διαπιστώσετε αν υπάρχει συνέπεια όσον αφορά τους όγκους σε κάθε βοηθίο.
Ο αναμενόμενος όγκος είναι περίπου 55 μl.
38. Στεγανοποιήστε και διατηρήστε την πλάκα «Έκλουση cfDNA» για προετοιμασία βιβλιοθηκών.
39. Όταν σας ζητηθεί από το πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασιών, βεβαιωθείτε ότι ο θάλαμος φόρτωσης του ML STAR είναι απαλλαγμένος από εμπόδια ώστε το ML STAR να μπορέσει να εκφορτώσει τους φορείς.
40. Επιλέξτε **Unload** (Εκφόρτωση) για να εκφορτώσετε τον θάλαμο.
41. Εκφορτώστε όλους τους φορείς και καθαρίστε τον θάλαμο του ML STAR και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
42. Εισαγάγετε σχόλια σχετικά με επηρεαζόμενα βοηθία και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
43. Εκτελέστε ένα από τα παρακάτω βήματα:
- Για να συνεχίσετε στο Prepare Libraries (Προετοιμασία βιβλιοθηκών), επιλέξτε **Yes** (Ναι).
 - Για να διακόψετε, επιλέξτε **Exit** (Έξοδος).

ΣΗΜΕΙΟ ΑΣΦΑΛΟΥΣ ΔΙΑΚΟΠΗΣ

Εάν διακόψετε, στεγανοποιήστε την πλάκα «Έκλουση cfDNA» και αποθηκεύστε σε θερμοκρασία -25 °C έως -15 °C για έως 7 ημέρες.

Προετοιμασία βιβλιοθηκών

Προετοιμασία

1. Επιθεωρήστε οπτικά τα κιβώτια προετοιμασίας βιβλιοθηκών και βοηθητικών εξαρτημάτων για να επιβεβαιώσετε ότι τα κιτ δεν έχουν λήξει.
2. Προετοιμάστε τα παρακάτω αντιδραστήρια. Επισημάνετε τα κύπελλα δοχείων και τα δοχεία βοθρίων μεγάλου βάθους με τα ονόματα των αντιδραστηρίων.

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες
Μείγμα A-tailing	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου. Αναδεύστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
Πλάκα «Εκλουση cfDNA»	-25 °C έως -15 °C	Εάν ήταν αποθηκευμένη προηγουμένως, επιβεβαιώστε ότι η πλάκα δεν αποθηκεύτηκε για πάνω από 7 ημέρες και αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου. Αναδεύστε στα 1.500 rpm για 1 λεπτό. Φυγοκεντρήστε στα 1.000 × g για 20 δευτερόλεπτα.
Μείγμα επιδιόρθωσης άκρων	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου. Αναδεύστε για ανάμειξη.
Ρυθμιστικό διάλυμα υβριδισμού	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου. Αναδεύστε για ανάμειξη. Επιστρέψτε το στην αποθήκευση μετά τη χρήση.
Μείγμα απολίνωσης	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου. Αναδεύστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
Πλάκα προσαρμογέα DNA NIPT	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου. Αναδεύστε για ανάμειξη. Φυγοκεντρήστε στα 1.000 × g για 20 δευτερόλεπτα.
Ρυθμιστικό διάλυμα επανεναιώρησης	2 °C έως 8 °C	Αναδεύστε για ανάμειξη. Επιστρέψτε το στην αποθήκευση μετά τη χρήση.
Σφαιρίδια καθαρισμού δειγμάτων	2 °C έως 8 °C	Αφήστε τα για 30 λεπτά ώστε να έλθουν σε θερμοκρασία δωματίου. Αναδεύστε δυνατά πριν από κάθε χρήση. Αναμείξτε με ανάδευση ή αναστροφή μέχρι όλα τα σφαιρίδια να εναιωρηθούν και το μείγμα να γίνει ομοιογενές.

**ΠΡΟΣΟΧΗ**

Κατά την αφαίρεση της στεγανοποίησης της πλάκας προσαρμογέα DNA NIPT, προσέχετε ιδιαίτερα ώστε να αποφύγετε τη διασταυρούμενη μόλυνση αερολύματος μεταξύ βοθρίων που μπορεί να παράξει εσφαλμένα αποτελέσματα.

3. Αν η πλάκα «Έκλουση cfDNA» έχει αποθηκευτεί κατεψυγμένη, προετοιμάστε την ως εξής.
 - a. Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.
 - b. Αναδεύστε στα 1.500 rpm για 1 λεπτό.
 - c. Φυγοκεντρήστε στα 1.000 × g για 20 δευτερόλεπτα.
4. Επισημάνετε μία νέα πλάκα με πλήρη επένδυση με την ένδειξη «Βιβλιοθήκες» και εφαρμόστε έναν γραμμωτό κωδικό πλάκας.
5. Προετοιμάστε EtOH 80% από απόλυτο EtOH. Συνδυάστε 40 ml EtOH 100% και 10 ml νερού ελεύθερου από DNase/RNase. Αναστρέψτε για ανάμιξη.
6. Βεβαιωθείτε ότι ο θερμικός έλεγχος του ML STAR είναι ενεργοποιημένος.

Αραίωση ενζύμων

1. Συνδυάστε μείγμα A-tailing και ρυθμιστικό διάλυμα επανεναιώρησης σε έναν σωλήνα με βιδωτό πώμα. Αναδεύστε για ανάμιξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Μείγμα A-tailing (μl)	Ρυθμιστικό διάλυμα επανεναιώρησης (μl)
24, 48	900	1.200
96	1.800	2.400

2. Συνδυάστε μείγμα απολίνωσης και ρυθμιστικό διάλυμα επανεναιώρησης σε έναν σωλήνα με βιδωτό πώμα. Αναδεύστε για ανάμιξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Μείγμα απολίνωσης (μl)	Ρυθμιστικό διάλυμα επανεναιώρησης (μl)
24, 48	230	1.713
96	440	3.278

Διαδικασία

1. Επιλέξτε **OK** για να ξεκινήσει το Library Preparation (Προετοιμασία βιβλιοθήκης). Εάν το **VeriSeq NIPT Method** (Μέθοδος VeriSeq NIPT) δεν είναι ήδη ανοικτό:
 - a. Ανοίξτε το AppLauncher και επιλέξτε **VeriSeq NIPT Method** (Μέθοδος VeriSeq NIPT).
 - b. Εισαγάγετε το αναγνωριστικό παρτίδας και το όνομα χρήστη και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.

2. Επιβεβαιώστε ότι τα παρακάτω αναλώσιμα έχουν προετοιμαστεί όπως υποδεικνύεται στην οθόνη «Reagent Preparation» (Προετοιμασία αντιδραστηρίων):
 - Μείγμα A-tailing, μείγμα απολίνωσης και EtOH 80%.
 - Σφαιρίδια καθαρισμού δειγμάτων, μείγμα επιδιόρθωσης άκρων και πλάκα προσαρμογέα DNA NIPT.
3. Επιλέξτε τα πλαίσια ελέγχου και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
4. Σαρώστε τους γραμμωτούς κωδικούς του κιβωτίου προετοιμασίας βιβλιοθηκών.
5. Εισαγάγετε το όνομα χρήστη ή τα αρχικά του ατόμου που προετοιμάζει το αντιδραστήριο και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
6. Σαρώστε τους γραμμωτούς κώδικες του κιβωτίου βοηθητικών εξαρτημάτων.
7. Εισαγάγετε το όνομα χρήστη ή τα αρχικά του ατόμου που προετοιμάζει το αντιδραστήριο και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
8. Φορτώστε τα άκρα στους φορείς άκρων ως εξής και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK** για κάθε φορέα.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Στοιχείο	Θέση εργαστηρίου
24	Άκρο	1-6	Άκρα των 50 μl	1
		7-12	Άκρα των 300 μl	1, 2
48	Άκρο	1-6	Άκρα των 50 μl	1, 2
		7-12	Άκρα των 300 μl	1, 2, 3, 4
96	Άκρο	1-6	Άκρα των 50 μl	1, 2, 3, 4
		7-12	Άκρα των 300 μl	1, 2, 3, 4, 5

9. Εάν διακόψατε το πρωτόκολλο μετά τη διαδικασία εξαγωγής cfDNA, φορτώστε τα μετρημένα άκρα στους φορείς άκρων ως εξής.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Στοιχείο	Θέση εργαστηρίου
24, 48, 96	Άκρο	49-54	Άκρα των 1.000 μl	1
			Άκρα των 300 μl	2
			Άκρα των 50 μl	3

10. Εισαγάγετε τη θέση του πρώτου άκρου για κάθε rack άκρων και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.

11. Επιβεβαιώστε ότι οι γραμμωτοί κωδικοί έχουν επικολληθεί και φορτώστε τις πλάκες (με τον γραμμωτό κωδικό στραμμένο προς τα δεξιά) πάνω στον φορέα πλακών ως εξής και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Στοιχείο	Θέση εργαστηρίου
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Πλάκα «Έκλουση cfDNA», με γραμμωτό κωδικό	1
			Πλάκα «Προσαρμογέας DNA» NIPT, με γραμμωτό κωδικό	2
			Νέα πλάκα 96 βοθρίων με πλήρη επένδυση, «Βιβλιοθήκες», με γραμμωτό κωδικό	3
			Νέες πλάκες 96 βοθρίων με πλήρη επένδυση	4, 5

12. Φορτώστε τον φορέα βοθρίων μεγάλου βάθους ως εξής και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Στοιχείο	Θέση εργαστηρίου
24, 48, 96	Βοθρίων μεγάλου βάθους	39–44	50 ml EtOH 80% σε δοχείο βοθρίων μεγάλου βάθους	1
			Νέες πλάκες 96 βοθρίων με πλήρη επένδυση	2, 3, 4, 5

13. Φορτώστε τα δοχεία αντιδραστηρίων στον φορέα αντιδραστηρίων ως εξής και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Στοιχείο	Θέση εργαστηρίου
24, 48, 96	Αντιδραστήριο	47	2,5 ml μείγματος επιδιόρθωσης άκρων	1
			Προετοιμασμένο μείγμα A-tailing (συνολικός όγκος)	2
			Προετοιμασμένο μείγμα απολίνωσης (συνολικός όγκος)	3
			10 ml σφαιριδίων καθαρισμού δειγμάτων	4
			12 ml ρυθμιστικού διαλύματος υβριδισμού	5

14. Αποθηκεύστε το υπόλοιπο από τα 12 ml ρυθμιστικού διαλύματος υβριδισμού (HT1) στον περιέκτη για δεξαμενοποίηση.
15. Βεβαιωθείτε ότι οι φορείς, ο εξοπλισμός του εργαστηρίου και τα αντιδραστήρια έχουν φορτωθεί όπως υποδεικνύεται και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK** στην οθόνη Library Deck Verification (Επαλήθευση θαλάμου βιβλιοθήκης).
16. Περιμένετε μέχρι να ολοκληρωθεί ο αυτοματοποιημένος έλεγχος όγκου αντιδραστηρίων.
17. Παρατηρείτε το ML STAR κατά τη διάρκεια των αυτοματοποιημένων βημάτων.
18. Όταν σας ζητηθεί από το πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασιών, βεβαιωθείτε ότι ο θάλαμος φόρτωσης του ML STAR είναι απαλλαγμένος από εμπόδια ώστε το ML STAR να μπορέσει να εκφορτώσει τους φορείς.
19. Επιλέξτε **Unload** (Εκφόρτωση) για να εκφορτώσετε τον θάλαμο.
20. Επιθεωρήστε την πλάκα «Βιβλιοθήκης» για να διαπιστώσετε αν υπάρχει συνέπεια όσον αφορά τους όγκους σε κάθε βοθρίο.

**ΠΡΟΣΟΧΗ**

Εάν δεν υπάρχει συνέπεια στους όγκους των βοθρίων, τα δείγματα μπορεί να παραγάγουν εσφαλμένα αποτελέσματα.

21. Σε περίπτωση αποθήκευσης, στεγανοποιήστε και διατηρήστε την πλάκα «Βιβλιοθήκης».
22. Εκφορτώστε τους φορείς, καθαρίστε τον θάλαμο και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
23. Εισαγάγετε σχόλια σχετικά με επηρεαζόμενα βοθρία και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
24. Εκτελέστε ένα από τα παρακάτω βήματα:
 - Για να συνεχίσετε στο Quantify Libraries (Ποσοτικός προσδιορισμός βιβλιοθηκών), επιλέξτε **Yes** (Ναι).
 - Για να διακόψετε, επιλέξτε **Exit** (Έξοδος).

ΣΗΜΕΙΟ ΑΣΦΑΛΟΥΣ ΔΙΑΚΟΠΗΣ

Εάν διακόψετε, στεγανοποιήστε την πλάκα «Βιβλιοθήκης» πριν από την αποθήκευση. Η πλάκα «Βιβλιοθήκης» διατηρεί τη σταθερότητά της για έως 7 ημέρες από την ημερομηνία προετοιμασίας σε θερμοκρασία -25 °C έως -15 °C.

Ποσοτικός προσδιορισμός βιβλιοθηκών

Προετοιμασία

1. Προετοιμάστε τα παρακάτω αντιδραστήρια:

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες
Αντιδραστήριο ποσοτικού προσδιορισμού DNA	2 °C έως 8 °C	Προστατεύετε από το φως. Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου για 30–150 λεπτά. (Συνιστάται η αφαίρεση αντιδραστηρίου στην αρχή της διαδικασίας προετοιμασίας βιβλιοθηκών). Αναδεύστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
Πρότυπο ποσοτικού προσδιορισμού DNA	2 °C έως 8 °C	Αναδεύστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
Ρυθμιστικό διάλυμα επανεναιώρησης	2 °C έως 8 °C	Αναδεύστε για ανάμειξη.

2. Αν η πλάκα «Βιβλιοθήκες» έχει αποθηκευτεί κατεψυγμένη, προετοιμάστε την ως εξής.
 - a. Επιβεβαιώστε ότι η πλάκα δεν αποθηκεύτηκε για πάνω από 7 ημέρες και αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.
 - b. Αναδεύστε για ανάμειξη.
 - c. Φυγοκεντρήστε στα 1.000 × g για 1 λεπτό.
3. Ενεργοποιήστε το φθορισμόμετρο 10 λεπτά πριν από τη χρήση.
4. Εφαρμόστε έναν γραμμωτό κωδικό πλάκας σε μια νέα πλάκα 384 βοθρίων.
5. Εφαρμόστε έναν γραμμωτό κωδικό πλάκας σε μια νέα πλάκα με πλήρη επένδυση.

Διαδικασία

1. Επιλέξτε **OK** για να ξεκινήσει ο ποσοτικός προσδιορισμός.
2. Εάν η μέθοδος VeriSeq NIPT δεν είναι ήδη ανοικτή:
 - a. Ανοίξτε το AppLauncher και επιλέξτε **VeriSeq NIPT Method** (Μέθοδος VeriSeq NIPT).
 - b. Εισαγάγετε το αναγνωριστικό παρτίδας και το όνομα χρήστη και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
3. Σαρώστε τους γραμμωτούς κώδικες του κιβωτίου βοηθητικών εξαρτημάτων.
4. Εισαγάγετε το όνομα χρήστη ή τα αρχικά του ατόμου που προετοιμάζει το αντιδραστήριο και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.

5. Φορτώστε τα άκρα στον φορέα άκρων ως εξής και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Στοιχείο	Θέση εργαστηρίου
24, 48	Άκρο	1-6	Rack άκρων των 300 μl	1
			Rack άκρων των 50 μl	2
96	Άκρο	1-6	Rack άκρων των 300 μl	1
			Rack άκρων των 50 μl	2, 3

6. Επιβεβαιώστε ότι οι γραμμωτοί κωδικοί είναι επικολλημένοι.
 7. Αν χρειάζεται, αφαιρέστε τη στεγανοποίηση της πλάκας «Βιβλιοθήκες».
 8. Φορτώστε τις πλάκες (με τον γραμμωτό κωδικό στραμμένο προς τα δεξιά) στον φορέα Multiflex ως εξής και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Στοιχείο	Θέση εργαστηρίου
24, 48, 96	Multiflex	19-24	Νέες πλάκες με πλήρη επένδυση, με γραμμωτό κωδικό	1
			Νέα πλάκα 384 βοθρίων, με γραμμωτό κωδικό	2
			Πλάκα «Βιβλιοθήκες», με γραμμωτό κωδικό	3
			Νέες πλάκες 96 βοθρίων με πλήρη επένδυση	4, 5

9. Φορτώστε τους σωλήνες αντιδραστηρίων χωρίς τα πώματα στον φορέα σωλήνων ως εξής και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Στοιχείο	Θέση εργαστηρίου
24, 48, 96	Σωλήνας	46	Πρότυπο ποσοτικού προσδιορισμού DNA	1
			Αντιδραστήριο ποσοτικού προσδιορισμού DNA	2

10. Φορτώστε τα κύπελλα αντιδραστηρίων στον φορέα αντιδραστηρίων ως εξής και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Στοιχείο	Θέση εργαστηρίου
24, 48, 96	Αντιδραστήριο	47	Νέο κύπελλο αντιδραστηρίων (κενό)	1
			16 ml ρυθμιστικού διαλύματος επανεναιώρησης	2

11. Εάν διακόψατε το πρωτόκολλο μετά τη διαδικασία προετοιμασίας βιβλιοθήκης, φορτώστε τα μετρημένα άκρα στους φορείς άκρων ως εξής.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Στοιχείο	Θέση εργαστηρίου
24, 48, 96	Άκρο	49–54	Άκρα των 1.000 μl	1
			Άκρα των 300 μl	2
			Άκρα των 50 μl	3

12. Εισαγάγετε τη θέση του πρώτου και τελευταίου άκρου για κάθε rack άκρων και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
13. Βεβαιωθείτε ότι οι φορείς, ο εξοπλισμός του εργαστηρίου και τα αντιδραστήρια έχουν φορτωθεί όπως υποδεικνύεται και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK** στην οθόνη «Quant Deck Verification» (Ποσοτική επαλήθευση θαλάμου).
14. Περιμένετε μέχρι να ολοκληρωθεί ο αυτοματοποιημένος έλεγχος όγκου αντιδραστηρίων.
15. Παρατηρείτε το ML STAR κατά τη διάρκεια των αυτοματοποιημένων βημάτων.
16. Όταν σας ζητηθεί από το πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασιών, βεβαιωθείτε ότι ο θάλαμος φόρτωσης του ML STAR είναι απαλλαγμένος από εμπόδια ώστε το ML STAR να μπορέσει να εκφορτώσει τους φορείς.
17. Επιλέξτε **Unload** (Εκφόρτωση) για να εκφορτώσετε τον θάλαμο.
18. Εκφορτώστε την πλάκα «Βιβλιοθήκες».
- Επιθεωρήστε την πλάκα για να διαπιστώσετε αν υπάρχει συνέπεια όσον αφορά τους όγκους σε κάθε βοθρίο.
 - Στεγανοποιήστε την πλάκα «Βιβλιοθήκες» και αποθηκεύστε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να ολοκληρωθεί η φθορισμομετρική ανάλυση δεδομένων.
19. Εκφορτώστε τις υπόλοιπες πλάκες 96 βοθρίων και ελέγξτε αν υπάρχει συνέπεια όσον αφορά τους όγκους σε κάθε βοθρίο.
- Τα μεγάλα σφάλματα όγκου μπορεί να υποδεικνύουν πρόβλημα με τα βήματα μεταφοράς με πιπέτα.

20. Εκφορτώστε την πλάκα 384 βοθρίων και ελέγξτε αν υπάρχει υγρό στα κατάλληλα βοθρία.
21. Στεγανοποιήστε την πλάκα με στεγανοποίηση αλουμινίου.
22. Φυγοκεντρήστε στα 1.000 × g για 20 δευτερόλεπτα.
23. Επιάστε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά μακριά από το φως.
24. Εκφορτώστε όλους τους φορείς.
25. Καθαρίστε τον θάλαμο του ML STAR και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.



ΠΡΟΣΟΧΗ

Μην απορρίπτετε τα αντιδραστήρια ποσοτικού προσδιορισμού μέχρι να ληφθούν δεδομένα. Χρειάζεστε τα αντιδραστήρια εάν χρειάζεται να εκτελέσετε εκ νέου ποσοτικό προσδιορισμό.

26. Μετά την επώαση, αφαιρέστε τη στεγανοποίηση αλουμινίου και φορτώστε την πλάκα 384 βοθρίων στη συσκευή ανάγνωσης μικροπλάκων. Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείτε τη μοβ πλάκα προσαρμογέα (αρ. είδους: 0310-4336) που παρέχεται από τη Molecular Devices ή αντίστοιχη αν εφαρμόζεται από το όργανο που χρησιμοποιείται.
 - Βεβαιωθείτε ότι το A1 βρίσκεται στην επάνω αριστερή γωνία κατά τη φόρτωση.
27. Επιλέξτε με διπλό κλικ το πρότυπο VeriSeq NIPT για να το ανοίξετε σε SoftMax Pro.
28. Επιλέξτε **New Experiment** (Νέο πείραμα) στην καρτέλα Home (Αρχική).
29. Επιλέξτε **Read** (Ανάγνωση).
30. Εξαγάγετε τα δεδομένα ως XML ως εξής.
 - a. Επιλέξτε με δεξί κλικ το **Plate** (Πλάκα) και, στη συνέχεια, επιλέξτε **Rename** (Μετονομασία).
 - b. Σαρώστε τον γραμμωτό κωδικό της πλάκας «Ποσοτικός προσδιορισμός» και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
 - c. Στην επάνω αριστερή γωνία της οθόνης, επιλέξτε το εικονίδιο πλάκας και, στη συνέχεια, επιλέξτε **Export** (Εξαγωγή) από το μενού.
 - d. Επιλέξτε το πλαίσιο επιλογής **Expt name** (Όνομα εξαγ.), ορίστε την επιλογή ημερομηνίας πλάκας σε raw, ορίστε τη μορφή εξόδου σε XML και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
 - e. Ορίστε τη διαδρομή και το όνομα του αρχείου εξόδου και, στη συνέχεια, επιλέξτε **Save** (Αποθήκευση). Ο υπολογιστής Hamilton πρέπει να μπορεί να έχει πρόσβαση στην τοποθεσία του αρχείου. Μη χρησιμοποιείτε κενά στο όνομα αρχείου ή στη διαδρομή αρχείου.

Ανάλυση

1. Στο ML STAR, στην οθόνη «Scanner Information» (Πληροφορίες σαρωτή), εισαγάγετε το αναγνωριστικό φθοριόμετρου.
2. Εισαγάγετε σχόλια σχετικά με την εκτέλεση φθοριόμετρου και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
3. Πλοηγηθείτε στο αρχείο ποσοτικού προσδιορισμού *.xml που περιέχει τα φθορισμομετρικά δεδομένα και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.

4. Εξετάστε τα αποτελέσματα της ανάλυσης για την πρότυπη καμπύλη και τη συγκέντρωση δείγματος και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
5. Εάν πρέπει να σαρώσετε ξανά την πλάκα, επιλέξτε **Rescan** (Εκ νέου σάρωση). Τα δείγματα είναι ευαίσθητα στον χρόνο και στο φως. Όταν χρειάζεται, εκτελείτε αμέσως εκ νέου σάρωση.
6. Εισαγάγετε σχόλια σχετικά με επηρεαζόμενα βοηθία και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
7. Αξιολογήστε τα αποτελέσματα και προχωρήστε ως εξής.
 - Εάν τα αποτελέσματα πληρούν τις προδιαγραφές, προχωρήστε στο [Δεξαμενοποίηση βιβλιοθηκών στη σελίδα 43](#) (Δεξαμενοποίηση βιβλιοθηκών). Για τις προδιαγραφές, ανατρέξτε στον πίνακα με τις μετρήσεις και τα όρια ποιοτικού ελέγχου ποσοτικού προσδιορισμού στον *Οδηγό λογισμικού VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2* (αρ. εγγράφου 1000000067940).
 - Εάν τα αποτελέσματα δεν συμφωνούν με τις προδιαγραφές, το σύστημα ματαιώνει τη μέθοδο. Επαναλάβετε τις διαδικασίες ποσοτικού προσδιορισμού ξεκινώντας με την [Προετοιμασία στη σελίδα 39](#).
8. Εκτελέστε ένα από τα παρακάτω βήματα:
 - Για να προχωρήσετε στο [Δεξαμενοποίηση βιβλιοθηκών στη σελίδα 43](#) (Δεξαμενοποίηση βιβλιοθηκών), επιλέξτε **Yes** (Ναι).
 - Για να διακόψετε, επιλέξτε **Exit** (Έξοδος).

ΣΗΜΕΙΟ ΑΣΦΑΛΟΥΣ ΔΙΑΚΟΠΗΣ

Εάν διακόψετε, στεγανοποιήστε την πλάκα «Βιβλιοθήκες» πριν από την αποθήκευση. Η πλάκα «Βιβλιοθήκες» διατηρεί τη σταθερότητά της για έως 7 ημέρες σωρευτικής αποθήκευσης σε θερμοκρασία -25 °C έως -15 °C.

Δεξαμενοποίηση βιβλιοθηκών

Προετοιμασία

1. Προετοιμάστε τα παρακάτω αντιδραστήρια:

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες
Ρυθμιστικό διάλυμα υβριδισμού	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου. Αναδεύστε για ανάμειξη. Επιστρέψτε το στην αποθήκευση μετά τη χρήση.

2. Αν η πλάκα «Βιβλιοθήκες» έχει αποθηκευτεί κατεψυγμένη, προετοιμάστε την ως εξής.
 - a. Επιβεβαιώστε ότι η πλάκα δεν αποθηκεύτηκε για πάνω από 7 ημέρες και αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.
 - b. Αναδεύστε στα 1.500 rpm για 1 λεπτό.
 - c. Φυγοκεντρήστε στα 1.000 × g για 20 δευτερόλεπτα.
 - d. Χρησιμοποιήστε πιπέτα για ανάμειξη.

3. Επισημάνετε έναν κενό σωλήνα δεξαμενοποίησης με την ένδειξη «Δεξαμενή Α». Για 96 δείγματα, επισημάνετε έναν δεύτερο κενό σωλήνα δεξαμενοποίησης με την ένδειξη «Δεξαμενή Β».
4. Αποθηκεύστε το παρακάτω πρόγραμμα αποδιάταξης στον θερμικό κυκλοποιητή με θερμασμένο καπάκι.
 - a. Επιλέξτε την επιλογή προθερμασμένου καπακιού και ορίστε τη θερμοκρασία στους 102 °C.
 - b. Ορίστε τον όγκο αντίδρασης σε 50 μl.
 - c. Ορίστε τον ρυθμό μεταβολής θερμοκρασίας στη μέγιστη ρύθμιση (≥ 2 °C ανά δευτερόλεπτο).
 - d. Επώαστε στους 96 °C για 10 λεπτά και, στη συνέχεια, στους 4 °C για 5 δευτερόλεπτα.
 - e. Διατηρήστε στους 4 °C.

Διαδικασία

1. Τοποθετήστε την πλάκα «Βιβλιοθήκης» πάνω στον εκ των προτέρων προγραμματισμένο θερμικό κυκλοποιητή και εκτελέστε το πρόγραμμα αποδιάταξης.
Μην εκτελείτε αποδιάταξη της πλάκας «Βιβλιοθήκης» προτού ο ποσοτικός προσδιορισμός ολοκληρώσει επιτυχώς τις μετρήσεις ποιοτικού ελέγχου, καθώς μπορεί να θέλετε να εκτελέσετε ξανά ποσοτικό προσδιορισμό.
2. Φυγοκεντρήστε την πλάκα «Βιβλιοθήκης» στα 1.000 × g για 20 δευτερόλεπτα.
3. Επιλέξτε **OK** για να ξεκινήσει η δεξαμενοποίηση βιβλιοθηκών.
4. Εάν δεν είναι ανοικτό το VeriSeq NIPT Method (Μέθοδος VeriSeq NIPT):
 - a. Ανοίξτε το AppLauncher και επιλέξτε **VeriSeq NIPT Method** (Μέθοδος VeriSeq NIPT).
 - b. Εισαγάγετε το αναγνωριστικό παρτίδας και το όνομα χρήστη και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
5. Επιλέξτε τη συγκέντρωση δεξαμενής και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
Η στοχευόμενη πυκνότητα συστάδων είναι 220–260 K/mm².

ΣΗΜΕΙΩΣΗ Οι συγκεντρώσεις δεξαμενοποίησης ή/και οι όγκοι δεξαμενοποίησης ενδέχεται να χρειάζονται αύξηση για παρτίδες 24 δειγμάτων, ώστε να διατηρηθούν παρόμοιες πυκνότητες συστάδων με αυτές που λαμβάνονται με παρτίδες 48/96 δειγμάτων.

6. Εάν σας ζητηθεί από το πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασιών, εκτελέστε ένα από τα παρακάτω βήματα:
 - Για να φορτώσετε ένα φύλλο δείγματος, επιλέξτε το φύλλο δείγματος που σχετίζεται με την παρτίδα και, στη συνέχεια, επιλέξτε **Load** (Φόρτωση).
 - Για να χρησιμοποιήσετε τις προεπιλεγμένες τιμές του συστήματος για τους υπόλοιπους τύπους δείγματος, την αναφορά φύλλου ή τον τύπο εξέτασης ανίχνευσης, επιλέξτε **Use Default** (Χρήση προεπιλογής) για κάθε ρύθμιση.
Για πληροφορίες σχετικά με τη δημιουργία φύλλου δείγματος, ανατρέξτε στον *Οδηγό λογισμικού VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2* (αρ. εγγράφου 1000000067940).

7. Επιλέξτε **Start** (Έναρξη) για να ξεκινήσει ο χρονοδιακόπτης για την αποδιάταξη της πλάκας.
8. Φορτώστε τα άκρα στους φορείς άκρων ως εξής.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Στοιχείο	Θέση εργαστηρίου
24, 48, 96	Άκρο	7–12	Άκρα φίλτρου των 50 μl	1

9. Φορτώστε την πλάκα «Αποδιατεταγμένη βιβλιοθήκη» (με τον γραμμωτό κωδικό στραμμένο προς τα δεξιά) στον φορέα Multiflex ως εξής και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Στοιχείο	Θέση εργαστηρίου
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Πλάκα «Αποδιατεταγμένη βιβλιοθήκη» (με γραμμωτό κωδικό)	1

10. Φορτώστε τους σωλήνες δεξαμενοποίησης στον φορέα σωλήνων ως εξής και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Στοιχείο	Θέση εργαστηρίου
24, 48	Σωλήνας	46	Νέος σωλήνας 2 ml, δεξαμενή A	1
96	Σωλήνας	46	Νέος σωλήνας 2 ml, δεξαμενή A	1
			Νέος σωλήνας 2 ml, δεξαμενή B	2

11. Φορτώστε τα κύπελλα αντιδραστηρίων στον φορέα αντιδραστηρίων ως εξής και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Στοιχείο	Θέση εργαστηρίου
24, 48, 96	Αντιδραστήριο	47	3 ml ρυθμιστικού διαλύματος υβριδισμού	1

12. Φορτώστε τα άκρα στους φορείς άκρων ως εξής.

Μέγεθος παρτίδας δειγμάτων	Τύπος φορέα	Διαδρομή	Στοιχείο	Θέση εργαστηρίου
24, 48, 96	Άκρο	49–54	Άκρα φίλτρου των 1.000 μl	1
			Άκρα φίλτρου των 300 μl	2
			Άκρα φίλτρου των 50 μl	3

13. Εισαγάγετε τη θέση του πρώτου και τελευταίου άκρου για κάθε rack άκρων και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
14. Βεβαιωθείτε ότι οι φορείς, ο εξοπλισμός του εργαστηρίου και τα αντιδραστήρια έχουν φορτωθεί όπως υποδεικνύεται.
15. Στην οθόνη Pooling Deck Verification (Επαλήθευση θαλάμου δεξαμενοποίησης), επιλέξτε **OK**.
16. Παρατηρείτε το ML STAR κατά τη διάρκεια των αυτοματοποιημένων βημάτων.
17. Εισαγάγετε σχόλια σχετικά με τα επηρεαζόμενα βοηθία και, στη συνέχεια, επιλέξτε **OK**.
18. Όταν σας ζητηθεί από το πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασιών, βεβαιωθείτε ότι ο θάλαμος φόρτωσης του ML STAR είναι απαλλαγμένος από εμπόδια ώστε το ML STAR να μπορέσει να εκφορτώσει τους φορείς.
19. Επιλέξτε **Unload** (Εκφόρτωση) για να εκφορτώσετε τον θάλαμο.
20. Εκφορτώστε τον φορέα σωλήνων.
21. Πωματίστε κάθε σωλήνα δεξαμενοποίησης, αναδεύστε και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε σύντομα.
22. Επιλέξτε **OK**.
23. Αλληλουχίστε τις βιβλιοθήκες το συντομότερο δυνατόν μετά τη δεξαμενοποίηση. Στεγανοποιήστε την πλάκα «Βιβλιοθήκες» και αποθηκεύστε σε θερμοκρασία $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ έως $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ για έως 7 ημέρες ώστε να καταστεί δυνατή η εκ νέου δεξαμενοποίηση.

ΣΗΜΕΙΟ ΑΣΦΑΛΟΥΣ ΔΙΑΚΟΠΗΣ

Εάν διακόψετε, πωματίστε τους σωλήνες δεξαμενοποίησης και αποθηκεύστε σε θερμοκρασία $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ έως $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ για έως 7 ημέρες.

Προετοιμασία δεξαμενοποιημένων βιβλιοθηκών για αλληλούχηση

Προετοιμασία

1. Προετοιμάστε τα παρακάτω αντιδραστήρια:

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες
Συγκέντρωση σωλήνων	$-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ έως $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$	Εάν ήταν προηγουμένως αποθηκευμένο, αποψύξτε για να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Αναδεύστε σύντομα. Φυγοκεντρήστε σύντομα.

2. Προετοιμάστε το σύστημα αλληλούχησης επόμενης γενιάς συμπληρώνοντας τα παρακάτω πεδία στη μονάδα Local Run Manager VeriSeq NIPT:
 - a. Run Name (Όνομα εκτέλεσης)
 - b. **[Προαιρετικά]** Run Description (Περιγραφή εκτέλεσης)
 - c. Pool Barcode (Γραμμωτός κωδικός δεξαμενής)

**ΠΡΟΣΟΧΗ**

Ο γραμμωτός κωδικός δεξαμενής που εισάγεται στη μονάδα LRM πρέπει να αντιστοιχεί στον γραμμωτό κωδικό δεξαμενής που έχει εισαχθεί στο πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασιών. Οι εσφαλμένες διαμορφώσεις εκτέλεσης απορρίπτονται από το λογισμικό ανάλυσης και απαιτείται επανάληψη της αλληλούχισης.

Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τη χρήση της μονάδας Local Run Manager VeriSeq NIPT, ανατρέξτε στον *Οδηγό λογισμικού VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2* (αρ. εγγράφου 1000000067940).

Διαδικασία

1. Συνδυάστε τους ακόλουθους όγκους στην κασέτα αντιδραστηρίων και, στη συνέχεια, χρησιμοποιήστε πιπέτα για να αναμείξετε.
 - Ρυθμιστικό διάλυμα υβριδισμού (900 μl)
 - 450 μl δεξαμενής A (450 μl)
2. Προχωρήστε με την αλληλούχιση χρησιμοποιώντας ένα σύστημα αλληλούχισης επόμενης γενιάς, σύμφωνα με τον οδηγό συστήματος.
οδηγός αναφοράς για το δικό σας όργανο αλληλούχισης επόμενης γενιάς. Για όργανο NextSeq 550Dx, ανατρέξτε στον *Οδηγό αναφοράς οργάνου NextSeq 550Dx* (αρ. εγγράφου 100000009513) ή στο *ένθετο συσκευασίας οργάνου NextSeq 550Dx* (αρ. εγγράφου 1000000043133).
3. Επιβεβαιώστε τη σωστή διαμόρφωση εκτέλεσης, όταν ζητηθεί.
4. Εάν είναι απαραίτητο, επαναλάβετε αυτήν τη διαδικασία για τη δεξαμενή B.
 - Για να επιτύχετε το στοχευόμενο εύρος πυκνότητας συστάδων, η πλάκα «Βιβλιοθηκών» μπορεί να υποβληθεί εκ νέου σε δεξαμενοποίηση με τη χρήση διαφορετικής συγκέντρωσης δεξαμενοποίησης στο Hamilton. Η εκ νέου δεξαμενοποίηση ακυρώνει την αρχική δεξαμενή.
 - Εναλλακτικά, ο λόγος της δεξαμενής προς το HT1 (450 μl + 900 μl) μπορεί να τροποποιηθεί για την επίτευξη του στοχευόμενου εύρους πυκνότητας συστάδων.

Αλληλούχιση επόμενης γενιάς

Το VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2 μπορεί να χρησιμοποιηθεί με σύστημα αλληλούχισης επόμενης γενιάς με τις παρακάτω προδιαγραφές:

- δυνατότητα 2x36 αναγνώσεων συζευγμένων άκρων
- συμβατό με προσαρμογείς ευρετηρίου του VeriSeq NIPT Sample Prep
- χημική ανάλυση δύο καναλιών
- αυτόματη παραγωγή αρχείων .BCL (ακατέργαστα δεδομένα από όργανο αλληλούχισης)
- 400 εκατομμύρια αναγνώσεις συζευγμένων άκρων ανά εκτέλεση
- συμβατό με το λογισμικό προσδιορισμού VeriSeq NIPT έκδ. 2.

Το NextSeq 550Dx είναι συμβατό με το VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2.

Ανάλυση δεδομένων αλληλουχίας

Μόλις ολοκληρωθεί η αλληλούχιση, τα δεδομένα αλληλούχισης αποστέλλονται αυτόματα στο λογισμικό προσδιορισμού VeriSeq NIPT έκδ. 2 για ανάλυση και δημιουργία αναφοράς. Η αναφορά περιλαμβάνει ταξινομήσεις για κάθε δείγμα της παρτίδας, καθώς και αξιολόγηση όλων των μετρήσεων ποιοτικού ελέγχου της εκτέλεσης. Η διαδικασία ανάλυσης από την ολοκλήρωση της αλληλούχισης μέχρι τα τελικά αποτελέσματα διαρκεί περίπου 4 ώρες για μια παρτίδα 48 δειγμάτων. Για αναλυτικές πληροφορίες σχετικά με την ανάλυση δεδομένων και το αρχείο εξόδου, ανατρέξτε στον *Οδηγό λογισμικού VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2* (αρ. εγγράφου 1000000067940).

Ερμηνεία αποτελεσμάτων

Ο αλγόριθμος του VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2 χρησιμοποιεί ένα εξελιγμένο στατιστικό μοντέλο που συνδυάζει αρκετούς διαφορετικούς τύπους πληροφοριών από τη συλλογή τμημάτων βιβλιοθηκών που έχουν υποστεί αλληλούχιση συζευγμένων άκρων. Αυτό το μοντέλο χρησιμοποιείται για την ανίχνευση περιοχών του γονιδιώματος που υποεκπροσωπούνται ή υπερεκπροσωπούνται στη βιβλιοθήκη κάθε δείγματος. Πολύ σημαντικό είναι το γεγονός ότι αυτό το μοντέλο εξετάζει αν ο βαθμός υποεκπροσώπησης ή υπερεκπροσώπησης συνάδει ποσοτικά με ανευπλοειδία στο εμβρυϊκό γονιδίωμα στο επίπεδο του εμβρυϊκού κλάσματος που εκτιμήθηκε για τη βιβλιοθήκη.

Για όλα τα χρωμοσώματα, τα δεδομένα αλληλούχισης συζευγμένων άκρων ευθυγραμμίζονται με το γονιδίωμα αναφοράς (HG19). Οι μοναδικές μη διπλότυπες ευθυγραμμισμένες αναγνώσεις συγκεντρώνονται σε κάδους των 100 kb. Οι μετρήσεις του αντίστοιχου κάδου είναι προσαρμοσμένες για μεροληψία GC και σύμφωνα με την ειδική ανά περιοχή γονιδιωματική κάλυψη που προσδιορίστηκε προηγουμένως. Με τη χρήση τέτοιων κανονικοποιημένων μετρήσεων κάδου, οι στατιστικές βαθμολογίες προκύπτουν για κάθε αυτόσωμα μέσω της σύγκρισης των περιοχών κάλυψης που μπορούν να επηρεαστούν από ανευπλοειδία με τα υπόλοιπα αυτοσώματα. Ο λογαριθμικός λόγος πιθανοτήτων (LLR) υπολογίζεται για κάθε δείγμα με συνεκτίμηση αυτών των βαθμολογιών βάσει της κάλυψης και του εκτιμώμενου εμβρυϊκού κλάσματος. Ο LLR είναι η πιθανότητα επηρεασμού ενός δείγματος δεδομένης της παρατηρηθείσας κάλυψης και του εμβρυϊκού κλάσματος έναντι της πιθανότητας μη επηρεασμού ενός δείγματος δεδομένης της ίδιας παρατηρηθείσας κάλυψης. Στον υπολογισμό αυτού του λόγου λαμβάνεται επίσης υπόψη η εκτιμώμενη αβεβαιότητα στο εμβρυϊκό κλάσμα. Για τους επόμενους υπολογισμούς, χρησιμοποιείται ο φυσικός λογάριθμος του λόγου. Το λογισμικό προσδιορισμού αξιολογεί τον LLR για κάθε χρωμόσωμα-στόχο και κάθε δείγμα ώστε να παράσχει έναν προσδιορισμό για την ανευπλοειδία.

Κατά τη διάρκεια της δημιουργίας παρτίδας, πρέπει να καθορίσετε τον τύπο δείγματος (μονήρης ή δίδυμος), τον τύπο εξέτασης ανίχνευσης (βασική ή σε ολόκληρο το γονιδίωμα) και την αναφορά των χρωμοσωμάτων του φύλου (Ναι, Όχι και SCA) που προτιμάτε για κάθε δείγμα. Ο συνδυασμός αυτών των επιλογών καθορίζει τις πληροφορίες που αναφέρονται για κάθε δείγμα.

Για όλους τους τύπους δειγμάτων, ο τύπος εξέτασης ανίχνευσης καθορίζει ποιες αυτοσωμικές ανωμαλίες αναφέρονται. Για τον βασικό τύπο εξέτασης ανίχνευσης, αναφέρονται μόνο συμβάντα ολικής χρωμοσωμικής τρισωμίας που περιλαμβάνουν τα χρωμοσώματα 13, 18 και 21. Για τον τύπο εξέτασης ανίχνευσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα, αναφέρονται η ολική ή μερική χρωμοσωμική απαλοϊφή ή το διπλότυπο οποιουδήποτε αυτοσωμικού χρωμοσώματος. Το μήκος της μικρότερης εν μέρει απαλοϊφής ή διπλότυπου χρωμοσώματος που μπορεί να αναφερθεί είναι 7 Mb.

Για δείγματα μονήρους κύησης, μπορείτε να απενεργοποιήσετε την αναφορά χρωμοσωμάτων του φύλου. Μπορείτε επίσης να διαμορφώσετε την αναφορά ανευπλοειδιών των χρωμοσωμάτων του φύλου είτε με είτε χωρίς την αναφορά του φύλου των ευπλοειδικών δειγμάτων.

Για τα δείγματα διδύμου κύησης, εάν επιλέξετε «Yes» (Ναι) για την αναφορά των χρωμοσωμάτων του φύλου, το αποτέλεσμα περιορίζεται στην αναφορά της παρουσίας ή της απουσίας ενός χρωμοσώματος Y στη βιβλιοθήκη. Η ανευπλοειδία των χρωμοσωμάτων του φύλου δεν μπορεί να αναφερθεί για δείγματα διδύμου κύησης.

Ένα αποτέλεσμα ANOMALY DETECTED (Ανιχνεύτηκε ανωμαλία) υποδεικνύει ότι το δείγμα ελέγχεται ως θετικό για μία ή περισσότερες ανωμαλίες που συμφωνούν με τον επιλεγμένο τύπο εξέτασης ανίχνευσης και την επιλογή αναφοράς των χρωμοσωμάτων του φύλου. Όταν ανιχνεύεται μια ανωμαλία, η αναφορά παρέχει μια περιγραφή της ανωμαλίας σε κυτταρογενετικό υπόμνημα.

Το λογισμικό προσδιορισμού VeriSeq NIPT έκδ. 2 χρησιμοποιεί στατιστικά στοιχεία που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της αλληλούχησης για την παροχή μιας εκτίμησης εμβρυϊκού κλάσματος (FFE) για κάθε δείγμα. Η FFE είναι η εκτιμώμενη συνιστώσα εμβρυϊκού cfDNA που ανακτάται από τον προσδιορισμό και αναφέρεται ως στρογγυλοποιημένο ποσοστό για κάθε δείγμα. Η μέση τυπική απόκλιση αυτής της εκτίμησης σε όλα τα δείγματα είναι 1,3%. Η FFE δεν πρέπει να χρησιμοποιείται από μόνη της για τον αποκλεισμό δειγμάτων κατά την αναφορά αποτελεσμάτων.

Για να παράσχει αντιστοιχίσεις χρωμοσωμικής εκπροσώπησης, το λογισμικό προσδιορισμού VeriSeq NIPT έκδ. 2 χρησιμοποιεί την εξατομικευμένη εξέταση εμπιστοσύνης εμβρυϊκής ανευπλοειδίας [Fetal Aneuploidy Confidence Test (iFACT)], μια δυναμική μέθοδο μέτρησης κατώτατου ορίου που υποδεικνύει αν το σύστημα έχει δημιουργήσει επαρκή κάλυψη αλληλούχησης, δεδομένης της εκτίμησης εμβρυϊκού κλάσματος για κάθε δείγμα. Οι αρνητικές αντιστοιχίσεις αναφέρονται μόνο εάν το δείγμα πληροί το κατώτατο όριο της iFACT. Εάν το δείγμα δεν πληροί αυτό το κατώτατο όριο, η αξιολόγηση ποιοτικού ελέγχου εμφανίζει την ένδειξη «FAILED iFACT» (Αποτυχία στην iFACT) και το σύστημα δεν δημιουργεί αποτέλεσμα.

Εκτός από την iFACT, το λογισμικό προσδιορισμού VeriSeq NIPT έκδ. 2 αξιολογεί διάφορες άλλες μετρήσεις ποιοτικού ελέγχου κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Οι πρόσθετες μετρήσεις περιλαμβάνουν αξιολογήσεις της ομοιομορφίας της κάλυψης σε γονιδιωματικές περιοχές αναφοράς και την κατανομή των μηκών των τμημάτων cfDNA. Η αξιολόγηση ποιοτικού ελέγχου εμφανίζει είτε μια επισήμανση ποιοτικού ελέγχου είτε μια αποτυχία ποιοτικού ελέγχου για οποιαδήποτε μέτρηση εκτός του αποδεκτού εύρους. Σε περίπτωση αποτυχίας του ποιοτικού ελέγχου, το σύστημα δεν δημιουργεί αποτέλεσμα για το δείγμα. Εάν το δείγμα αποτύχει στον ποιοτικό έλεγχο, μπορεί να υποβληθεί εκ νέου σε επεξεργασία εφόσον ο όγκος πλάσματος στο σωλήνα συλλογής αίματος είναι επαρκής.

Το VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2 δημιουργεί δεδομένα για χρήση σε μια τελική αναφορά. Δεν δημιουργεί τελική αναφορά για τον ασθενή. Οι πελάτες είναι υπεύθυνοι για τον σχεδιασμό και το περιεχόμενο της τελικής αναφοράς που θα παραδοθεί στον ιατρό στο σημείο περίθαλψης. Η Illumina δεν είναι υπεύθυνη για την ακρίβεια της διατύπωσης στην τελική αναφορά για τους πελάτες.



ΠΡΟΣΟΧΗ

Ελέγξτε τις εκτιμήσεις εμβρυϊκού κλάσματος όλων των δειγμάτων. Εάν οι εκτιμήσεις εμβρυϊκού κλάσματος είναι παρόμοιες για όλα τα δείγματα σε μια εκτέλεση, ενδέχεται να έχει προκύψει αμαλγάμωση δειγμάτων και να έχουν επηρεαστεί τα αποτελέσματα. Επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής υποστήριξης της Illumina για βοήθεια στην αντιμετώπιση του προβλήματος.

Χαρακτηριστικά απόδοσης

Τα παρακάτω δεδομένα που περιγράφονται στις ενότητες για την κλινική απόδοση και την αναλυτική απόδοση δημιουργήθηκαν με τη χρήση των πρωτοκόλλων και των υλικών που περιγράφονται στις οδηγίες χρήσης, ξεκινώντας με το πλάσμα. Όλα τα δεδομένα αλληλούχισης για αυτήν την ενότητα δημιουργήθηκαν σε σύστημα αλληλούχισης NextSeq 500/550 ή σε σύστημα αλληλούχισης NextSeq 550Dx με τις παρακάτω διαμορφώσεις:

	NextSeq 500/550	NextSeq 550Dx
Λογισμικό επί του οργάνου	Λογισμικό ελέγχου NextSeq 4.0	Λογισμικό λειτουργίας NextSeq 1.3
Έκδοση κιτ αντιδραστηρίων	Κιτ αντιδραστηρίων υψηλής απόδοσης NextSeq 500/550 έκδ. 2.5 (75 κύκλοι)	Κιτ αντιδραστηρίων υψηλής απόδοσης NextSeq 550Dx έκδ. 2.5 (75 κύκλοι)
Μέθοδος αλληλούχισης	Εκτέλεση αλληλούχισης συζευγμένων άκρων 2x36 σε τρόπο λειτουργίας υψηλής απόδοσης	Εκτέλεση αλληλούχισης συζευγμένων άκρων 2x36 σε τρόπο λειτουργίας υψηλής απόδοσης

Κλινική μελέτη

Η κλινική ακρίβεια του VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2 καταδείχθηκε με την αξιολόγηση δειγμάτων πλάσματος από έγκυες γυναίκες με μονήρη και δίδυμο κύηση. Τα δείγματα ελήφθησαν από αποταυτοποιημένα δείγματα πλάσματος που φυλάσσονταν σε τράπεζα και τα οποία είχαν υποβληθεί προηγουμένως σε επεξεργασία από δείγματα περιφερικού ολικού αίματος. Εξετάστηκαν πάνω από 45.000 δείγματα για συμπερίληψη στη μελέτη. Τα δείγματα αυτά είχαν υποβληθεί σε προηγούμενο προγεννητικό έλεγχο ανίχνευσης για εμβρυϊκές χρωμοσωμικές ανευπλοειδίες και εν μέρει απαλοιφές και διπλότυπα μήκους 7 Mb ή μεγαλύτερου. Όλα τα δείγματα από επηρεαζόμενες κυήσεις και ένα υποσύνολο διαδοχικών δειγμάτων από μη επηρεαζόμενες κυήσεις κρίθηκαν κατάλληλα για έλεγχο εφόσον υπήρχαν διαθέσιμες κλινικές εκβάσεις και πληρούνταν τα

κριτήρια δείγματος. Το σύνολο ανάλυσης ελέγχου περιλάμβανε συνολικά 2.335 δείγματα. Από αυτό το σύνολο, 2.328 δείγματα προέρχονταν από μονήρεις κύησεις και επτά δείγματα προέρχονταν από διδύμους κύησεις.

Από αυτά τα δείγματα, 28 (1,2%, 28/2.335) δείγματα δεν ολοκλήρωσαν επιτυχώς τον ποιοτικό έλεγχο την πρώτη φορά κατά τη διάρκεια της ανάλυσης των δεδομένων της ολοκληρωθείσας αλληλούχισης:

- 27 αποτυχίες iFACT (ένα ΧΟ, 26 μη επηρεαζόμενα)
- Μία αποτυχία για δεδομένα εκτός του αναμενόμενου εύρους

Δημογραφικά στοιχεία και χαρακτηριστικά κύησης

Η ηλικία της μητέρας, η ηλικία κύησης και το τρίμηνο κύησης συνοψίζονται στον [Πίνακας 7](#) για τα δείγματα στον εξέταση ανίχνευσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα, συμπεριλαμβανομένων δειγμάτων γνωστών μωσαϊκών. Η πλειονότητα (98%) των δειγμάτων εξέτασης αντιπροσωπεύουν κύηση πρώτου τριμήνου.

Τα δημογραφικά στοιχεία αξιολογήθηκαν μεταξύ των κοορτών βασικού ελέγχου και ελέγχου σε ολόκληρο το γονιδίωμα και δεν κατέδειξαν στατιστική διαφορά. Τα δημογραφικά στοιχεία και τα χαρακτηριστικά κύησης ήταν παρόμοια είτε συμπεριλήφθηκαν είτε αποκλείστηκαν γνωστά μωσαϊκά.

Πίνακας 7 Δημογραφικά στοιχεία και χαρακτηριστικά κύησης

Σύνοψη στατιστικών στοιχείων	Σε ολόκληρο το γονιδίωμα (συμπεριλαμβανομένων γνωστών μωσαϊκών)
Αριθμός δειγμάτων	2.307*
Ηλικία μητέρας – έτη	
Μέσος	35,08
Τυπική απόκλιση	4,04
Διάμεσος	34,95
25ο εκατοστημόριο, 75ο εκατοστημόριο	32,31, 37,79
Ελάχιστη τιμή, μέγιστη τιμή	20,22, 53,02
Ηλικία κύησης κατά την αιμοληψία – εβδομάδες	
Μέσος	10,93
Τυπική απόκλιση	1,20
Διάμεσος	10,57
25ο εκατοστημόριο, 75ο εκατοστημόριο	10,29, 11,14
Ελάχιστη τιμή, μέγιστη τιμή	10,00, 27,86
Τρίμηνο κύησης – n (%)	
< Πρώτο (<14 εβδομάδες)	2.252 (98%)
Δεύτερο	54 (2%)
Τρίτο (≥ 27 εβδομάδες)	1 (0%)

*Τα τελικά δείγματα που παρουσιάστηκαν περιείχαν 7 δίδυμα.

Κλινική απόδοση

Τα αποτελέσματα, όπως αντιστοιχίστηκαν από το σύστημα VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2, συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα του προτύπου κλινικής αναφοράς. Όλα τα δείγματα της μελέτης είχαν αποτελέσματα του κλινικού προτύπου αναφοράς (κλινική αλήθεια) σε σχέση με την κατάσταση της εμβρυϊκής χρωμοσωμικής ανευπλοειδίας και τις εν μέρει απαλοιφές και τα διπλότυπα μήκους 7 Mb ή μεγαλύτερου. Το αποτέλεσμα του κλινικού προτύπου αναφοράς για τα δείγματα που περιλήφθηκαν σε αυτήν τη μελέτη εξαρτιόταν από τα

αποτελέσματα της χρωμοσωμικής ανάλυσης ή την κλινική εξέταση ενός νεογέννητου με αρνητική εξέταση ανίχνευσης NIPT βάσει NGS. Καταρτισμένο προσωπικό της μελέτης εκτέλεσε την ταξινόμηση των δεδομένων του κλινικού προτύπου αναφοράς σύμφωνα με το έγγραφο ιατρικής κωδικοποίησης από τον χορηγό.

Στις μεθόδους χρωμοσωμικής ανάλυσης περιλαμβάνονταν ο προσδιορισμός καρυότυπου, ο *in situ* υβριδισμός με φθορισμό (FISH) ή η χρωμοσωμική ανάλυση με μικροσυστοιχίες (CMA) συγκριτικού γονιδιωματικού υβριδισμού. Η χρωμοσωμική ανάλυση διενεργήθηκε σε περιφερικό αίμα ή σίελο νεογέννητου ή βρέφους, δείγματα προϊόντων της σύλληψης (products of conception – POC), αμνιοκύτταρα, χοριακές λάχνες, πλακουντιακούς ιστούς ή αίμα ομφάλιου λώρου μετά τη γέννηση.

Ο μωσαϊκισμός ορίζεται ως η παρουσία δύο ή περισσότερων κυτταρικών σειρών διαφορετικής χρωμοσωμικής σύνθεσης σε ένα άτομο. Οι κυτταρικές σειρές προέρχονται από το ίδιο ζύγωμα. Ο τύπος και το επίπεδο μωσαϊκισμού ποικίλλουν και εξαρτώνται από τον χρόνο των μωσαϊκών συμβάντων κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Οι διαφορετικοί τύποι μωσαϊκισμού εμφανίζονται σε προγεννητικές διαγνώσεις ανάλογα με την κατανομή των μη φυσιολογικών έναντι των φυσιολογικών κυτταρικών σειρών σε κυτταροτροφοβλάστη, μεσέγχυμα ή στο έμβρυο.¹⁰ Παρότι ο μωσαϊκισμός μπορεί να διαπιστωθεί με οποιαδήποτε χρωμοσωμική ανωμαλία, η συχνότητα μωσαϊκισμού σε σπάνιες τρισωμίες είναι υψηλότερη απ' ό,τι στις τρισωμίες των χρωμοσωμάτων 21, 18 και 13 (T21, T18 και T13).¹¹ Στην αξιολόγηση της απόδοσης, στην ανάλυση σε ολόκληρο το γονιδίωμα περιλήφθηκαν περιστατικά μωσαϊκισμού, δεδομένου ότι ο σκοπός αυτού του τύπου εξέτασης ανίχνευσης για αυτόν τον προσδιορισμό είναι η ανίχνευση σπάνιων αυτοσωμικών ανευπλοειδιών (rare autosomal aneuploidies – RAA).

Απόδοση βασικής εξέτασης ανίχνευσης

Η βασική εξέταση ανίχνευσης καλύπτει τις ανωμαλίες T21, T18 και T13. Στην ανάλυση περιλήφθηκαν συνολικά 2.243 δείγματα μονήρων και διδύμων κυήσεων. Και οι επτά διδυμες κυήσεις ανιχνεύτηκαν σωστά ως T21 και δεν αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 8 Ευαισθησία και ειδικότητα του VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2 για την ανίχνευση των τρισωμιών 21, 18 και 13 σε βασική εξέταση ανίχνευσης για μονήρεις κυήσεις (εξαιρουμένων γνωστών μωσαϊκών)

	T21	T18	T13
Ευαισθησία	> 99,9% (130/130)	> 99,9% (41/41)	> 99,9% (26/26)
Αμφίπλευρο CI 95%	97,1%, 100%	91,4%, 100%	87,1%, 100%
Ειδικότητα	99,90% (1.982/1.984)	99,90% (1.995/1.997)	99,90% (2.000/2.002)
Αμφίπλευρο CI 95%	99,63%, 99,97%	99,64%, 99,97%	99,64%, 99,97%

Η απόδοση του προσδιορισμού στη βασική εξέταση ανίχνευσης όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 8 υπολογίζεται με αποκλεισμό υποσυνόλου 64 δειγμάτων που επηρεάζονται από RAA, αυτοσωμικές εν μέρει απαλοιφές και διπλότυπα ή γνωστό μωσαϊκισμό. Αυτά τα 64 δείγματα περιλάμβαναν οκτώ μωσαϊκά T21 και τρία μωσαϊκά T18. Πέντε από αυτά τα 11 δείγματα προσδιορίστηκαν ως επηρεαζόμενα από την ανωμαλία που ανίχνευσε το λογισμικό προσδιορισμού VeriSeq NIPT έκδ. 2.

Απόδοση εξέτασης ανίχνευσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα

Για την εξέταση ανίχνευσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα, οποιαδήποτε ανωμαλία περιλαμβάνει τρισωμίες, μονοσωμίες και εν μέρει απαλοιφές ή διπλότυπα μήκους 7 Mb ή μεγαλύτερου. Τα δείγματα για την εξέταση ανίχνευσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα περιλάμβαναν 36 δείγματα με γνωστό μωσαϊκισμό. Ελέγχθηκαν συνολικά 2.307 δείγματα μονήρων και διδύμων κυήσεων. Και οι επτά δίδυμες κυήσεις ανιχνεύτηκαν σωστά με παρουσία ανωμαλίας του χρωμοσώματος 21 και δεν αναφέρονται στους παρακάτω πίνακες.

Απόδοση εξέτασης ανίχνευσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα για οποιαδήποτε ανωμαλία

Πίνακας 9 Ευαισθησία και ειδικότητα του VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2 για την ανίχνευση οποιασδήποτε ανωμαλίας στην εξέταση ανίχνευσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα (συμπεριλαμβανομένων γνωστών μωσαϊκών)

	Ευαισθησία	Ειδικότητα
Εκτιμώμενο % (n/N)	95,5% (318/333)	99,34% (1.954/1.967)
Αμφίπλευρο CI 95%	92,7%, 97,3%	98,87%, 99,61%

Απόδοση εξέτασης ανίχνευσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα για σπάνια αυτοσωμική ανευπλοειδία

Πίνακας 10 Ευαισθησία και ειδικότητα του VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2 για σπάνια αυτοσωμική ανευπλοειδία (RAA) στην εξέταση ανίχνευσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα (συμπεριλαμβανομένων γνωστών μωσαϊκών)

	Ευαισθησία	Ειδικότητα
Εκτιμώμενο % (n/N)	96,4% (27/28)	99,80% (2.001/2.005)
Αμφίπλευρο CI 95%	82,3%, 99,4%	99,49%, 99,92%

Απόδοση εξέτασης ανίχνευσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα για εν μέρει απαλοιφές και διπλότυπα

Πίνακας 11 Ευαισθησία και ειδικότητα του VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2 για εν μέρει απαλοιφές και διπλότυπα μήκους 7 Mb ή μεγαλύτερου στην εξέταση ανίχνευσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα (συμπεριλαμβανομένων γνωστών μωσαϊκών)

	Ευαισθησία	Ειδικότητα
Εκτιμώμενο % (n/N)	74,1% (20/27)	99,80% (2.000/2.004)
Αμφίπλευρο CI 95%	55,3%, 86,8%	99,49%, 99,92%

Διαφορές στην απόδοση μεταξύ της βασικής εξέτασης ανίχνευσης και της εξέτασης ανίχνευσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα

Η μεθοδολογία βαθμολόγησης για τις συνήθεις τρισωμίες και τις ανευπλοειδίες των χρωμοσωμάτων του φύλου είναι η ίδια για τη βασική εξέταση ανίχνευσης και την εξέταση ανίχνευσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα. Η βασική εξέταση ανίχνευσης εφαρμόζει τον αλγόριθμο μόνο στις T21, T18 και T13. Αντιθέτως, η εξέταση ανίχνευσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα επεκτείνει αυτήν τη μεθοδολογία ώστε να αξιολογήσει όλες τις τρισωμίες και τις RAA, καθώς και για εν μέρει διπλότυπα και απαλοιφές.

Υπάρχουν δύο διαφορές όσον αφορά την αναφορά της απόδοσης που περιγράφεται μεταξύ της βασικής εξέτασης ανίχνευσης και της εξέτασης ανίχνευσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα. Πρώτον, για την εξέταση ανίχνευσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα, συμπεριλήφθηκαν δείγματα με γνωστό μωσαϊκισμό τόσο για τις συνήθεις τρισωμίες όσο και για τις RAA και τις εν μέρει απαλοιφές και τα διπλότυπα για μετρήσεις της απόδοσης. Δεύτερον, η εξέταση ανίχνευσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα μπορεί κατά προτίμηση να αναφέρει την ανίχνευση εν μέρει διπλότυπου ή απαλοιφής αντί μιας πλήρους τρισωμίας. Η παρουσία πλήρους τρισωμίας εκτός από εν μέρει διπλότυπο ή απαλοιφή μπορεί να διαπιστωθεί με αναφορά στη βαθμολογία LLR που παρέχεται στη συμπληρωματική αναφορά.

Συμπερίληψη μωσαϊκών στην εξέταση ανίχνευσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα

Ο μωσαϊκισμός παρατίθεται ως περιορισμός αυτού του προσδιορισμού. Όταν υπάρχει μωσαϊκισμός, το εμβρυϊκό σήμα μιας ανωμαλίας μειώνεται και, συνεπώς, μπορεί να είναι πιο δύσκολο να ανιχνευτεί χωρίς να διακυβευτεί η συνολική ειδικότητα του προσδιορισμού. Ωστόσο, επειδή ο μωσαϊκισμός είναι πιο σχετικός για εκτεταμένο περιεχόμενο, στην εξέταση ανίχνευσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα συμπεριλήφθηκαν δείγματα με μωσαϊκισμό.

Από τα 64 δείγματα που περιλήφθηκαν στην εξέταση ανίχνευσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα αλλά όχι στη βασική εξέταση ανίχνευσης, 36 δείγματα ταυτοποιήθηκαν ως έχοντα μωσαϊκισμό σύμφωνα με το κλινικό πρότυπο αναφοράς. Από αυτά τα 36 δείγματα, 23 αντιστοιχίσεις συμφωνούσαν με το πρότυπο κλινικής αναφοράς.

Ανίχνευση εν μέρει απαλοιφής ή διπλότυπου έναντι ολικής χρωμοσωμικής ανευπλοειδίας

Το σύστημα VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2 διαθέτει επιλογές μενού τόσο για βασική εξέταση ανίχνευσης όσο και για εξέταση ανίχνευσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα. Στη βασική εξέταση ανίχνευσης, το αποτέλεσμα «ANOMALY DETECTED» (Ανιχνεύτηκε ανωμαλία) αναφέρεται μόνο όταν ανιχνεύεται πλήρης ανευπλοειδία στα χρωμοσώματα 21, 18 ή 13 και εάν πληρούνται όλες οι μετρήσεις ποιοτικού ελέγχου. Στην εξέταση ανίχνευσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα, το σύστημα ανιχνεύει την ανευπλοειδία σε όλα τα αυτοσώματα και τα συμβάντα εν μέρει απαλοιφής και διπλότυπου μήκους τουλάχιστον 7 Mb.

Κατά τη χρήση της εξέτασης ανίχνευσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα, σε περιπτώσεις όπου ένα συμβάν ολόκληρου χρωμοσώματος καθώς και ένα συμβάν CNV εντός του ίδιου χρωμοσώματος υπερβαίνουν την τιμή κατωφλίου LLR, το σύστημα δίνει προτεραιότητα αναφοράς σε ένα συμβάν εν μέρει απαλοιφής ή διπλότυπου

έναντι της αντιστοίχισης ολόκληρου του χρωμοσώματος, αν το μέγεθος της εν μέρει απαλοιφής ή του διπλότυπου καλύπτει περίπου το 75% ή μικρότερο μέρος του χρωμοσώματος στο οποίο ανιχνεύεται το συμβάν. Εάν η περιοχή της εν μέρει απαλοιφής και του διπλότυπου που ανιχνεύεται είναι μεγαλύτερη από το 75% του μεγέθους του χρωμοσώματος, το συμβάν αναφέρεται ως πλήρης τρισωμία ή μονοσωμία ολόκληρου του χρωμοσώματος, αν σημειώνεται επίσης ταυτόχρονα υπέρβαση της τιμής κατωφλίου LLR για ολόκληρο το χρωμόσωμα. Λόγω αυτού του γεγονότος, οι σημαντικά μεγάλες απαλοιφές και τα διπλότυπα με μέγεθος μικρότερο από ή ίσο με 75% του μεγέθους του χρωμοσώματος μπορεί να είναι ενδεικτικά ολικής χρωμοσωμικής ανευπλοειδίας.

Σε όλα τα δείγματα, η βαθμολογία LLR για την ταξινόμηση ολόκληρου του χρωμοσώματος είναι διαθέσιμη στη συμπληρωματική αναφορά. Η βαθμολογία LLR θα πρέπει να εξετάζεται σε σχέση με την καθορισμένη τιμή αποκοπής στην [Πιθανότητες ανίχνευσης 95% για μέσες περιοχές ανά μέγεθος για το VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2 στη σελίδα 67](#) πριν από την ερμηνεία του αποτελέσματος. Για παράδειγμα, μια αντιστοίχιση CNV όπου οι βαθμολογίες LLR σε επίπεδο χρωμοσώματος που υπερβαίνουν την τιμή αποκοπής παρέχουν περαιτέρω υποστήριξη για μια ερμηνεία που συνάδει με ανευπλοειδία ολόκληρου του χρωμοσώματος, ανατρέξτε στον [Πίνακα 12](#) ως παράδειγμα.

Στην κλινική μελέτη, υπήρχαν δύο δείγματα μονήρους κύησης με σημαντικά μεγάλα διπλότυπα (ένα στο χρωμόσωμα 21 και ένα στο χρωμόσωμα 18) που ήταν μικρότερα από το 75% του σχετικού μεγέθους του χρωμοσώματος (ανατρέξτε στον [Πίνακα 12](#)). Και τα δύο συμβάντα αναφέρθηκαν ως εν μέρει διπλότυπα και όχι ως πλήρης τρισωμία για αυτό το χρωμόσωμα. Οι βαθμολογίες LLR για αυτά τα συμβάντα ήταν πάνω από την τιμή αποκοπής, συμφωνώντας με επηρεαζόμενο αποτέλεσμα για πλήρη τρισωμία. Για αντιστοίχιση είτε εν μέρει διπλότυπου είτε πλήρους τρισωμίας, η διαχείριση παρακολούθησης για ένα θετικό αποτέλεσμα του NIPT προσφέρει στον ασθενή έλεγχο επιβεβαίωσης μέσω προγεννητικής διάγνωσης.

Πίνακας 12 Παραδείγματα συμβάντων μεγάλων διπλότυπων που εντοπίστηκαν στην εξέταση ανίχνευσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα

	Κλινική αλήθεια	Αποτέλεσμα συστήματος σε ολόκληρο το γονιδίωμα	Μέγεθος ανωμαλίας (Mb)	% χρωμοσώματος	Βαθμολογίες LLR
Δείγμα 1	Τρισωμία 21 σε μονήρη κύηση	Εν μέρει διπλότυπο του 21	22,50	48,9	19,43
Δείγμα 2	Τρισωμία 18 σε μονήρη κύηση	Εν μέρει διπλότυπο του 18	47,00	60,2	12,99

Για πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με τις μετρήσεις ποιοτικού ελέγχου που χρησιμοποιούνται για την αναφορά αποτελεσμάτων ανευπλοειδίας, ανατρέξτε στον *Οδηγό λογισμικού VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2 (αρ. εγγράφου 1000000067940)*.

Χρωμοσώματα του φύλου

Τα αποτελέσματα του συστήματος VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2 για τα χρωμοσώματα του φύλου συγκρίθηκαν με το αποτέλεσμα του κλινικού προτύπου αναφοράς και παρουσιάζονται συνοπτικά στον παρακάτω πίνακα. Η ποσοστιαία συμφωνία υπολογίστηκε για κάθε χρωμόσωμα του φύλου σε κάθε αποτέλεσμα του κλινικού προτύπου αναφοράς. Η ποσοστιαία συμφωνία υπολογίστηκε ως ο αριθμός των δειγμάτων στα οποία η αντιστοίχιση του συστήματος VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2 για τα χρωμοσώματα του φύλου συμφωνούσε με την ταξινόμηση του κλινικού προτύπου αναφοράς, διαιρούμενος με τον συνολικό αριθμό δειγμάτων με την ίδια ταξινόμηση του κλινικού προτύπου αναφοράς.

Πίνακας 13 Ποσοστιαία συμφωνία για την ταξινόμηση εμβρυϊκού φύλου*

Ταξινόμηση εμβρυϊκού φύλου		Φαινότυπος από την κλινική εξέταση του νεογέννητου									
		Κυτταρογενετικά αποτελέσματα									
Ανιχνεύτηκε	Καρυό- τυπος	Θηλυκό	Αρσενικό	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY	Άλλο**	Ελλείπον
Δεν ανιχνεύτηκ ε ανωμαλία	XX	997	0	21	0	2	0	0	0	0	0
Δεν ανιχνεύτηκ ε ανωμαλία	XY	0	966	0	15	0	0	0	0	0	1
Ανιχνεύτηκ ε ανωμαλία	XO	0	0	0	0	19	0	0	1	0	0
Ανιχνεύτηκ ε ανωμαλία	XXX	0	0	0	0	0	17	0	0	1	0
Ανιχνεύτηκ ε ανωμαλία	XXY	0	0	0	0	0	0	23	0	1	0
Ανιχνεύτηκ ε ανωμαλία	XYY	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0
Σύνολο		997	966	21	15	21	17	23	12	2	1
Ποσοστό συμφωνίας		100	100	100	100	90,5	100	100	91,7	Δεν ισχύει	Δεν ισχύει

*Πέντε δίδυμες κυήσεις ταξινομήθηκαν σωστά ως κυήσεις με παρουσία Y. Δύο κυήσεις ταξινομήθηκαν σωστά ως κυήσεις χωρίς παρουσία Y.

** Άλλα κυτταρογενετικά αποτελέσματα ήταν XXXXX και XXYY.

Θετική προγνωστική τιμή και αρνητική προγνωστική τιμή του συστήματος VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2

Η θετική προγνωστική τιμή (Positive predictive value – PPV) και η αρνητική προγνωστική τιμή (negative predictive value – NPV) της εξέτασης παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την ικανότητα της εξέτασης να συμβάλλει στη λήψη κλινικών αποφάσεων με βάση την ευαισθησία και την ειδικότητα της εξέτασης και να ελέγχει προκαταρκτικά την πιθανότητα ένα έμβρυο να επηρεάζεται από τρισωμία (συχνότητα). Δεδομένου ότι η PPV και η NPV εξαρτώνται από τη συχνότητα και η συχνότητα για αυτές τις ανευπλοειδίες μπορεί να ποικίλλει σε διαφορετικούς πληθυσμούς ασθενών, η PPV και η NPV υπολογίστηκαν για ένα εύρος αληθοφανών τιμών συχνότητας με βάση τις τιμές της ευαισθησίας και της ειδικότητας που παρατηρήθηκαν στη βασική εξέταση ανίχνευσης (χωρίς γνωστά μωσαϊκά) της κλινικής μελέτης ακρίβειας. Ο Πίνακας 17 βασίζεται στην εξέταση ανίχνευσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα (με γνωστά μωσαϊκά).

Πίνακας 14 Συχνότητα τρισωμίας 21, PPV και NPV σε βασική εξέταση ανίχνευσης (εξαιρουμένων των γνωστών μωσαϊκών)

Συχνότητα (%)	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

Πίνακας 15 Συχνότητα τρισωμίας 18, PPV και NPV σε βασική εξέταση ανίχνευσης (εξαιρουμένων των γνωστών μωσαϊκών)

Συχνότητα (%)	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

Πίνακας 16 Συχνότητα τρισωμίας 13, PPV και NPV σε βασική εξέταση ανίχνευσης (εξαιρουμένων των γνωστών μωσαϊκών)

Συχνότητα (%)	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

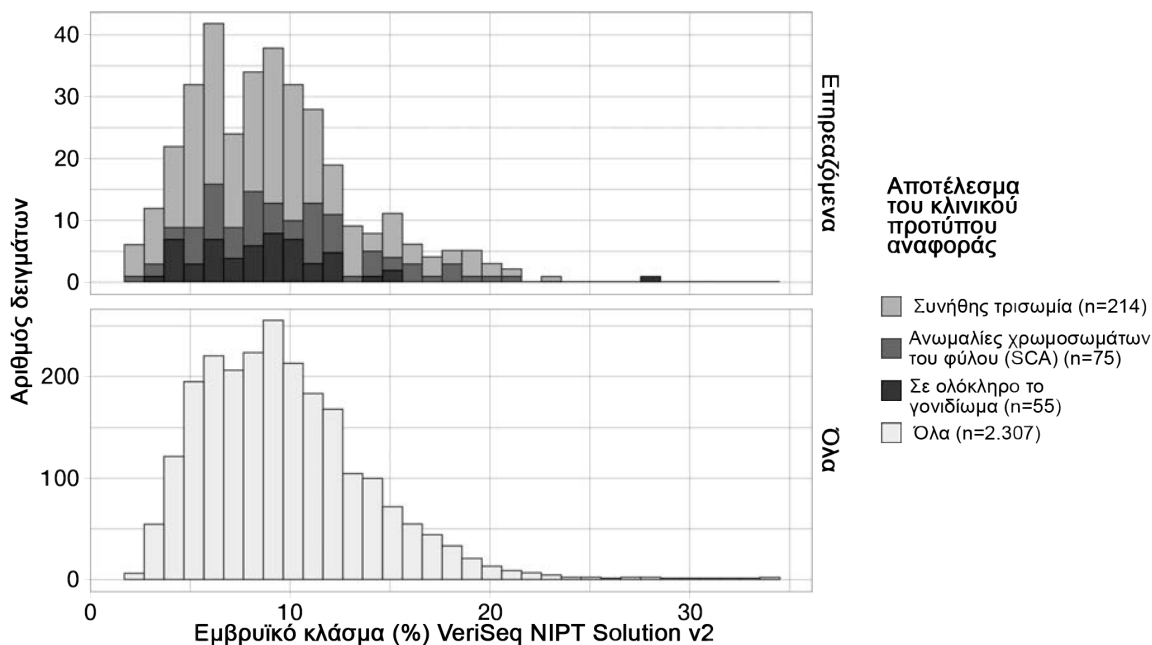
Πίνακας 17 Συχνότητα οποιασδήποτε ανωμαλίας, PPV και NPV σε εξέταση ανίχνευσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα (συμπεριλαμβανομένων των γνωστών μωσαϊκών)

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

Κατανομή εμβρυϊκών κλασμάτων

Η κατανομή των εκτιμήσεων εμβρυϊκού κλάσματος (FF) του VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2 από την εξέταση ανίχνευσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα με μωσαϊκά παρουσιάζεται ανά κατηγορία αποτελέσματος του κλινικού προτύπου αναφοράς στην [Εικόνα 1](#).

Εικόνα 1 Κατανομή εμβρυϊκών κλασμάτων



5 δείγματα είχαν ανωμαλίες σε πολλαπλές κατηγορίες.
 Η συνήθης τρισωμία περιλαμβάνει δείγματα με τρισωμία 21, 18 ή/και 13.
 Ο έλεγχος σε ολόκληρο το γονιδίωμα περιλαμβάνει δείγματα με RAA ή μερικές διαγραφές ή/και διπλασιασμούς.

Το εύρος των εκτιμήσεων του FF ήταν 2% έως 34% συνολικά με διάμεσο 9% και ενδοτεταρτημόριο (IQ) εύρος 6% έως 12%. Η διάμεση εκτίμηση του FF για συνήθεις τρισωμίες και συμβάντα που ανιχνεύτηκαν από την εξέταση ανίχνευσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα είναι 8% και για τις SCA είναι 9%. Το εύρος για τις εκτιμήσεις του FF ήταν συνεπές για όλα τα αποτελέσματα. Δεν υπάρχει εμφανής μεταβολή στην κατανομή του FF μεταξύ των κοινών τρισωμιών, των SCA και των συμβάντων που ανίχνευσε η εξέταση ανίχνευσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα ή όλων των δειγμάτων στην ανάλυση σε ολόκληρο το γονιδίωμα.

Απόδοση σε διδύμους κηύσεις

Εκτίμηση της απόδοσης για την τρισωμία 13, 18 και 21 και το χρωμόσωμα Y σε διδύμους κηύσεις

Λόγω της χαμηλής συχνότητας της τρισωμίας 21, 18 και 13 σε διδύμους κηύσεις, μικρός μόνον αριθμός επηρεαζόμενων δειγμάτων από διδύμους κηύσεις ήταν διαθέσιμος για την κλινική μελέτη. Για την εκτίμηση της απόδοσης του VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2 σε διδύμους κηύσεις, χρησιμοποιήθηκαν *in silico* μοντέλα με βάση παρατηρήσεις από κλινικά δείγματα για την προσομοίωση πληθυσμών διδύμων κηύσεων. Αυτή η προσομοίωση συμφωνούσε με τον πληθυσμό για την προβλεπόμενη χρήση. Η κατανομή του εμβρυϊκού κλάσματος προσδιορίστηκε από περίπου 4.500 δείγματα από διδύμους κηύσεις και συγκρίθηκε με την κατανομή από περίπου 120.000 δείγματα από μονήρεις κηύσεις. Η κατανομή του εμβρυϊκού κλάσματος που εξαρτάται από την κατάσταση ανευπλοειδίας προσδιορίστηκε από υποτιθέμενες αντιστοιχίσεις μονήρων κηύσεων (1.044 τρισωμίες 21, 307 τρισωμίες 18 και 192 τρισωμίες 13). Ο συνδυασμός των δύο κατανομών

επέτρεψε τη συναγωγή συμπερασμάτων για την ανίχνευση ανευπλοειδίας σε δίδυμα. Πραγματοποιήθηκε προσομοίωση συνόλων διζυγωτικών και μονοζυγωτικών διδύμων και υπολογίστηκε ένας σταθμισμένος μέσος όρος που αντιπροσωπεύει τη συχνότητά τους στον πληθυσμό προβλεπόμενης χρήσης (2 διζυγωτικά : 1 μονοζυγωτικό) για να εκτιμηθεί η ευαισθησία. Για την ειδικότητα, πραγματοποιήθηκε προσομοίωση συνόλων μη επηρεαζόμενων διδύμων.

Το κλάσμα κάθε προσομοιωμένου δείγματος που επηρεάζεται από την τρισωμία (δηλ. το επηρεαζόμενο κλάσμα) υπολογίστηκε διαφορετικά για κάθε κατηγορία δειγμάτων:

- Για τα μονοζυγωτικά δίδυμα, το επηρεαζόμενο κλάσμα κάθε δείγματος ορίστηκε σε 1,0 διότι, σε αυτήν την περίπτωση, η τρισωμία επηρεάζει και τα δύο δίδυμα.
- Για τα διζυγωτικά δίδυμα, ελήφθη ως υπόθεση ότι επηρεάστηκε μόνο το ένα δίδυμο (η πιθανότητα να επηρεαστούν και τα δύο διζυγωτικά δίδυμα είναι εξαιρετικά σπάνια). Πραγματοποιήθηκε προσομοίωση των τιμών επηρεαζόμενου κλάσματος με χρήση της γνωστής κατανομής των λόγων εμβρυϊκού κλάσματος όπως προσδιορίστηκε από κλινικά δείγματα διδύμων διαφορετικού φύλου. Εφαρμόστηκε μια συντηρητική προσέγγιση στο πλαίσιο της οποίας ελήφθη ως υπόθεση ότι το επηρεαζόμενο δίδυμο είχε πάντα το χαμηλότερο εμβρυϊκό κλάσμα μεταξύ των δύο διδύμων. Εφαρμόστηκε συντελεστής διόρθωσης για τα εμβρυϊκά κλάσματα που ήταν κατά μέσο όρο χαμηλότερα σε κυήσεις με τρισωμία 13 και 18.
- Για τα μη επηρεαζόμενα δίδυμα, το επηρεαζόμενο κλάσμα κάθε δείγματος ορίστηκε σε μηδέν.

Για τα δίδυμα που επηρεάζονται από την τρισωμία 18 ή 13, το εμβρυϊκό κλάσμα που αντιστοιχεί στο επηρεαζόμενο κλάσμα του δείγματος μειώθηκε. Η μείωση ήταν αναλογική προς τη μέση μείωση του εμβρυϊκού κλάσματος που παρατηρήθηκε σε κλινικά δεδομένα σε μονήρεις κυήσεις με τρισωμία 18 ή 13 έναντι μονήρων κυήσεων με ευπλοειδία.

Τόσο το συνολικό εμβρυϊκό κλάσμα όσο και το επηρεαζόμενο κλάσμα κάθε προσομοιωμένου δείγματος χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για τον υπολογισμό βαθμολογίας για την ανευπλοειδία με τη χρήση του τυπικού αλγορίθμου του συστήματος VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2. Η ευαισθησία υπολογίστηκε με καθορισμό της συχνότητας με την οποία οι βαθμολογίες για την ανευπλοειδία για τα προσομοιωμένα επηρεαζόμενα δείγματα διδύμων ήταν πάνω από την αντίστοιχη τιμή αποκοπής για την ανευπλοειδία. Αντίστοιχα, η ειδικότητα υπολογίστηκε με καθορισμό της συχνότητας με την οποία οι βαθμολογίες για την ανευπλοειδία για τα προσομοιωμένα μη επηρεαζόμενα δείγματα διδύμων ήταν κάτω από την αντίστοιχη τιμή αποκοπής για την ανευπλοειδία. (Πίνακας 18). Η εκτίμηση των διαστημάτων εμπιστοσύνης 95% έγινε με βάση τον αριθμό πραγματικών κλινικών δειγμάτων διδύμων στο αρχικό σύνολο δεδομένων, τα οποία ταξινομήθηκαν είτε ως επηρεαζόμενα είτε ως μη επηρεαζόμενα από τη σχετική τρισωμία.

Για την εκτίμηση της ευαισθησίας για το χρωμόσωμα Y σε δείγματα διδύμων, πραγματοποιήθηκε προσομοίωση συνόλων διδύμων XY/XY και XX/XY. Προέκυψε ένας σταθμισμένος μέσος όρος που αντιπροσωπεύει τη συχνότητά τους στον πληθυσμό προβλεπόμενης χρήσης (1 XY/XY : 1 XX/XY). Για την εκτίμηση της ειδικότητας για το χρωμόσωμα Y σε δείγματα διδύμων, πραγματοποιήθηκε προσομοίωση ενός συνόλου διδύμων XX/XX. Πραγματοποιήθηκε προσομοίωση των τιμών συνολικού εμβρυϊκού κλάσματος σύμφωνα με τη γνωστή κατανομή του εμβρυϊκού κλάσματος σε κλινικά δείγματα διδύμων.

Για τα δίδυμα XY/XY και XX/XY, η εκτίμηση των αντίστοιχων βαθμολογιών για το χρωμόσωμα Y έγινε με τη χρήση της γνωστής σχέσης μεταξύ του εμβρυϊκού κλάσματος και των βαθμολογιών για το χρωμόσωμα Y σε κλινικά δείγματα μονήρων κυήσεων που ταξινομήθηκαν ως αρσενικά. Για τα δίδυμα XX/XY μόνο,

πραγματοποιήθηκε προσομοίωση των επηρεαζόμενων (δηλ. αρσενικών) τιμών εμβρυϊκού κλάσματος με χρήση της γνωστής κατανομής των λόγων εμβρυϊκού κλάσματος που παρατηρήθηκαν μεταξύ διδύμων από την ίδια κύηση, όπως προσδιορίστηκε από κλινικά δείγματα διδύμων διαφορετικού φύλου. Εφαρμόστηκε μια συντηρητική προσέγγιση σύμφωνα με την οποία το επηρεαζόμενο κλάσμα επιλέχθηκε έτσι ώστε να αντιστοιχεί στο μικρότερο από τα δύο δίδυμα. Για κάθε προσομοιωμένο δείγμα XX/XY, η βαθμολογία για το χρωμόσωμα Y πολλαπλασιάστηκε με το επηρεαζόμενο κλάσμα.

Για τα δίδυμα XX/XX, οι βαθμολογίες για το χρωμόσωμα Y ελήφθησαν από τις βαθμολογίες που παρατηρήθηκαν σε κλινικά δείγματα μονήρων κυήσεων που ταξινομήθηκαν ως θηλυκά. Η βαθμολογία για το χρωμόσωμα Y και το συνολικό εμβρυϊκό κλάσμα χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για την ταξινόμηση κάθε προσομοιωμένου δείγματος ως δείγματος με παρουσία χρωμοσώματος Y ή δείγματος με απουσία χρωμοσώματος Y με τη χρήση του τυπικού αλγορίθμου του συστήματος VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2.

Η ευαισθησία υπολογίστηκε με καθορισμό της συχνότητας ορθής ταξινόμησης των προσομοιωμένων δειγμάτων διδύμων XY/XY ή XX/XY ως δειγμάτων με παρουσία χρωμοσώματος Y. Η ειδικότητα υπολογίστηκε με καθορισμό της συχνότητας ορθής ταξινόμησης των προσομοιωμένων δειγμάτων διδύμων XX/XX ως δειγμάτων με απουσία χρωμοσώματος Y. Η εκτίμηση των διαστημάτων εμπιστοσύνης 95% έγινε με βάση τον αριθμό των πραγματικών κλινικών δειγμάτων διδύμων στο αρχικό σύνολο δεδομένων που ταξινομήθηκαν ως δείγματα με παρουσία χρωμοσώματος Y ή απουσία χρωμοσώματος Y.

Πίνακας 18 Εκτιμήσεις για την τρισωμία 21, 18 και 13 σε προσομοιωμένο πληθυσμό διδύμων κυήσεων

	Τρισωμία 21	Τρισωμία 18	Τρισωμία 13	Παρουσία Y
Ευαισθησία	96,4%	95,7%	93,6%	> 99,9%
Αμφίπλευρο CI 95%	(86,4%, 98,9%)	(68,3%, 99,4%)	(64,1%, 98,9%)	(99,9%, > 99,9%)
Ειδικότητα	99,9%	> 99,9%	> 99,9%	> 99,9%
Αμφίπλευρο CI 95%	(99,8%, > 99,9%)	(99,9%, > 99,9%)	(99,9%, > 99,9%)	(99,7%, > 99,9%)

Ο Πίνακας 18 παρέχει σημειακές εκτιμήσεις και εκτιμώμενα διαστήματα εμπιστοσύνης 95% για την ευαισθησία και την ειδικότητα του VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2 όσον αφορά την ανίχνευση της τρισωμίας 21, 18, 13 και της παρουσίας του χρωμοσώματος Y σε προσομοιωμένο πληθυσμό διδύμων κυήσεων που συνάδει με τον πληθυσμό προβλεπόμενης χρήσης. Η εκτίμηση των διαστημάτων εμπιστοσύνης έγινε με βάση τον αριθμό των κλινικών δειγμάτων διδύμων που ολοκλήρωσαν επιτυχώς τον ποιοτικό έλεγχο και τα οποία ταξινομήθηκαν είτε ως επηρεαζόμενα είτε ως μη επηρεαζόμενα από τη σχετική τρισωμία. Για τον υπολογισμό της ευαισθησίας λαμβάνεται ως υπόθεση ότι τα δύο τρίτα των επηρεαζόμενων διδύμων κυήσεων είναι διζυγωτικές με ένα επηρεαζόμενο δίδυμο, ενώ το ένα τρίτο των επηρεαζόμενων διδύμων κυήσεων είναι μονοζυγωτικές με αμφότερα τα δίδυμα να επηρεάζονται.

Οι εκτιμήσεις που παρατίθενται στον Πίνακα 18 αφορούν μόνο διδύμους κυήσεις. Λόγω της ακόμη χαμηλότερης συχνότητας, τα δεδομένα για κυήσεις περισσότερων εμβρύων (τρίδυμες και άνω) ήταν ανεπαρκή για την καθιέρωση κατάλληλων στατιστικών μοντέλων για την εκτίμηση της ακρίβειας ανίχνευσης ανευπλοειδίας.

Αναλυτική απόδοση

Ακρίβεια

Για την αξιολόγηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της ακρίβειας του προσδιορισμού, διενεργήθηκε εκ νέου ανάλυση των δεδομένων με τη χρήση του λογισμικού διαδικασίας ανάλυσης VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2 από τις δύο προηγούμενες μελέτες από το VeriSeq NIPT Solution:

- Μια μελέτη αναπαραγωγιμότητας σε πολλαπλά εργαστήρια που περιλάμβανε τρεις εκτελέσεις από τρεις χειριστές σε τρία εργαστήρια με τη χρήση μίας παρτίδας αντιδραστηρίου για συνολικά εννέα εκτελέσεις.
- Μια μελέτη ενδοεργαστηριακής ακρίβειας που περιλάμβανε 12 εκτελέσεις σε ένα εργαστήριο με τη χρήση δύο ML STAR, δύο συστημάτων οργάνων αλληλούχησης και τριών παρτίδων αντιδραστηρίων αλληλούχησης.

Στόχος της μελέτης ακρίβειας ήταν ο ποσοτικός προσδιορισμός της ακρίβειας του προσδιορισμού όσον αφορά την τρισωμία 21 (T21) και το χρωμόσωμα Y, καθώς και η εκτίμηση της μεταβλητότητας μεταξύ διαφορετικών οργάνων, κιτ προετοιμασίας βιβλιοθήκης και παρτίδων αντιδραστηρίων αλληλούχησης.

Δημιουργήθηκε μια δεξαμενή T21 εμβρυϊκού κλάσματος 5% με συνδυασμό cfDNA που εξήχθη από μητρικό πλάσμα από έγκυες γυναίκες (με έμβρυο επηρεαζόμενο από T21) και cfDNA που εξήχθη από πλάσμα από μη έγκυες γυναίκες. Δημιουργήθηκε επίσης δεξαμενή μητρικού-αρσενικού (έμβρυο XY) cfDNA με εμβρυϊκό κλάσμα 10%. Το πάνελ δειγμάτων για κάθε μελέτη για κάθε εκτέλεση περιλάμβανε 4 αντίγραφα της δεξαμενής επηρεαζόμενων από T21 δειγμάτων με εμβρυϊκό κλάσμα 5% και 20 αντίγραφα της δεξαμενής μητρικού-αρσενικού cfDNA με εμβρυϊκό κλάσμα 10%. Ο έλεγχος διενεργήθηκε για 10 ημέρες για σύνολο 21 εκτελέσεων για τις δύο μελέτες συνδυαστικά.

Η T21 και η παρουσία χρωμοσώματος Y επιλέχθηκαν για αξιολόγηση με βάση την αντιπροσωπευτικότητα των κλινικών καταστάσεων και την πολυπλοκότητα ανίχνευσης της ανωμαλίας. Δεδομένου ότι πρόκειται για το μικρότερο ανθρώπινο αυτόσωμα, το μέγεθος του χρωμοσώματος 21 έχει άμεσο αντίκτυπο στην ευαισθησία ανίχνευσης της T21, ιδίως σε χαμηλές τιμές εμβρυϊκού κλάσματος, όπως εκείνες που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν τη μελέτη. Το χρωμόσωμα Y, όπως υπάρχει στο μητρικό πλάσμα, είναι αποκλειστικά εμβρυϊκής προέλευσης και, συνεπώς, είναι πιο εύκολο να ανιχνευτεί από τον προσδιορισμό.

Ο μέσος όρος και οι τυπικές αποκλίσεις που παρατηρήθηκαν για τη βαθμολογία LLR για το χρωμόσωμα 21 και οι κανονικοποιημένες χρωμοσωμικές τιμές (normalized chromosomal values – NCV) για το χρωμόσωμα Y έδειξαν ότι η τυπική απόκλιση (standard deviation – SD) των αντιγράφων ήταν η μεγαλύτερη πηγή μεταβλητότητας. Οι διαφοροποιήσεις μεταξύ των εργαστηρίων, των οργάνων και των παρτίδων αντιδραστηρίων προσέθεσαν ασήμαντο βαθμό μεταβλητότητας, όπως καταδεικνύει η διαφορά μεταξύ της συνολικής SD και της SD αντιγράφων στον [Πίνακα 19](#) και στον [Πίνακα 20](#).

Πίνακας 19 Σύνοψη τυπικής απόκλισης (SD) (αναπαραγωγιμότητας) για την απόκριση αλληλούχισης σε πολλαπλά εργαστήρια

Απόκριση	N	Μέσος	SD αντιγράφων	Συνολική SD αναπαραγωγιμότητας*
Βαθμολογία LLR για το χρωμόσωμα 21	36	34,43	11,36	11,36
NCV χρωμοσώματος Y	180	190,56	7,96	10,20

*Το σύνολο περιλαμβάνει τη μεταβλητότητα λόγω εργαστηρίου, χειριστή, εκτέλεσης, ημέρας και αντιγράφου.

Πίνακας 20 Σύνοψη της ενδοεργαστηριακής ακρίβειας απόκρισης αλληλούχισης

Απόκριση	N	Μέσος	SD αντιγράφων	Σύνολο ενδοεργαστηριακής SD*
Βαθμολογία LLR για το χρωμόσωμα 21	48	36,01	9,07	10,25
NCV χρωμοσώματος Y	240	198,68	7,63	7,82

*Το σύνολο περιλαμβάνει τη μεταβλητότητα λόγω οργάνου αλληλούχισης, παρτίδας αντιδραστηρίου, χειριστή, εκτέλεσης, ημέρας και αντιγράφου.

Διεξήχθη πρόσθετη μελέτη για τη σύγκριση της ακρίβειας αλληλούχισης του συστήματος VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2 (συνολική τυπική απόκλιση) με τη χρήση της έκδοσης 2.0 μιας κυψελίδας ροής αντί της έκδοσης 2.5. Η μελέτη περιλάμβανε δύο τύπους κυψελίδων ροής (έκδ. 2.0 και έκδ. 2.5), τρεις παρτίδες κιτ αλληλούχισης, τέσσερα συστήματα οργάνων και δύο εκτελέσεις αλληλούχισης ανά συνδυασμό για σύνολο 48 εκτελέσεων σε ένα μόνο εργαστήριο. Προετοιμάστηκε μία δεξαμενή αλληλούχισης από πλάκες cfDNA οι οποίες προετοιμάστηκαν χειροκίνητα. Το πάνελ δειγμάτων περιλάμβανε 4 αντίγραφα της δεξαμενής επηρεαζόμενων από T21 δειγμάτων με εμβρυϊκό κλάσμα 5% και 20 αντίγραφα της δεξαμενής μητρικού-αρσενικού (έμβρυο XY) cfDNA με εμβρυϊκό κλάσμα 10%. Τα αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάζονται στον Πίνακα 21 και υποστηρίζουν ότι δεν υπάρχει διαφορά στην ακρίβεια αλληλούχισης κατά τη χρήση κυψελίδας ροής έκδ. 2.0 έναντι κυψελίδας ροής έκδ. 2.5.

Πίνακας 21 Σύνοψη της ακρίβειας απόκρισης αλληλούχισης με τη χρήση κυψελίδας ροής έκδ. 2.0 έναντι κυψελίδας ροής έκδ. 2.5

Απόκριση	Αριθμός παρατηρήσεων ανά έκδοση	Συνολική SD για την έκδ. 2.0*	Συνολική SD για την έκδ. 2.5*	Στατιστικό αποτέλεσμα**
Βαθμολογία LLR για το χρωμόσωμα 21	96	9,56	8,44	Στατιστικά ισοδύναμο (τιμή p = 0,25)
NCV χρωμοσώματος Y	480	7,74	7,38	Στατιστικά ισοδύναμο (τιμή p = 0,38)

*Το σύνολο περιλαμβάνει τη μεταβλητότητα λόγω οργάνου αλληλούχησης, παρτίδας αντιδραστηρίου, εκτέλεσης, ημέρας, αντιγράφου

**Βάσει ελέγχου F για την ισότητα των διακυμάνσεων (τυπικές αποκλίσεις στο τετράγωνο)

Διασταυρούμενη μόλυνση

Η διασταυρούμενη μόλυνση αξιολογήθηκε στη ροή εργασιών προετοιμασίας δειγμάτων του VeriSeq NIPT Solution. Δεξαμενές πλάσματος από μη έγκυες γυναίκες (XX) και ενήλικους άνδρες (XY) ελέγχθηκαν με τη μέθοδο της σκακιέρας (checkerboard) στη μορφή πλάκας 96 βοθρίων σε 4 πλάκες. N = 48 για τα θηλυκά δείγματα και 48 για τα αρσενικά δείγματα ανά πλάκα, για σύνολο 192 θηλυκών και 192 αρσενικών δειγμάτων. Κανένα από τα θηλυκά δείγματα δεν κατέδειξε κάλυψη με το χρωμόσωμα Y στατιστικά υψηλότερη από το εκτιμώμενο υπόβαθρο, γεγονός που υποδεικνύει απουσία διασταυρούμενης μόλυνσης από αρσενικά δείγματα εντός της ίδιας πλάκας. Δεν παρατηρήθηκε ανιχνεύσιμη διασταυρούμενη μόλυνση στο VeriSeq NIPT Solution.

Δυνητικά παρεμβαλλόμενες ουσίες

Ο αντίκτυπος δυνητικά παρεμβαλλόμενων ουσιών αξιολογήθηκε στο VeriSeq NIPT Solution με την αξιολόγηση της απόδοσης του προσδιορισμού παρουσία τέτοιων ουσιών.

Δεξαμενές μητρικού πλάσματος από μη επηρεαζόμενες κυήσεις θηλυκών εμβρύων (έμβρυο XX) ενοφθαλμίστηκαν με λευκωματίνη, χολερυθρίνη, αιμοσφαιρίνη και τριγλυκερίδια (ενδογενή). Ελέγχθηκαν σε δύο συγκεντρώσεις για κάθε ουσία της εξέτασης (n=16 για εκάστη). Δεν παρατηρήθηκε παρεμβολή στην απόδοση του προσδιορισμού.

Πίνακας 22 Δυνητικά παρεμβαλλόμενες ουσίες (ενδογενείς)

Εξεταζόμενη ουσία	Χαμηλή συγκέντρωση εξέτασης (mg/mL)	Υψηλή συγκέντρωση εξέτασης (mg/mL)
Λευκωματίνη	35	50
Χολερυθρίνη	0,01	0,15
Αιμοσφαιρίνη	100	200
Τριγλυκερίδια	1,5	5

Το γονιδιωματικό DNA που προκύπτει φυσικά (gDNA) στο πλάσμα μπορεί επίσης να επηρεάσει την απόδοση του προσδιορισμού, καθώς μπορεί να εξαχθεί μαζί με το εμβρυϊκό cfDNA. Τα επίπεδα του γονιδιωματικού DNA στα 1,6, 3,3 και 4,9 ng ανά δείγμα (τα οποία αντιστοιχούν σε τυπικές αποκλίσεις 1, 2 και 3 πάνω από τη μέση αναμενόμενη συγκέντρωση gDNA έπειτα από 7 ημέρες αποθήκευσης του ολικού αίματος¹²) προστέθηκαν στο cfDNA που εξήχθη από μητρικό πλάσμα από μη επηρεαζόμενες κυήσεις θηλυκών εμβρύων (έμβρυο XX). Στη συνέχεια, τα δείγματα ελέγχθηκαν στο σύστημα VeriSeq NIPT Solution (n=16 για κάθε συγκέντρωση). Δεν παρατηρήθηκε παρεμβολή στην απόδοση του προσδιορισμού παρουσία αυξημένων επιπέδων gDNA.

Είκοσι δυνητικά παρεμβαλλόμενες ουσίες που βασίζονται σε φάρμακα (εξωγενείς) και οι οποίες χρησιμοποιούνται συνήθως ή συνταγογραφούνται κατά τη διάρκεια της κύησης ελέγχθηκαν σύμφωνα με την κατευθυντήρια γραμμή EP7-A2 [Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline-Second Edition

(Έλεγχος παρεμβαλλόμενων ουσιών στην κλινική χημεία. Εγκεκριμένη κατευθυντήρια γραμμή, δεύτερη έκδοση)]. Οι 20 δυνητικά παρεμβαλλόμενες ουσίες συνδυάστηκαν σε τέσσερις δεξαμενές, ενοφθαλμίστηκαν σε μητρικό πλάσμα από μη επηρεαζόμενες κυήσεις θηλυκών εμβρύων (έμβρυο XX) και ελέγχθηκαν στο VeriSeq NIPT Solution (N=16 για κάθε δεξαμενή). Δεν παρατηρήθηκε παρεμβολή στην απόδοση του προσδιορισμού παρουσία αυτών των εξωγενών ουσιών.

Πίνακας 23 Δυνητικά παρεμβαλλόμενες ουσίες (εξωγενείς)

Δεξαμενή 1	Δεξαμενή 2	Δεξαμενή 3	Δεξαμενή 4
Ακεταμινοφαίνη	Διφαινυδραμίνη	Αλβουτερόλη	Σετιριζίνη
Ακετυλοκυστεΐνη	Ερυθρομυκίνη	Βουπροπρόνη	Δεξτρομεθορφάνη
Βισοπρολόλη	Γουαΐφενεσίνη	Καφεΐνη	L-ασκορβικό οξύ
Σιταλοπράμη	Ηπαρίνη	Σερτραλίνη	Μετοπρολόλη
Δεσλοραταδίνη	Λιδοκαΐνη	Φθοριούχο νάτριο	Ναδολόλη

Όριο ανίχνευσης

Το όριο ανίχνευσης (LOD) ορίζεται ως το επίπεδο του εμβρυϊκού κλάσματος που αντιστοιχεί στην πιθανότητα ανίχνευσης 95% μιας κατάστασης ενδιαφέροντος, όπως η τρισωμία 21 (T21). Για την αξιολόγηση του LOD του συστήματος VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2 για διάφορες συνήθεις καταστάσεις, διεξήχθησαν μελέτες και στατιστικές αναλύσεις.

Η πιθανότητα ανίχνευσης μιας κατάστασης ενδιαφέροντος σε ένα επηρεαζόμενο δείγμα που υποβάλλεται σε επεξεργασία με το σύστημα VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2 εξαρτάται κυρίως από τρεις παράγοντες:

- εμβρυϊκό κλάσμα
- βάθος αλληλούχισης
- μέγεθος και πολυπλοκότητα της γονιδιωματικής περιοχής ενδιαφέροντος.

Εάν ληφθεί ως υπόθεση ότι το βάθος αλληλούχισης είναι σταθερό, μια δεδομένη απόκλιση είναι πιο εύκολο να ανιχνευτεί σε ένα δείγμα με υψηλότερο ποσοστό εμβρυϊκού κλάσματος απ' ό,τι σε ένα δείγμα με χαμηλότερο ποσοστό εμβρυϊκού κλάσματος. Αντιθέτως, εάν ληφθεί ως υπόθεση ότι το εμβρυϊκό κλάσμα είναι σταθερό, μια δεδομένη απόκλιση είναι πιο εύκολο να ανιχνευτεί σε ένα δείγμα με μεγαλύτερο βάθος αλληλούχισης απ' ό,τι σε ένα δείγμα με μικρότερο βάθος αλληλούχισης. Τέλος, οι αποκλίσεις σε μικρότερες ή πιο πολύπλοκες γονιδιωματικές περιοχές είναι πιο δύσκολο να ανιχνευτούν απ' ό,τι οι αποκλίσεις σε μεγαλύτερες ή λιγότερο πολύπλοκες γονιδιωματικές περιοχές, εάν ληφθεί ως υπόθεση ότι το εμβρυϊκό κλάσμα και το βάθος αλληλούχισης είναι σταθερά.

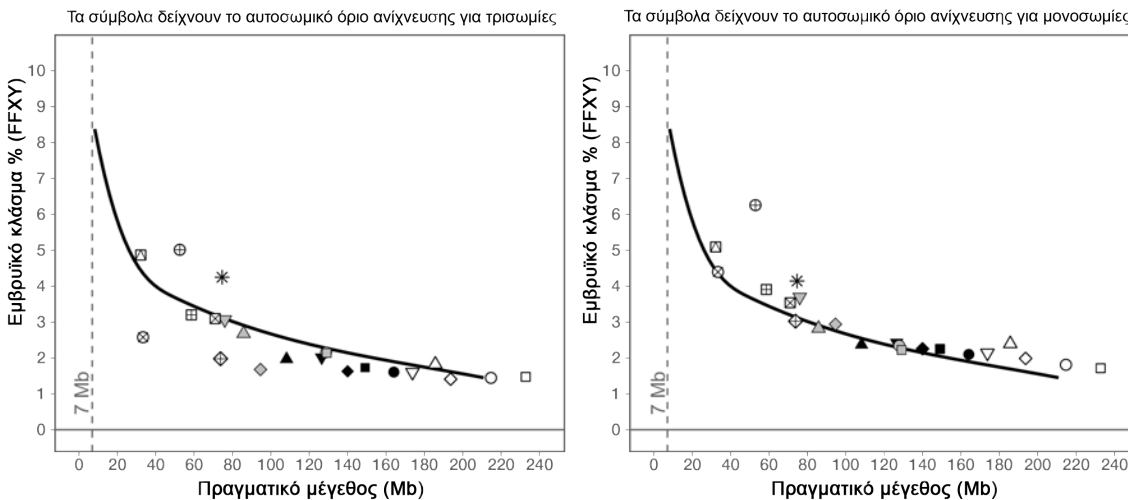
Για να προσδιοριστεί το LOD για την ανίχνευση της T21, αναλύθηκαν δείγματα που περιείχαν μείγματα δεξαμενοποιημένων δειγμάτων T21 και δεξαμενοποιημένων μη επηρεαζόμενων δειγμάτων. Οι δύο τύποι αναλυόμενης ουσίας αναμείχθηκαν σε μια σειρά τιτλοποίησης για να δημιουργηθεί ένα σύνολο επτά επιπέδων εμβρυϊκού κλάσματος (0, 2, 3, 4, 5, 6 και 10%). Κάθε επίπεδο αντιπροσωπευόταν από συνολικά 10 αντίγραφα.

Για την περαιτέρω αύξηση της ανάλυσης του πίνακα εμβρυϊκών κλασμάτων για την ανάλυση LOD, στα δεδομένα από αυτήν τη μελέτη προστέθηκαν δεδομένα που ελήφθησαν από αραίωση *in silico*. Οι επιδράσεις της πειραματικής αραίωσης και της τιτλοποίησης προσομοιώθηκαν με ελεγχόμενη ανάμειξη των δεδομένων αλληλούχισης. Τα δεδομένα από αυτήν την *in silico* τιτλοποίηση κάλυπταν ένα σύνολο 14 επιπέδων εμβρυϊκού κλάσματος (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 και 4,50%) με 32 αντίγραφα για κάθε επίπεδο. Στα δεδομένα που προέκυψαν εφαρμόστηκε ανάλυση πιθανομονάδων (probit) για να προσδιοριστεί το LOD για την T21.

Ανεξάρτητα από τα παραπάνω, αναπτύχθηκε ένα στατιστικό μοντέλο που χρησιμοποιούσε το εμβρυϊκό κλάσμα, το βάθος αλληλούχισης και το μέγεθος/την πολυπλοκότητα του γονιδιώματος για την πρόβλεψη της πιθανότητας ανίχνευσης τυχόν απόκλισης σε οποιοδήποτε δείγμα. Αυτό το μοντέλο δημιουργήθηκε από τα δεδομένα που αντιστοιχούσαν σε ένα σύνολο 1.405 δειγμάτων XY. Το LOD για την T21, όπως προβλέφθηκε από αυτό το μοντέλο, προσδιορίστηκε ότι είναι σύμφωνο με την εκτίμηση που βασίστηκε σε ανάλυση πιθανομονάδων (probit), η οποία περιγράφεται παραπάνω. Αυτό το στατιστικό μοντέλο χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση των τιμών LOD για ανευπλοειδίες σε όλα τα αυτοσώματα και για εν μέρει απαλοιφές και διπλότητα.

Η **Εικόνα 2** δείχνει την πιθανότητα ανίχνευσης 95% για μέσες περιοχές ανά μέγεθος και τα αυτοσωμικά όρια ανίχνευσης για όλες τις τρισωμίες και όλες τις μονοσωμίες.

Εικόνα 2 Πιθανότητες ανίχνευσης 95% για μέσες περιοχές ανά μέγεθος για το VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2



Chr	Σύμβολο	Τρισωμία		Μονοσωμία	
		Τιμή αποκοπής LLR	LoD (%)	Τιμή αποκοπής LLR	LoD (%)
1	○	7	1,44	13,2	1,80
2	□	9	1,47	13,6	1,71
3	◇	5	1,41	13,8	1,99
4	△	7	1,82	15,2	2,39
5	▽	7,6	1,60	17	2,14
6	●	7,3	1,60	15,4	2,09
7	■	6,6	1,73	14	2,25
8	◆	5,8	1,63	14,8	2,25
9	▲	8	1,97	13,6	2,37
10	▼	8,8	2,01	14,7	2,42
11	●	12,2	2,14	15,7	2,35

Chr	Σύμβολο	Τρισωμία		Μονοσωμία	
		Τιμή αποκοπής LLR	LoD (%)	Τιμή αποκοπής LLR	LoD (%)
12	■	11,6	2,14	12,8	2,22
13	◇	3	1,68	16,5	2,94
14	△	12,7	2,68	14,7	2,82
15	▽	9,8	3,07	16,4	3,69
16	⊠	10,7	3,10	15,3	3,54
17	*	16,8	4,25	15,7	4,14
18	⊕	3	1,98	11,3	3,02
19	⊗	15,5	5,01	27,5	6,26
20	⊞	10,6	3,20	18,2	3,91
21	⊗	2,5	2,58	13,2	4,40
22	⊞	13,5	4,87	15,3	5,09

Αντιμετώπιση προβλημάτων

Αντιμετώπιση προβλημάτων του VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2

Λειτουργία αποτυχίας	Πιθανό αποτέλεσμα	Ερμηνεία	Συνιστώμενη ενέργεια	Σχόλια
Εισαγωγή ανεπαρκούς πλάσματος	Αποτυχία ποιοτικού ελέγχου δείγματος	Ανεπαρκής όγκος πλάσματος.	Εκ νέου λήψη.	Βάσει οπτικής επιθεώρησης του όγκου πλάσματος.
Αποτυχία σωλήνα αίματος	Το αίμα δεν διαχωρίζεται σε στρώματα	Το δείγμα δεν υποβλήθηκε σε φυγοκέντριση.	Βεβαιωθείτε ότι η φυγοκέντριση ξεκίνησε και ότι ο σωλήνας περιστράφηκε με τη σωστή δύναμη. Επαναλάβετε τη λήψη δείγματος.	
		Ακατάλληλη αποθήκευση ή μεταφορά δείγματος (αιμόλυση δείγματος).	Επαναλάβετε τη λήψη δείγματος.	Τα κατεψυγμένα δείγματα δεν θα διαχωριστούν. Οι ακατάλληλες συνθήκες μεταφοράς ή αποθήκευσης ενδέχεται να οδηγήσουν σε αιμόλυση των δειγμάτων.

Λειτουργία αποτυχίας	Πιθανό αποτέλεσμα	Ερμηνεία	Συνιστώμενη ενέργεια	Σχόλια
Απόφραξη δείγματος ή αργή ροή	Μόλυνση πλάσματος	Μεμονωμένα δείγματα μπορεί να προκαλέσουν απόφραξη της πλάκας δέσμευσης εάν υπάρχει σημαντική μόλυνση στο δείγμα πλάσματος.	Επιθεωρήστε το δείγμα. Εάν το εναπομείναν πλάσμα στον σωλήνα είναι κόκκινο ή γαλακτερό, ακυρώστε το δείγμα και ζητήστε εκ νέου λήψη. Εάν το δείγμα φαίνεται φυσιολογικό, επανεξετάστε το δείγμα.	
Υπερχείλιση δείγματος		Ανεπαρκής οπτική επιθεώρηση κάθε σωλήνα ως προς την καταλληλότητα των δειγμάτων.	Ακυρώστε τυχόν δείγματα σε παρακείμενα βοθρία που επηρεάζονται από την υπερχείλιση.	Ενδέχεται να υποδεικνύει ότι πριν από την επεξεργασία μεταφέρθηκαν ή αποθηκεύτηκαν δείγματα με εσφαλμένο τρόπο. Αποκλείστε τα ακατάλληλα δείγματα από την επεξεργασία.
Δυσλειτουργία υλικού		Ανεπαρκής χώνευση του υλικού κατά την εξαγωγή.	Επανεξετάστε το δείγμα. Εάν το πρόβλημα συνεχίζεται στο σημείο των βοθρίων με άλλα δείγματα, επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής υποστήριξης της Illumina.	

Λειτουργία αποτυχίας	Πιθανό αποτέλεσμα	Ερμηνεία	Συνιστώμενη ενέργεια	Σχόλια
Αποτυχία ποιοτικού ελέγχου ανάλυσης μεμονωμένου δείγματος	Αποτυχία ποιοτικού ελέγχου αλληλούχισης	Οι πιθανές αιτίες έχουν ως εξής: <ul style="list-style-type: none"> • Ανεπαρκής εισαγωγή γενετικού υλικού • Εσφαλμένη μεταφορά κατά τη διάρκεια του χειρισμού του δείγματος • Αποτυχία αντιδραστηρίου αλληλούχισης 	Ελέγξτε την επισημείωση του δείγματος. Ελέγξτε για παρόμοια απόδοση σε προηγούμενα δείγματα σε σχετική θέση πλάκας. Επανεξετάστε το δείγμα.	Υποδεικνύει είτε εισαγωγή ανεπαρκούς δείγματος είτε εσφαλμένη μεταφορά στο ML STAR. Το ανεπαρκές γενετικό υλικό μπορεί να οφείλεται σε ανεπαρκές ελεύθερο κυττάρων DNA στο πλάσμα ή σε κυτταρικό DNA που προκαλεί υπεραραίωση του δείγματος για την αλληλούχιση.
	Χαμηλό FF ή χαμηλός αριθμός μη αποκλειόμενων περιοχών (NES)	Δημιουργήθηκαν ανεπαρκή δεδομένα για να γίνει ακριβής αναφορά.	Επανεξετάστε από πλάσμα.	

Λειτουργία αποτυχίας	Πιθανό αποτέλεσμα	Ερμηνεία	Συνιστώμενη ενέργεια	Σχόλια
Αποτυχία ποιοτικού ελέγχου ποσοτικού προσδιορισμού	Η εκτέλεση ποσοτικού προσδιορισμού απέτυχε. Διάμεσος παρτίδας κάτω από την ελάχιστη τιμή	Ανεπαρκής απόδοση διαδικασίας.	Επαναλάβετε τον ποσοτικό προσδιορισμό. Εάν η επανάληψη αποτύχει, επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής υποστήριξης της Illumina.	Οι μετρήσεις πρότυπης καμπύλης με αποτυχημένο αποτέλεσμα υποδεικνύουν είτε προβλήματα με την προετοιμασία βιβλιοθήκης (δηλ. χρήση αιθανόλης μη βιολογικής ποιότητας) είτε προβλήματα με τη διαδικασία ποσοτικού προσδιορισμού.
	Αποτυχία εκτέλεσης ποσοτικού προσδιορισμού	Αποτυχία πρότυπης καμπύλης.	Επαναλάβετε τον ποσοτικό προσδιορισμό. Εάν η επανάληψη αποτύχει, επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής υποστήριξης της Illumina.	
Αποτυχία δεξαμενοποίησης	Αποτυχία ολοκλήρωσης δεξαμενοποίησης δειγμάτων	Η ανάλυση δεξαμενοποίησης δεν μπορεί να υπολογίσει κατάλληλους όγκους δεξαμενής.	Αξιολογήστε εκ νέου τη στοχευόμενη συγκέντρωση δεξαμενής. Επανεκτελέστε ανάλυση δεξαμενοποίησης.	

Αντιμετώπιση προβλημάτων VeriSeq NIPT Microlab STAR

Βήμα διαδικασίας	Κωδικός σφάλματος	Πλαίσιο διαλόγου σφάλματος	Περιγραφή	Επίλυση από τον χρήστη
Δημιουργία παρτίδας	EM0044	The Batch ID entered contains forbidden characters. (Το αναγνωριστικό παρτίδας που εισήχθη περιέχει απαγορευμένους χαρακτήρες.)	Το VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2 δέχεται μόνο αριθμούς, γράμματα, κάτω παύλες και παύλες για όλα τα πεδία δεδομένων.	Μετονομάστε την παρτίδα χρησιμοποιώντας ένα όνομα που δεν περιέχει ειδικούς χαρακτήρες.
Δημιουργία παρτίδας	EM0051	The Batch ID is greater than 36 characters in length. (Το μήκος του αναγνωριστικού παρτίδας είναι μεγαλύτερο από 36 χαρακτήρες.)	Το VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2 περιορίζει το μήκος των ονομάτων παρτίδας σε 36 χαρακτήρες ή λιγότερο.	Μετονομάστε την παρτίδα χρησιμοποιώντας ένα όνομα που περιέχει λιγότερους από 36 χαρακτήρες.

Βήμα διαδικασίας	Κωδικός σφάλματος	Πλαίσιο διαλόγου σφάλματος	Περιγραφή	Επίλυση από τον χρήστη
Δημιουργία παρτίδας	EM0076	Unable to connect to VeriSeq Onsite Server v2 (Δεν είναι δυνατή η σύνδεση στον επιτόπιο διακομιστή VeriSeq έκδ. 2).	Ο επιτόπιος διακομιστής VeriSeq έκδ. 2 δεν ανταποκρίνεται σε αιτήματα δεδομένων από το πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασιών.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Βεβαιωθείτε ότι το ML STAR είναι συνδεδεμένο στο δίκτυο. 2. Βεβαιωθείτε ότι ο επιτόπιος διακομιστής VeriSeq έκδ. 2 είναι ενεργοποιημένος. 3. Ελέγξτε ότι το ML STAR μπορεί να συνδεθεί στον επιτόπιο διακομιστή VeriSeq έκδ. 2 (μέσω αιτήματος ring). 4. Ελέγξτε τη φιάλη αποβλήτων κενού. Αν η φιάλη αποβλήτων είναι γεμάτη κατά περισσότερο από το μισό, αδειάστε τη φιάλη αποβλήτων. 5. Εάν το πρόβλημα δεν επιλυθεί με τα προηγούμενα βήματα, επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής υποστήριξης της Illumina.
Δημιουργία παρτίδας	EM0118	This batch has been failed and cannot be further processed. (Αυτή η παρτίδα απέτυχε και δεν μπορεί να υποβληθεί σε περαιτέρω επεξεργασία.)	Η καθορισμένη παρτίδα έχει ήδη αποτύχει και δεν μπορεί να υποβληθεί σε περαιτέρω επεξεργασία.	Σύμφωνα με το αρχείο παρτίδων στον επιτόπιο διακομιστή VeriSeq έκδ. 2, η επιλεγμένη παρτίδα έχει αποτύχει. Δεν επιτρέπεται περαιτέρω επεξεργασία. Δημιουργήστε άλλη παρτίδα με τα απαιτούμενα δείγματα.

Βήμα διαδικασίας	Κωδικός σφάλματος	Πλαίσιο διαλόγου σφάλματος	Περιγραφή	Επίλυση από τον χρήστη
Δημιουργία παρτίδας	Δεν ισχύει	This batch has already completed processing. Would you like to repool? (Αυτή η παρτίδα έχει ήδη ολοκληρώσει την επεξεργασία. Θα θέλατε να εκτελεστεί εκ νέου δεξαμενοποίηση;)	Η υποδεικνυόμενη παρτίδα έχει υποβληθεί σε επεξεργασία μέσω δεξαμενοποίησης. Η μόνη επεξεργασία που μπορεί να επιτραπεί είναι η εκ νέου δεξαμενοποίηση.	Επαναλάβετε τη δεξαμενοποίηση ως εξής. <ul style="list-style-type: none"> • Επιλέξτε Re-Pool (Εκ νέου δεξαμενοποίηση). • Ματαιώστε τη μέθοδο και διασφαλίστε ότι το όνομα παρτίδας είναι σωστό πριν από την εκ νέου δεξαμενοποίηση.
Απομόνωση πλάσματος	WP0087	Duplicate sample barcodes loaded. (Φορτώθηκαν διπλότυποι γραμμωτοί κωδικοί δειγμάτων.)	Δείγματα με πανομοιότυπους γραμμωτούς κωδικούς φορτώθηκαν στο σύστημα.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ακολουθήστε τα μηνύματα προτροπής του προγράμματος διαχείρισης ροής εργασιών για να εντοπίσετε τα δείγματα που είναι διπλότυπα. 2. Αφαιρέστε τα διπλότυπα και επισημάνετε τα εκ νέου ή αντικαταστήστε τα. 3. Επαναφορτώστε τα δείγματα.

Βήμα διαδικασίας	Κωδικός σφάλματος	Πλαίσιο διαλόγου σφάλματος	Περιγραφή	Επίλυση από τον χρήστη
Απομόνωση πλάσματος	EP0102	Samples specified in the Sample Sheet were not loaded. (Τα δείγματα που καθορίζονται στο φύλλο δειγμάτων δεν φορτώθηκαν.)	Τα δείγματα που περιλαμβάνονται στο φύλλο δείγματος δεν συμπεριλήφθηκαν στους γραμμωτούς κωδικούς που φορτώθηκαν.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ακολουθήστε τα μηνύματα προτροπής του προγράμματος διαχείρισης ροής εργασιών για να εντοπίσετε τα δείγματα που λείπουν. 2. Εκτελέστε μία από τις ακόλουθες επιλογές: <ul style="list-style-type: none"> • Προσθέστε τα δείγματα που λείπουν στην παρτίδα και επαναφορτώστε τα δείγματα. • Μатаιώστε τη μέθοδο, τροποποιήστε το φύλλο δείγματος ανάλογα με τις ανάγκες. Επανεκκινήστε τη μέθοδο.
Φόρτωση πλάκας	Δεν ισχύει	Venus Barcode Mask Error (Σφάλμα μάσκας γραμμωτού κωδικού Venus).	Το πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασιών επιβάλλει σωστή συσχέτιση πλάκας με παρτίδα με τη χρήση μασκών γραμμωτού κωδικού Venus.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ελέγξτε την τοποθέτηση της πλάκας για να επιβεβαιώσετε ότι η διάταξη της πλάκας είναι σωστή. 2. Βεβαιωθείτε ότι η πλάκα που έχει φορτωθεί είναι η σωστή πλάκα για την υποδεικνυόμενη παρτίδα.

Βήμα διαδικασίας	Κωδικός σφάλματος	Πλαίσιο διαλόγου σφάλματος	Περιγραφή	Επίλυση από τον χρήστη
Εξαγωγή cfDNA	WE0150	Pressure in the vacuum chamber is too low. (Η πίεση στον θάλαμο κενού είναι πάρα πολύ χαμηλή.)	Το πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασιών δεν προχωράει εάν η υπολειπόμενη αίσθηση πίεσης γραμμής κενού είναι < 400 Torr.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ελέγξτε για συστροφές ή άλλα εμπόδια στη γραμμή κενού. 2. Ανοίξτε τα κλιπ απελευθέρωσης γραμμής αποβλήτων, αφήστε την πίεση να απελευθερωθεί και, στη συνέχεια, κλείστε πλήρως τα κλιπ γραμμής απελευθέρωσης. 3. Βεβαιωθείτε ότι ο ελεγκτής κενού και η αντλία είναι ενεργοποιημένα. 4. Εάν το πρόβλημα συνεχίζεται, επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής υποστήριξης της Illumina.
Εξαγωγή cfDNA	WE0153	Pressure in the vacuum chamber is too high. (Η πίεση στον θάλαμο κενού είναι πάρα πολύ υψηλή.)	Εάν η μετρηθείσα πίεση κενού είναι πάρα πολύ υψηλή πριν από την έναρξη του ελέγχου πίεσης, το σύστημα ενδέχεται να παρουσιάζει δυσλειτουργία.	Στο πίσω μέρος του ελεγκτή, βεβαιωθείτε ότι όλες οι συνδέσεις και οι γραμμές κενού είναι σταθερές.

Βήμα διαδικασίας	Κωδικός σφάλματος	Πλαίσιο διαλόγου σφάλματος	Περιγραφή	Επίλυση από τον χρήστη
Εξαγωγή cfDNA	WE0996	Vacuum failed to seal. (Αποτυχία στεγανοποίησης κενού.)	Η αποτυχία στεγανοποίησης πρέπει να επιλυθεί προτού συνεχίσετε.	<p>Επαληθεύστε ότι η αποτυχία στεγανοποίησης έχει επιλυθεί προτού επιλέξετε OK.</p> <ol style="list-style-type: none"> Βεβαιωθείτε ότι η πλάκα δέσμευσης δεν εξέχει από στην πολλαπλή κενού. Φορώντας γάντι, πιέστε με δύναμη προς τα κάτω την πλάκα δέσμευσης. Ακούστε για το βουητό του κενού και παρατηρήστε τη ροή του νερού μέσω της πλάκας δέσμευσης. Ανοίξτε την προβολή ίχνους στο πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασιών. Αφού η ένδειξη πραγματικής πίεσης φτάσει τουλάχιστον σε 50 μονάδες πίεσης λιγότερες από την ένδειξη του περιβάλλοντος, επιλέξτε OK για να συνεχίσετε με την εξαγωγή cfDNA. Αν η ένδειξη απαιτούμενης πίεσης δεν συμπληρωθεί κατά τη διάρκεια του κατανεμημένου χρόνου, επιλέξτε OK για να συνεχίσετε με το πρώτο φορτίο λύματος. Θέστε σε παύση τη μέθοδο αφού το λύμα διανεμηθεί στην πλάκα δέσμευσης. Επανεφαρμόστε και πιέστε με δύναμη προς τα κάτω την πλάκα δέσμευσης.

Βήμα διαδικασίας	Κωδικός σφάλματος	Πλαίσιο διαλόγου σφάλματος	Περιγραφή	Επίλυση από τον χρήστη
Εξαγωγή cfDNA	WM0219	If Vacuum is on, manually rest the pump. (Εάν το κενό είναι ενεργοποιημένο, απενεργοποιήστε χειροκίνητα την αντλία.)	Το κενό μπορεί να παραμείνει ενεργοποιημένο έπειτα από ματαιώση μεθόδου κατά τη διάρκεια εξαγωγής.	6. Αν το λύμα δεν κατορθώσει να ρεύσει μέσω της πλάκας, επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής υποστήριξης της Illumina.
Εξαγωγή cfDNA	EE0477	An error has occurred while moving a plate. (iSWAP error) [Προέκυψε σφάλμα κατά τη μετακίνηση μιας πλάκας. (σφάλμα iSWAP)]	Αν προκύψει ένα σφάλμα iSWAP (πτώση πλάκας, αποτυχία σύλληψης κ.λπ.), το σύστημα θα σας ζητήσει να ολοκληρώσετε τη μετακίνηση της πλάκας χειροκίνητα.	1. Στον ελεγκτή κενού, πατήστε το κουμπί Power (Ισχύς) για να απενεργοποιήσετε το κενό. 2. Περιμένετε 10 δευτερόλεπτα και, στη συνέχεια, πατήστε ξανά το κουμπί Power (Ισχύς) για να ενεργοποιήσετε το κενό. Βεβαιωθείτε ότι η πλάκα μπορεί να ανακτηθεί (δεν υπάρχει διαρροή υλικού). <ul style="list-style-type: none"> • Αν η πλάκα δεν μπορεί να ανακτηθεί, ματαιώστε την εκτέλεση. • Αν η πλάκα μπορεί να ανακτηθεί, ακολουθήστε τις εμφανιζόμενες οδηγίες για να ολοκληρώσετε τη μεταφορά της πλάκας χειροκίνητα.

Βήμα διαδικασίας	Κωδικός σφάλματος	Πλαίσιο διαλόγου σφάλματος	Περιγραφή	Επίλυση από τον χρήστη
Εξαγωγή cfDNA	EE0519	Scanned barcode does not match binding plate barcode on record. (Ο σαρωμένος γραμμωτός κωδικός δεν αντιστοιχεί στον γραμμωτό κωδικό της πλάκας δέσμευσης στο αρχείο καταγραφής.)	Η πλάκα δέσμευσης που φορτώθηκε δεν αντιστοιχεί στον γραμμωτό κωδικό της πλάκας που αφαιρέθηκε.	Βεβαιωθείτε ότι η πλάκα που έχει φορτωθεί αντιστοιχεί στον καταγεγραμμένο γραμμωτό κωδικό (δείτε το αρχείο καταγραφής ίχνους για τον αναμενόμενο γραμμωτό κωδικό).

Βήμα διαδικασίας	Κωδικός σφάλματος	Πλαίσιο διαλόγου σφάλματος	Περιγραφή	Επίλυση από τον χρήστη
API	EA0372	Unable to connect to the data server. (Δεν είναι δυνατή σύνδεση στον διακομιστή δεδομένων.)	Ο επιτόπιος διακομιστής VeriSeq έκδ. 2 δεν ανταποκρίνεται σε αιτήματα δεδομένων από το πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασιών.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Βεβαιωθείτε ότι το ML STAR είναι συνδεδεμένο στο δίκτυο. 2. Βεβαιωθείτε ότι ο επιτόπιος διακομιστής VeriSeq έκδ. 2 είναι ενεργοποιημένος. 3. Ελέγξτε ότι το ML STAR μπορεί να συνδεθεί στον επιτόπιο διακομιστή VeriSeq έκδ. 2 (μέσω αιτήματος ring).
	EA0774	Connection Error. The API server connection failed to validate. (Σφάλμα σύνδεσης. Δεν ήταν δυνατή η επικύρωση της σύνδεσης με τον διακομιστή API.)	Ο επιτόπιος διακομιστής VeriSeq έκδ. 2 έπαψε να ανταποκρίνεται σε αιτήματα δεδομένων από το πρόγραμμα διαχείρισης ροής εργασιών.	<p>Βεβαιωθείτε ότι:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Βεβαιωθείτε ότι το ML STAR είναι συνδεδεμένο στο δίκτυο. 2. Ελέγξτε ότι το ML STAR μπορεί να συνδεθεί στον επιτόπιο διακομιστή VeriSeq έκδ. 2 (μέσω αιτήματος ring). 3. Βεβαιωθείτε ότι ο επιτόπιος διακομιστής VeriSeq έκδ. 2 είναι ενεργοποιημένος.
	EA0780	403: Invalid Request The current transaction is not valid. (403: Άκυρο αίτημα. Η τρέχουσα συναλλαγή δεν είναι έγκυρη.)	Τα δεδομένα που εστάλησαν παραβιάζουν τη λογική της ροής εργασιών του συστήματος.	Διαβάστε τις λεπτομέρειες σφάλματος για περισσότερες πληροφορίες. Οι συνήθεις αιτίες περιλαμβάνουν εισαγωγές με πάρα πολύ μεγάλο μήκος ή εισαγωγές που παραβιάζουν την αποδεκτή λίστα χαρακτήρων.

Βιβλιογραφία

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. I Biochem.* 2013;46: 1561-1565. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2013.06.002.
13. Bianchi D W, et al. "Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing." *Obstet Gynecol* 119 (2012): 890-901.
14. Ehrich M, et al. "Genome-wide cfDNA screening: clinical laboratory experience with the first 10,000 cases." *Genet Med* 19 (2017): 1332-1337.

15. Fiorentino F, et al. "The clinical utility of genome-wide cfDNA screening." *Prenat Diagn* 37 (2017): 593-601.
16. Pertile, MD, et al. "Rare autosomal trisomies, revealed by maternal plasma DNA sequencing, suggest increased risk of feto-placental disease." *Sci Transl Med* 9 (2017): eaan1240.

Ιστορικό αναθεώρησης

Έγγραφο	Ημερομηνία	Περιγραφή αλλαγής
Αρ. εγγράφου 1000000078751 έκδ. 08	Αύγουστος 2022	Ενημέρωση του αριθμού είδους ροής εργασιών Αφαίρεση της οδηγίας για χρήση πιπέτας για ανάμειξη αν η πλάκα βιβλιοθήκης έχει καταψυχθεί.
Αρ. εγγράφου 1000000078751 έκδ. 07	Μάιος 2022	<p>Διαχωρισμός της ενότητας Περιορισμοί της διαδικασίας σε αναφορά VeriSeq NIPT Solution έκδ. 2 και συμπερίληψη των δύο πρώτων κουκκίδων. Το υπόλοιπο κείμενο εντάχθηκε σε νέα κεφαλίδα Περιορισμοί του προσδιορισμού.</p> <p>Αφαίρεση</p> <ul style="list-style-type: none"> • VeriSeq από όλες τις επισημάνσεις αντιδραστηρίων. • Εφαρμογή γραμμωτού κωδικού πλάκας στην πλάκα προσαρμογέα VeriSeq NIPT κατά την προετοιμασία βιβλιοθηκών. <p>Προσθήκη</p> <ul style="list-style-type: none"> • Λέξη «πιστοποιημένο» στο νερό που είναι ελεύθερο από DNase/RNase. • Μία από τις ακόλουθες συσκευές ανάγνωσης μικροπλακών ή αντίστοιχη και το SpectraMax M2, M3, M4, M5 και σημείωση. • Στην ενότητα VeriSeq NIPT Microlab STAR για επεξήγηση των ενδεδειγμένων ενεργειών κατά τη διάρκεια ενός συμβάντος χειρισμού σφάλματος. • Σημείωση για οπτική επιθεώρηση βοθρίων. • Οδηγίες για παρτίδες 24 και 48 δειγμάτων σε όλες τις ενότητες του πρωτοκόλλου. • Βήματα για τον χρόνο χρήσης της μοβ πλάκας προσαρμογέα ή αντίστοιχης. • Λεκτικό στην ενότητα Δημογραφικά στοιχεία και χαρακτηριστικά κύησης, ώστε να συμπεριληφθούν τα αποτελέσματα κύησης πρώτου τριμήνου. • Κουκκίδα στις προδιαγραφές πλάκας βοθρίων μεγάλου βάθους ώστε να συμπεριληφθεί η αναφορά αντίστασης στη ροπή. <p>Ενημέρωση</p>

Έγγραφο	Ημερομηνία	Περιγραφή αλλαγής
		<ul style="list-style-type: none">• Λεκτικό για μοναδικά ονόματα παρτίδας για διασάφηση και συμπερίληψη παραδείγματος.• Σύμβολα και μορφοποίηση για σημειώσεις, επισημάνσεις προσοχής και προειδοποιήσεις.• Αποτελέσματα των επιμέρους κουκκίδων της εξέτασης.• Θειοκυανικό γουανιδίνιο σε χλωριούχο γουανιδίνιο.• CVS σε BVS (βασικό σύστημα κενού)• Λεκτικό για τη χρήση της εξέτασης ανίχνευσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα και της βαθμολογίας LLR.• Προδιαγραφές: προδιαγραφές κυπέλλου αντιδραστηρίου, πλάκες βοθρίων μεγάλου βάθους, πλάκες 384 βοθρίων, πλάκες 96 βοθρίων
Αρ. εγγράφου 1000000078751 έκδ. 06	Αύγουστος 2021	Ενημέρωση της διεύθυνσης εξουσιοδοτημένου εκπροσώπου για την ΕΕ.

Έγγραφο	Ημερομηνία	Περιγραφή αλλαγής
Αρ. εγγράφου 1000000078751 έκδ. 05	Δεκέμβριος 2020	<p>Ενημέρωση των ενοτήτων «Αρχές της διαδικασίας», «Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις» και «Επισήμανση προϊόντος» με πρόσθετες διευκρινίσεις για την ικανοποίηση αιτημάτων ρυθμιστικής φύσεως.</p> <p>Ήσσονος σημασίας ενημερώσεις στο περιεχόμενο του πρωτοκόλλου για συμφωνία με το τρέχον ύφος και την τρέχουσα οργάνωση της Illumina.</p> <p>Διόρθωση της περιγραφής του χρωμοσώματος 21 από «δεύτερο μικρότερο ανθρώπινο αυτόσωμα» σε «μικρότερο ανθρώπινο αυτόσωμα» στην ενότητα «Ακρίβεια» της αναλυτικής απόδοσης.</p> <p>Προσθήκη δηλώσεων σύστασης προσοχής για την αντιμετώπιση της ακατάλληλης χρήσης των δοχείων και των κινδύνων αμαλγαμάτωσης των δειγμάτων στις ενότητες «Διαδικασία απομόνωσης πλάσματος» και «Ερμηνεία αποτελεσμάτων».</p> <p>Προσθήκη νέων αριθμών είδους για τον διακομιστή και το λογισμικό για την κυκλοφορία νέου μοντέλου διακομιστή και ενημερώσεις των αριθμών είδους για το λογισμικό.</p> <p>Προσθήκη συστάσεων προσοχής στο πρωτόκολλο και πληροφοριών για την αντιμετώπιση προβλημάτων και την αποτροπή υπερχειλίσεων των δειγμάτων.</p> <p>Ενημέρωση των δραστικών συστατικών στο πρότυπο ποσοτικού προσδιορισμού DNA στο κιβώτιο βοηθητικών εξαρτημάτων για ευθυγράμμιση με το φύλλο δεδομένων ασφάλειας.</p> <p>Ενημέρωση των συμβάσεων ονομασίας της μονάδας Local Run Manager VeriSeq NIPT για συνέπεια με άλλα έγγραφα τεκμηρίωσης.</p> <p>Προσθήκη ιστορικού αναθεωρήσεων.</p>
Αρ. εγγράφου 1000000078751 έκδ. 04	Οκτώβριος 2020	Διορθώσεις ήσσονος σημασίας.
Αρ. εγγράφου 1000000078751 έκδ. 03	Σεπτέμβριος 2020	Ενημέρωση του καταλόγου υλικών για την παρουσίαση των προδιαγραφών του εργαστηριακού εξοπλισμού μαζί με γνωστές συμβατές επιλογές.

Έγγραφο	Ημερομηνία	Περιγραφή αλλαγής
Αρ. εγγράφου 1000000078751 έκδ. 02	Φεβρουάριος 2020	Ενημέρωση της παρουσίασης των πληροφοριών κλινικής απόδοσης για την καλύτερη επεξήγηση των διαφορών μεταξύ του βασικού τύπου εξέτασης ανίχνευσης και του τύπου εξέτασης ανίχνευσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα. Προσθήκη νέων διαφορών στην ενότητα για την απόδοση μεταξύ της βασικής εξέτασης ανίχνευσης και της εξέτασης ανίχνευσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα. Αφαίρεση αντιφατικών πληροφοριών σχετικά με τη δυνατότητα χρήσης της συμπληρωματικής έκθεσης από την ενότητα «Αρχές της διαδικασίας». Ενημέρωση της σύμβασης ονομασίας του λογισμικού του προγράμματος διαχείρισης ροής εργασιών VeriSeq NIPT έκδ. 2 σε ολόκληρο το έγγραφο για συνοχή στο ύψος. Ενημέρωση της επισήμανσης για τις διευθύνσεις της Illumina στην Αυστραλία και τις Κάτω Χώρες ώστε να αντικατοπτρίζονται οι πρόσφατες αλλαγές.
Αρ. εγγράφου 1000000078751 έκδ. 01	Αύγουστος 2019	Αφαίρεση διπλότυπου βήματος στην εξαγωγή cfDNA που οφείλεται σε σφάλμα του λογισμικού τυπογραφίας.
Αρ. εγγράφου 1000000078751 έκδ. 00	Μάιος 2019	Αρχική δημοσίευση.

Διπλώματα ευρεσιτεχνίας και εμπορικά σήματα

Το παρόν έγγραφο και τα περιεχόμενά του αποτελούν ιδιοκτησία της Illumina, Inc. και των συνδεδεμένων εταιρειών της («Illumina») και προορίζονται αποκλειστικά για τη συμβατική χρήση του πελάτη της σε συνδυασμό με τη χρήση του προϊόντος/των προϊόντων που περιγράφεται/-ονται στο παρόν έγγραφο και για κανέναν άλλον σκοπό. Απαγορεύεται η χρήση ή η διανομή του παρόντος εγγράφου και των περιεχομένων του για οποιονδήποτε άλλον σκοπό ή/και άλλη κοινοποίηση, αποκάλυψη ή αναπαραγωγή τους με οποιονδήποτε τρόπο χωρίς την πρότερη έγγραφη συναίνεση της Illumina. Η Illumina δεν μεταβιβάζει διά του παρόντος εγγράφου καμία άδεια δυνάμει διπλώματος ευρεσιτεχνίας, εμπορικού σήματος, πνευματικού δικαιώματος ή δικαιωμάτων κοινού δικαίου της.

Οι οδηγίες στο παρόν έγγραφο πρέπει να τηρούνται αυστηρά και με ακρίβεια από ειδικευμένο και κατάλληλα εκπαιδευμένο προσωπικό, προκειμένου να διασφαλιστεί η ορθή και ασφαλή χρήση του προϊόντος/των προϊόντων που περιγράφεται/-ονται στο παρόν. Όλα τα περιεχόμενα του παρόντος εγγράφου πρέπει να αναγνωσθούν και να γίνουν πλήρως κατανοητά πριν από τη χρήση του εν λόγω προϊόντος/των εν λόγω προϊόντων.

ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΜΗ ΠΛΗΡΟΥΣ ΑΝΑΓΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΡΗΣΗΣ ΜΕ ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΟΛΩΝ ΤΩΝ ΟΔΗΓΙΩΝ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΠΑΡΟΝ, ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΠΡΟΚΛΗΘΕΙ ΖΗΜΙΑ ΣΤΟ ΠΡΟΪΟΝ/ΣΤΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ, ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟΣ ΑΤΟΜΩΝ, ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΤΩΝ ΧΡΗΣΤΩΝ Ή ΑΛΛΩΝ, ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΑΛΛΗ ΥΛΙΚΗ ΖΗΜΙΑ, ΚΑΙ ΘΑ ΚΑΤΑΣΤΕΙ ΑΚΥΡΗ Η ΕΓΓΥΗΣΗ ΠΟΥ ΙΣΧΥΕΙ ΓΙΑ ΤΟ ΠΡΟΪΟΝ/ΤΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ.

Η ILLUMINA ΔΕΝ ΑΝΑΛΑΜΒΑΝΕΙ ΚΑΜΙΑ ΕΥΘΥΝΗ ΠΟΥ ΑΠΟΡΡΕΕΙ ΑΠΟ ΕΣΦΑΛΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ/ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΠΟΥ ΠΕΡΙΓΡΑΦΕΤΑΙ/-ΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΠΑΡΟΝ [ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΤΩΝ ΕΞΑΡΤΗΜΑΤΩΝ ΤΟΥ/ΤΟΥΣ Ή ΤΟΥ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟΥ].

© 2022 Illumina, Inc. Με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

Όλα τα εμπορικά σήματα είναι ιδιοκτησία της Illumina, Inc. ή των αντίστοιχων κατόχων τους. Για συγκεκριμένες πληροφορίες σχετικά με τα εμπορικά σήματα, επισκεφτείτε την ηλεκτρονική διεύθυνση www.illumina.com/company/legal.html.

Στοιχεία επικοινωνίας



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, California 92122 ΗΠΑ

+1.800.809.ILMN (4566)

+1.858.202.4566 (εκτός Βορείου Αμερικής)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com

CE
2797



Illumina Netherlands B.V.

Steenoven 19

5626 DK Eindhoven

Κάτω Χώρες

Χορηγός στην Αυστραλία

Illumina Australia Pty Ltd

Nursing Association Building

Level 3, 535 Elizabeth Street

Melbourne, VIC 3000

Αυστραλία

Επισήμανση προϊόντος

Για μια πλήρη αναφορά των συμβόλων που εμφανίζονται στη συσκευασία και την επισήμανση του προϊόντος, ανατρέξτε στο υπόμνημα συμβόλων στη διεύθυνση support.illumina.com στην καρτέλα *Documentation* (Τεκμηρίωση) του κιτ σας.

Μια περίληψη ασφάλειας και επιδόσεων (SSP) παρέχεται στη διεύθυνση <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>, μετά την εκκίνηση της ευρωπαϊκής βάσης δεδομένων για ιατροτεχνολογικά προϊόντα (Eudamed). Συνδέεται με το βασικό UDI-DI (0081627002NIPTRP).