

# Prospect pentru Soluția VeriSeq NIPT v2

A SE UTILIZA LA DIAGNOSTICAREA IN VITRO

## Utilizarea preconizată

Soluția VeriSeq NIPT v2 este un test de diagnosticare *in vitro* destinat utilizării drept test de screening pentru detectarea anomaliilor genetice fetale la nivel de genom din probe de sânge integral periferic matern, la femei însărcinate cu vârstă gestațională de cel puțin 10 săptămâni. Soluția VeriSeq NIPT v2 utilizează secvențierea genomului completă pentru a detecta duplicările și delețiile parțiale pentru toți autozomii și starea aneuploidiei pentru toți cromozomii. Testul oferă o opțiune de a solicita raportarea aneuploidiei cromozomului sexual (SCA). Acest produs nu trebuie utilizat ca bază unică de diagnosticare sau pentru alte decizii de gestionare a sarcinii.

Soluția VeriSeq NIPT v2 include: Manager flux de lucru pentru VeriSeq NIPT v2 pentru VeriSeq NIPT Microlab STAR, Seturi de pregătire a probelor VeriSeq NIPT și serverul local VeriSeq v2 cu software de testare VeriSeq NIPT v2. Soluția VeriSeq NIPT v2 este destinată utilizării împreună cu un sistem de secvențiere de nouă generație.

## Rezumatul și explicarea testului

Anomaliile cromozomiale fetale, în special aneuploidia, care reprezintă un număr anormal de cromozomi, sunt o cauză frecventă a problemelor reproductive, a anomaliilor congenitale, a întârzierii de dezvoltare și a dizabilităților intelectuale. Aneuploidia afectează aproximativ 1 din 300 de nașteri de feți vii, cu frecvență mult mai mare asociată avorturilor spontane și nașterilor de feți morți.<sup>1,2</sup> Până de curând, au existat două tipuri de teste prenatale pentru aceste afecțiuni: testarea de diagnosticare sau screeningul. Testarea de diagnosticare implică proceduri invazive de tipul amniocentezei sau prelevarea de vilus corionic. Aceste metode de testare sunt considerate standardul de aur pentru detectarea aneuploidiei fetale. Cu toate acestea, sunt asociate unui risc de pierdere a sarcinii între 0,11% și 0,22%.<sup>3</sup> Screeningurile convenționale cu marcator multiplu nu implică risc de pierdere a sarcinii, deoarece sunt neinvazive, dar sunt mai puțin precise decât testele de diagnosticare. Ratele de detectare pentru trisomia 21 variază între 69 și 96%, în funcție de screeningul specific, de vârsta mamei și de vârsta gestațională la testare.<sup>4</sup> Un aspect important este că au rate fals pozitive de aproximativ 5%, ceea ce poate duce la testarea de diagnosticare invazivă pentru confirmare și, astfel, la riscul de pierdere a sarcinii din cauza procedurii.<sup>4</sup> Screeningurile cu ultrasunete pot detecta, la rândul lor, anomaliile cromozomiale, dar pot face acest lucru cu o certitudine și mai redusă decât aceste metode.

Aneuploidia fetală pentru cromozomii 21, 18 și 13, X și Y poate fi detectată cu un grad ridicat de precizie prin testarea prenatală neinvazivă (NIPT), folosind secvențierea la întregul genom a ADN-ului acelușar (ADN liber circulant) obținut din plasmă maternă la o vârstă gestațională de 10 săptămâni sau mai mare. O meta-analiză recentă a mai multor studii clinice a raportat ratele ponderate de detectare a cumulării și specificității pentru trisomia 21 și trisomia 18 la sarcinile cu făt unic după cum urmează: trisomia 21 99,7% și 99,96% și trisomia 18 97,9% și respectiv 99,96%.<sup>5</sup> Un studiu sugerează că utilizarea NIPT ca screening principal pentru toate sarcinile ar putea duce la o reducere cu 89% a numărului de proceduri invazive de confirmare.<sup>6</sup>

Dată fiind reducerea semnificativă a ratelor fals pozitive cu NIPT comparativ cu screeningul convențional cu markeri multipli, numeroase organizații medicale de specialiști au declarat că sprijină indicațiile de utilizare a NIPT.

În mod specific, International Society for Prenatal Diagnosis, American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) /Society for Maternal Fetal Medicine (SMFM), American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) și European Society of Human Genetics/American Society of Human Genetics sprijină asigurarea NIPT pentru toate femeile însărcinate.<sup>7,8,9</sup> Se recomandă consilierea anterioară testării, consimțământul informat și testarea de diagnosticare pentru confirmarea unui rezultat de screening de ADN liber circulant pozitiv.<sup>4</sup>

Soluția VeriSeq NIPT v2 este un test de diagnosticare neinvazivă *in vitro* (IVD) care utilizează secvențierea la nivelul întregului genom al fragmentelor de ADN liber circulant derivate din probele de sânge integral periferic matern de la femei însărcinate cu vârstă gestațională de cel puțin 10 săptămâni. Testul oferă două opțiuni pentru tipurile de

screening: de bază și la nivel de genom. Screeningul de bază furnizează informații privind starea aneuploidiei doar pentru cromozomii 21, 18, 13, X și Y. Screeningurile la nivel de genom furnizează duplicările și delețiile parțiale pentru toți autozomii și starea aneuploidiei pentru toți cromozomii. Ambele tipuri de screening oferă opțiunea de raportare a aneuploidiei cromozomului sexul (SCA), cu sau fără raportarea sexului fătului. Opțiunea de raportare pentru SCA poate fi dezactivată. Dacă opțiunea de raportare pentru SCA este dezactivată, nu se raportează nici sexul fătului. Pentru mai multe informații privind opțiunile de raportare a sexului, consultați *Ghid software pentru Soluția VeriSeq NIPT v2 (nr. document 100000067940)*.

## Principiile procedurii

Soluția VeriSeq NIPT v2 este o soluție automată pentru testarea NIPT de laborator, care constă din pregătirea automată a probei și analiza datelor de secvențiere. Seturile de pregătire a probelor VeriSeq NIPT sunt reactivi specializați de unică folosință, utilizați în asociere cu VeriSeq NIPT Microlab STAR pentru a pregăti loturi de 24, 48 sau 96 de probe pentru secvențierea de nouă generație. Toate datele de secvențiere la ambele capete pentru genom sunt analizate de un software specializat, software-ul de testare VeriSeq NIPT v2 și se generează un raport care furnizează rezultate calitative.

Fluxul de lucru constă din următoarele proceduri: colectarea probei, izolarea plasmei extragerea ADN-ului liber circulant, pregătirea bibliotecii, cuantificarea bibliotecii, cumularea bibliotecii, secvențierea și analiza, prezentate mai detaliat:

- ▶ **Colectarea probei** – 7-10 ml de sânge integral periferic matern sunt colectate într-o eprubetă Streck pentru recoltarea de sânge (BCT) pentru ADN acelular, care previne liza celulei și contaminarea genomică și stabilizează sângele integral.
- ▶ **Izolarea plasmei** – în decurs de 5 zile de la colectare, plasma este izolată de sângele integral periferic matern, folosind tehnici de centrifugare standard. VeriSeq NIPT Microlab STAR aspiră și dispensează plasma într-o placă cu godeuri adânci, 96 de godeuri, pentru procesarea ulterioară. În cazul în care este necesară o nouă testare, probele pentru post-procesare se pot astupa din nou cu capacul și depozita la 4°C pentru încă alte 5 zile (până la un număr total de 10 zile de la recoltarea de sânge).



### ATENȚIE

Depășirea perioadei de depozitare menționată anterior poate afecta ratele de eșec ale probelor individuale.

- ▶ **Extragerea ADN-ului liber circulant** – purificarea ADN-ului liber circulant din plasmă se realizează prin absorbția pe o placă de fixare, prin spălarea plăcii de fixare pentru a îndepărta agenții contaminanți și prin eluție.
- ▶ **Pregătirea bibliotecii** – fragmentele de ADN liber circulant purificat sunt supuse unui proces de reparație final pentru a transforma proeminențele 5' și 3' în capete boante. Apoi se adaugă o nucleotidă de deoxiadenozină la capetele 3' pentru a crea o proeminență cu o singură bază. Adaptoarele indexate care conțin o singură proeminență pe bază de 3' deoxitimidină sunt apoi legate la fragmente de ADN liber circulant procesate. ADN-ul legat este purificat folosind bilele de imobilizare inversă în fază solidă. Fiecare probă dintr-un set de 24, 48 sau 96 primește un adaptor indexat unic. Adaptoarele servesc următoarelor 2 scopuri:
  - ▶ Indexările permit identificarea probei în secvențierea ulterioară.
  - ▶ Adaptoarele de index conțin secvențe care permit captarea bibliotecii pe o suprafață solidă a unei Flow Cell de secvențiere pentru generarea grupului de celule și secvențierea ulterioară.
- ▶ **Cuantificare** – produsul Bibliotecă este cuantificat folosind o vopsea fluorescentă cu o concentrație determinată de compararea cu o curbă ADN standard.
- ▶ **Cumularea și secvențierea bibliotecii** – bibliotecile de probe sunt cumulate laolaltă în grupe de 24 sau 48 de probe în cantități ajustate, pentru a reduce la minimum diferența de acoperire. Fiecare grup este apoi secvențiat folosind un secvențiator de nouă generație.
- ▶ Soluția VeriSeq NIPT v2 nu include echipamentul de secvențiere și consumabile.
- ▶ **Analiză** – pentru fiecare probă, analiza constă din următoarele:
  - ▶ Identificarea fragmentelor bibliotecii prin secvențierea și alinierea indexului pentru citirile cu secvențiere la ambele capete la un genom de referință uman.

- ▶ Estimarea fracției fetale a bibliotecii prin combinarea informațiilor de la distribuția ambelor coordonate de lungime și genomice ale fragmentelor bibliotecii.
- ▶ După contorizarea pentru decalajele cunoscute, un model statistic detectează regiunile genomului care sunt sub sau suprareprezentate în bibliotecă, într-o manieră similară unei anomalii la nivelul estimat al fracției fetale.
- ▶ Raportul NIPT prezintă rezultatele pe scurt pentru meniul de testare selectat, unde se afișează ANOMALY DETECTED (Anomalie detectată) sau NO ANOMALY DETECTED (Nicio anomalie detectată) împreună cu o estimare a fracției fetale pentru probele care trec de CC.
- ▶ Raportul suplimentar prezintă metricile cantitative care caracterizează fiecare anomalie detectată.

## Limitările procedurii

- ▶ Soluția VeriSeq NIPT v2 este un test de screening și nu trebuie avut în vedere izolat față de alte rezultate clinice și rezultate ale testelor. Concluziile privind starea fătului și deciziile privind gestionarea sarcinii nu trebuie să se bazeze doar pentru rezultatele screeningului NIPT.<sup>7</sup>
- ▶ Soluția VeriSeq NIPT v2 oferă raporturi privind următoarele:
  - ▶ Screeningul de bază testează suprareprezentarea cromozomilor 13, 18 și 21
  - ▶ Screeningul la nivel de genom testează sub și suprareprezentarea tuturor autozomilor, inclusiv delețiile și duplicările parțiale de cel puțin 7 Mb.
  - ▶ La sarcinile cu făt unic cu Yes (Da) sau SCA selectate drept opțiune de raportare a sexului, următoarele anomalii ale cromozomului sexual: XO, XXX, XXY și XYY.
  - ▶ La sarcinile cu făt unic cu Yes (Da) selectat drept opțiune de raportare a sexului, se raportează sexul fetal.
  - ▶ Prezența cromozomului Y la sarcinile gemelare.
- ▶ Dovezile testului care confirmă sensibilitatea și specificitatea acoperă sarcinile cu făt unic și gemelare. Aceste instrucțiuni de utilizare nu furnizează date privind sensibilitatea și specificitatea pentru tripleți sau sarcini de ordin superior.
- ▶ Soluția VeriSeq NIPT v2 nu este destinată detectării poliploidiei, ca, de exemplu, triploidia.
- ▶ Soluția VeriSeq NIPT v2 nu este destinată detectării rearanjărilor cromozomiale echilibrate.
- ▶ Pentru test sunt necesare probe de sânge integral periferic matern de la femei însărcinate, cu vârstă gestațională de cel puțin 10 săptămâni.
- ▶ Pentru screeningurile de bază, testul Soluția VeriSeq NIPT v2 caută anomaliile cromozomiale specifice. Rezultatele raportate drept NO ANOMALY DETECTED (Nicio anomalie detectată) nu elimină posibilitatea unor anomalii cromozomiale privind cromozomii testați. Un rezultat negativ nu elimină posibilitatea ca sarcina să prezinte alte anomalii cromozomiale, afecțiuni generice sau defecte din naștere (de ex., defect de tub neural deschis).
- ▶ Pentru screeningurile la nivel de genom, delețiile și duplicările mari care sunt mai mici de 75% din dimensiunea cromozomului pot fi elocvente pentru aneuploidie cromozomului complet.
- ▶ Pentru screeningurile la nivel de genom, anumite zone sunt excluse din analiză. O listă cu astfel de regiuni excluse este disponibilă pe site-ul web de asistență Illumina. Detectarea anomaliei genomice se efectuează doar pe regiunile care nu sunt excluse.
- ▶ Raportarea sexului fătului nu este disponibilă în toate regiunile, datorită reglementărilor locale referitoare la sex.
- ▶ Rezultatele testului pot fi afectate de anumiți factori materni și fetal, inclusiv, dar fără a se limita la următoarele:
  - ▶ Transfuzie de sânge recentă la mamă
  - ▶ Transplant de organe la mamă
  - ▶ Procedură chirurgicală la mamă
  - ▶ Imunoterapie sau terapie cu celule stem la mamă
  - ▶ Afecțiuni maligne la mamă
  - ▶ Mozaicism matern
  - ▶ Mozaicism fetoplacentar
  - ▶ Decesul fătului
  - ▶ Geamăn neviabil

## Componentele produsului

Soluția VeriSeq NIPT v2 (nr. de componentă 20030577) constă din următoarele seturi de pregătire a probelor:

- ▶ Set de pregătire probă VeriSeq NIPT (24 de probe) (nr. de componentă 20025895)
- ▶ Set de pregătire probă VeriSeq NIPT (48 de probe) (nr. de componentă 15066801)
- ▶ Set de pregătire probă VeriSeq NIPT (96 de probe) (nr. de componentă 15066802)

Soluția VeriSeq NIPT v2 (nr. de componentă 20030577) constă din următoarele componente software:

- ▶ Software-ul de testare VeriSeq NIPT v2 (nr. de componentă 20047024), preinstalat pe serverul local VeriSeq v2
  - ▶ Serverul local VeriSeq v2 (nr. de componentă 20028403 sau 20047000) sau un server local VeriSeq (nr. de componentă 15076164 sau 20016240) existent, căruia i s-a făcut upgrade la v2
- ▶ Managerul fluxului de lucru VeriSeq NIPT v2 (nr. de componentă 20044988), preinstalat pe VeriSeq NIPT Microlab STAR
  - ▶ VeriSeq NIPT Microlab STAR (nr. de componentă Hamilton Company Reno: 95475-01 (115V) și 95475-02 (230V), Hamilton Company Bonaduz: 806288)
- ▶ Modulul Local Run Manager al VeriSeq NIPT (nr. de componentă 20044989)

## Reactivi

### Reactivi furnizați

Ilumina furnizează următorii reactivi: Set de pregătire probă VeriSeq NIPT (24 de probe) (nr. de componentă 20025895), Set de pregătire probă VeriSeq NIPT (48 de probe) (nr. de componentă 15066801) și Set de pregătire probă VeriSeq NIPT (96 de probe) (nr. de componentă 15066802). Seturile de pregătire a probelor VeriSeq NIPT sunt configurate pentru a fi utilizate cu ML STAR (nr. de componentă 95475-01, 95475-02 sau 806288), care este furnizat de Hamilton Company.

### Pregătirea probelor pentru VeriSeq NIPT, Cutie de extragere

Tabelul 1 Cutie de extragere VeriSeq NIPT (24) și (48), nr. de componentă 20025869 și 15066803

| Numele reactivului de pe etichetă | Numărul de recipiente din set | Ingrediente active   | Depozitare         |
|-----------------------------------|-------------------------------|--|--------------------|
| Soluție tampon de liză            | 1                             | Guanidină clorhidrat în soluție apoasă tamponată               | între 15°C și 30°C |
| Soluție tampon de spălare I       | 1                             | Guanidină clorhidrat și 2-propanol în soluție apoasă tamponată | între 15°C și 30°C |
| Soluție tampon de spălare II      | 1                             | Soluție apoasă tamponată care conține săruri                   | între 15°C și 30°C |
| Soluție tampon de eluție          | 1                             | Soluție apoasă tamponată                                       | între 15°C și 30°C |
| Soluție tampon de proteinază      | 1                             | Glicerol în soluție apoasă tamponată                           | între 15°C și 30°C |
| Proteinază K                      | 3                             | Proteinază K liofilizată                                       | între 15°C și 30°C |

Tabelul 2 Cutie extragere VeriSeq NIPT (96), nr. de componentă 15066807

| Numele reactivului de pe etichetă | Numărul de recipiente din set | Ingrediente active   | Depozitare         |
|-----------------------------------|-------------------------------|--|--------------------|
| Soluție tampon de liză            | 1                             | Guanidină clorhidrat în soluție apoasă tamponată               | între 15°C și 30°C |
| Soluție tampon de spălare I       | 1                             | Guanidină clorhidrat și 2-propanol în soluție apoasă tamponată | între 15°C și 30°C |

| Numele reactivului de pe etichetă | Numărul de recipiente din set | Ingrediente active                           | Depozitare         |
|-----------------------------------|-------------------------------|--|--------------------|
| Soluție tampon de spălare II      | 2                             | Soluție apoasă tamponată care conține săruri | între 15°C și 30°C |
| Soluție tampon de eluție          | 1                             | Soluție apoasă tamponată                     | între 15°C și 30°C |
| Soluție tampon de protează        | 1                             | Glicerol în soluție apoasă tamponată         | între 15°C și 30°C |
| Protează K                        | 4                             | Protează K liofilizată                       | între 15°C și 30°C |

## Pregătirea probelor pentru VeriSeq NIPT, Cutie de pregătire a bibliotecii

Tabelul 3 Cutie de pregătire a bibliotecii VeriSeq NIPT (24) și (48), nr. de componentă 20026030 și 15066809

| Numele reactivului de pe etichetă | Numărul de recipiente din set | Ingrediente active                                     | Depozitare           |
|-----------------------------------|-------------------------------|--|----------------------|
| Amestec de reparare capăt         | 1                             | Polimerază ADN și dNTP-uri în soluție apoasă tamponată | între -25°C și -15°C |
| Amestec de poliadenilare          | 1                             | Polimerază ADN și dATP în soluție apoasă tamponată     | între -25°C și -15°C |
| Amestec de legare                 | 1                             | Ligază ADN în soluție apoasă tamponată                 | între -25°C și -15°C |
| Soluție tampon de hibridizare     | 1                             | Soluție apoasă tamponată                               | între -25°C și -15°C |
| Placă adaptor ADN VeriSeq NIPT    | 1                             | Oligonucleotide în soluție apoasă tamponată            | între -25°C și -15°C |

Tabelul 4 Cutie de pregătire a bibliotecii VeriSeq NIPT (96), nr. de componentă 15066810

| Numele reactivului de pe etichetă | Numărul de recipiente din set | Ingrediente active                                     | Depozitare           |
|-----------------------------------|-------------------------------|--|----------------------|
| Amestec de reparare capăt         | 1                             | Polimerază ADN și dNTP-uri în soluție apoasă tamponată | între -25°C și -15°C |
| Amestec de poliadenilare          | 2                             | Polimerază ADN și dATP în soluție apoasă tamponată     | între -25°C și -15°C |
| Amestec de legare                 | 2                             | Ligază ADN în soluție apoasă tamponată                 | între -25°C și -15°C |
| Soluție tampon de hibridizare     | 1                             | Soluție apoasă tamponată                               | între -25°C și -15°C |
| Placă adaptor ADN VeriSeq NIPT    | 1                             | Oligonucleotide în soluție apoasă tamponată            | între -25°C și -15°C |

## Pregătirea probelor pentru VeriSeq NIPT, Cutie accesorii

Tabelul 5 Cutie accesorii VeriSeq NIPT, nr. de componentă 15066811

| Numele reactivului de pe etichetă | Numărul de recipiente din set | Ingrediente active  | Depozitare       |
|-----------------------------------|-------------------------------|---|------------------|
| Placă de fixare a ADN-ului        | 1                             | Microplacă de propilenă cu membrană de silicon modificată | între 2°C și 8°C |
| Soluție tampon de resuspensie     | 1                             | Soluție apoasă tamponată                                  | între 2°C și 8°C |

| Numele reactivului de pe etichetă | Numărul de recipiente din set | Ingrediente active  | Depozitare       |
|-----------------------------------|-------------------------------|---|------------------|
| Bile de purificare probă          | 1                             | Bile paramagnetice în fază solidă în soluție apoasă tamponată | între 2°C și 8°C |
| Reactiv de cuantificare ADN       | 1                             | Vopsea de intercalare ADN în DMSO                             | între 2°C și 8°C |
| Standard de cuantificare ADN      | 1                             | Standard ADNds în soluție apoasă tamponată                    | între 2°C și 8°C |

## Pregătirea probelor pentru VeriSeq NIPT, Eprubete și etichete pentru fluxul de lucru

Tabelul 6 Eprubete și etichete pentru fluxul de lucru, nr. de componentă 15071543

| Numele articolului de pe etichetă                    | Numărul de articole din set | Depozitare         |
|--|-----------------------------|--------------------|
| Etichetă (LBL) - cod de bare placă                   | 9                           | între 15°C și 30°C |
| Etichetă (LBL) - cod de bare placă cu godeuri adânci | 12                          | între 15°C și 30°C |
| Eprubetă (TB) - eprubetă de cumulare goală           | 5                           | între 15°C și 30°C |

## Reactivi nefurnizați

### Reactivi obligatorii, nefurnizați

- ▶ Reactivii de secvențiere și consumabilele necesare pentru sistemul de secvențiere de nouă generație (NGS)
- ▶ Apă fără DNază/RNază
- ▶ Etanol, 100% (tărie normală 200), adecvat pentru biologie moleculară



#### NOTĂ

Etanolul inadecvat pentru biologie moleculară poate afecta negativ performanța testării.

### Reactivi opționali, nefurnizați

- ▶ Soluția salină tamponată cu fosfat Dulbecco (DPBS) pentru controlul fără șablon (NTC)

## Depozitare și manipulare

- 1 Temperatura camerei este definită ca fiind intervalul dintre 15°C și 30°C.
- 2 Toți reactivii sunt de unică folosință. După ce reactivii sunt pregătiți de utilizare, trebuie folosiți imediat.
- 3 Dacă orice ambalaj sau conținut al componentelor pentru Soluția VeriSeq NIPT este deteriorat sau compromis, luați legătura cu departamentul Asistență clienți Illumina.
- 4 Reactivii sunt stabili când sunt depozitați conform indicațiilor până la data de valabilitate specificată pe etichetele seturilor. Pentru a vedea condițiile de depozitare, consultați coloana Depozitare din tabelele pentru *Reactivi furnizați la pagina 4*. A nu se utiliza reactivi expirați.
- 5 Modificările aspectului fizic al reactivilor furnizați pot indica deteriorarea materialelor. Dacă apar modificări ale aspectului fizic (ca, de exemplu modificări evidente ale culorii reactivilor sau tulburare vizibilă la contaminarea microbiană), nu folosiți reactivii.
- 6 Respectați următoarele cele mai bune practici atunci când manevrați bilele de purificare probă:
  - ▶ Nu congelați niciodată bilele.
  - ▶ Lăsați bilele să ajungă la temperatura camerei înainte de utilizare.
  - ▶ Chiar înainte de utilizare, agitați bilele până când sunt corect suspendate și culoarea pare omogenă.
- 7 Soluția tampon de liză, soluția tampon de spălare I, soluția tampon de spălare II, soluția tampon de eluție și soluția tampon de proteinază pot forma precipitate sau cristale vizibile. Înainte de utilizare, agitați puternic și apoi inspectați vizual pentru a vă asigura că nu prezintă precipitat.

- 8 Nu congelați niciodată sângele integral după recoltare.
- 9 Secvențiați bibliotecile cât mai curând posibil după cumulare. Bibliotecile cumulate sunt stabile timp de până la 7 zile la temperaturi între -25°C și 15°C. Nu este necesară nicio denaturare suplimentară dacă sunt depozitate această perioadă în condițiile respective.

## Echiptamente și materiale

### Echiptamentele și materialele obligatorii, nefurnizate

#### Echiptamente necesare, nefurnizate

| Echiptament  | Furnizor   |
|--|--|
| Pipete monocanal de 20 µl  | Furnizor general pentru laboratoare  |
| Pipete monocanal de 200 µl   | Furnizor general pentru laboratoare  |
| Pipete monocanal de 1000 µl  | Furnizor general pentru laboratoare  |
| Dispozitiv pentru pipetă   | Furnizor general pentru laboratoare  |
| Frigider, între 2°C și 8°C   | Furnizor general pentru laboratoare  |
| Congelator, între -25°C și -15°C   | Furnizor general pentru laboratoare  |
| Microcentrifugă  | Furnizor general pentru laboratoare  |
| Agitator   | Furnizor general pentru laboratoare  |
| Ansamblu centrifugă și rotor pentru eprubete de recoltare a sângelui   |  |
| Recomandate: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Centrifugă Allegra seria X12R, 1600 g</li> <li>• Rotor de centrifugă Allegra GH-3.8 cu cupe</li> <li>• Capace de cupe pentru centrifuga Allegra, set de două</li> <li>• Ansamblu adaptoare pentru centrifuga Allegra, 16 mm, set de patru</li> </ul>   |  |
|  | Beckman Coulter, nr. articol 392304 (120 V sau 230 V)<br>Beckman Coulter, nr. articol 369704<br>Beckman Coulter, nr. articol 392805<br>Beckman Coulter, nr. articol 359150   |
| Echivalente:   |  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Centrifugă cu răcire, capabilă de 1600 × g cu opțiune fără frânare</li> <li>• Rotor cu cupe articulate, cu cupe</li> <li>• Inserții cupe, cu capacitate de 24, 48 sau 96 de eprubete, adâncime minimă 76 mm</li> <li>• Adaptoare pentru inserții destinate să susțină eprubete de recoltare a sângelui de 16 x 100 mm</li> </ul>            | Furnizor general pentru laboratoare  |
| Ansamblu centrifugă și rotor pentru microplăci   |  |
| Recomandate: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Centrifugă Sorvall Legend XTR</li> <li>• Rotor pentru microplăci HIGHPlate 6000</li> <li>• Două dintre următoarele baze de susținere pentru microplăci:               <ul style="list-style-type: none"> <li>• Bază de susținere MicroAmp cu 96 de godeuri</li> <li>• Suport placă PCR cu 96 de godeuri</li> </ul> </li> </ul> |  |
|  | Thermo Fisher Scientific, nr. catalog 75004521 (120 V) sau nr. catalog 75004520 (230 V)<br>Thermo Fisher Scientific, nr. catalog 75003606<br>Thermo Fisher Scientific, nr. catalog 4379590<br>Thermo Fisher Scientific, nr. catalog AB-0563/1000 |
| Echivalente:   |  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Centrifugă capabilă de 5600 × g</li> <li>• Rotor cu plăci articulate, cu suporturi de placă cu 96 de godeuri, adâncime minimă 76,5 mm</li> <li>• Bază de susținere pentru microplăci</li> </ul>   | Furnizor general pentru laboratoare  |

| Echipament   | Furnizor  |
|--|---|
| Unul dintre următoarele cititoare de microplăci (fluorometru) cu SoftMax Pro v6.2.2 sau o versiune ulterioară: <ul style="list-style-type: none"> <li>Gemini XPS</li> <li>SpectraMax M2</li> </ul>   | Dispozitive moleculare, nr. de componentă XPS<br>Dispozitive moleculare, nr. de componentă M2   |
| USB de mare viteză SpectraMax, cablu adaptor   | Dispozitive moleculare, nr. de componentă 9000-0938   |
| Ciclor termic cu următoarele specificații: <ul style="list-style-type: none"> <li>Capac încălzit</li> <li>interval de temperatură de la 4°C la 98°C</li> <li>precizia temperaturii ±2°C</li> <li>viteza de creștere minimă de 2°C pe secundă</li> <li>Compatibil cu placa cu 96 de godeuri Twin.tec PCR, cu manta completă</li> </ul>  | Furnizor general pentru laboratoare   |
| VeriSeq NIPT MicroLab STAR   | Hamilton, nr. de componentă 95475-01 (115 V), nr. de componentă 95475-02 (230 V) sau nr. de componentă 806288 (pentru Hamilton Company Bonaduz) |
| Un sistem de secvențiere din noua generație (NGS) cu următoarele funcții: <ul style="list-style-type: none"> <li>Secvențiere la ambele capete de 2 x 36 bp</li> <li>Compatibil cu adaptoarele cu index dublu pentru pregătirea probelor pentru VeriSeq NIPT</li> <li>Realizare automată de fișiere .BCL</li> <li>Chimie pe două canale</li> <li>400 de milioane de citiri cu secvențiere la ambele capete per rulare</li> <li>Compatibil cu software-ul de testare VeriSeq NIPT v2 sau cu un sistem de secvențiere NextSeq 550Dx.</li> </ul> | Furnizorul instrumentului sau Illumina, nr. de componentă 20005715  |
| Dacă se utilizează un sistem de secvențiere NextSeq 550Dx: <ul style="list-style-type: none"> <li>Set de reactivi cu debit mare NextSeq 550Dx v2.5, 75 de cicluri</li> </ul>   | Illumina, nr. de componentă 20028870  |
| Serverul local VeriSeq v2 sau un server local VeriSeq căruia i s-a făcut upgrade   | Illumina, nr. de componentă 20028403 sau 20047000 (v2) sau 15076164 sau 20016240 (cu upgrade efectuat)  |

## Echipeamente opționale, nefurnizate

| Echipament  | Furnizor  |
|---|---|
| Sistem de scoatere a capacelor Pluggo                                   | LGP Consulting, nr. de componentă 4600 4450                                 |
| Placă de validare cu fluorescență SpectraMax SpectraTest FL1            | Dispozitive moleculare, nr. de componentă 0200-5060                         |
| Rotator/răsucitor pentru eprubete, eprubete de 15 ml, 40 rpm, 100-240 V | Thermo Scientific, nr. catalog 88881001 (SUA) sau nr. catalog 88881002 (UE) |

## Materiale obligatorii, nefurnizate

| Consumabil  | Furnizor                           |
|---|------------------------------------|
| Vârfuri de filtru nesteril conductoare de 1000 µl | Hamilton, nr. de componentă 235905 |
| Vârfuri de filtru nesteril conductoare de 300 µl  | Hamilton, nr. de componentă 235903 |
| Vârfuri de filtru nesteril conductoare de 50 µl   | Hamilton, nr. de componentă 235948 |



| Consumabil  | Furnizor  |
|---|---|
| <p>Rezervor pentru godeuri adânci cu următoarele specificații:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Format de microplacă SLAS 1-2004 cu 96 de godeuri piramidale sau conice pe suprafața inferioară și o capacitate minimă de 240 ml.</li> <li>• Polipropilenă cu preferință pentru o fixare redusă a ADN-ului pentru toate suprafețele de contact cu probele.</li> <li>• Dimensiunile interioare (nivelul de lichid) sunt compatibile cu aspirarea automată și cu pașii de dispensare ai VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Dimensiunile pe înălțime sunt compatibile cu mișcările automate ale VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> </ul>   | <p>Furnizor general pentru laboratoare</p> <p>Rezervoare compatibile:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Corning Axygen, nr. de produs RES-SW96-HP-SI</li> <li>• Agilent, nr. de produs 201246-100</li> </ul>   |
| <p>Baie de reactiv cu următoarele specificații:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Baie care încapă bine în suportul VeriSeq NIPT Microlab STAR, cu fund în formă conică și cu o capacitate minimă de 20 ml.</li> <li>• Polipropilenă care nu conține RNază/DNază.</li> <li>• Dimensiunile interioare (nivelul de lichid) sunt compatibile cu aspirarea automată și cu pașii de dispensare ai VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Dimensiunile pe înălțime sunt compatibile cu mișcările automate ale VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> </ul>   | <p>Furnizor general pentru laboratoare</p> <p>Băi compatibile:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Roche, nr. de produs 03004058001</li> </ul>   |
| <p>Plăci cu godeuri adânci cu următoarele specificații:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Format de microplacă SLAS 1-2004, 3-2004 și 4-2004 cu 96 de godeuri piramidale sau conice pe suprafața inferioară și o capacitate minimă a godeurilor de 2 ml.</li> <li>• Polipropilenă cu preferință pentru o fixare redusă a ADN-ului pentru toate suprafețele de contact cu probele și cadru rezistent la torsiune.</li> <li>• Dimensiunile godeurilor (nivelul de lichid) sunt compatibile cu aspirarea automată și cu pașii de dispensare ai VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Dimensiunile pe înălțime ale plăcii sunt compatibile cu mișcările automate ale VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> </ul> | <p>Furnizor general pentru laboratoare</p> <p>Plăci compatibile:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Eppendorf, nr. de componentă 0030505301</li> <li>• Eppendorf, nr. de componentă 30502302</li> <li>• USA Scientific, nr. de componentă 1896-2000</li> </ul>  |
| <p>Plăci cu 384 de godeuri cu următoarele specificații:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Microplacă cu 384 de godeuri, optimizată pentru volume mici, cu o capacitate minimă a godeurilor de 50 µl.</li> <li>• Polistiren cu blocare a luminii și cu o fixare redusă a ADN-ului pentru toate suprafețele de contact cu probele.</li> <li>• Dimensiunile godeurilor (nivelul de lichid) sunt compatibile cu aspirarea automată și cu pașii de dispensare ai VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Dimensiunile pe înălțime ale plăcii sunt compatibile cu mișcările automate ale VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> </ul>   | <p>Furnizor general pentru laboratoare</p> <p>Plăci compatibile:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Corning, nr. de produs 3820</li> </ul>  |
| <p>Plăci cu 96 de godeuri cu următoarele specificații:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Microplacă cu un cadru rezistent la torsiune și 96 de godeuri cu fund în formă conică, margini înălțate și cu o capacitate minimă a godeurilor de 150 µl.</li> <li>• Polipropilenă care nu conține RNază/DNază și cu o fixare redusă a ADN-ului pentru toate suprafețele de contact cu probele.</li> <li>• Dimensiunile godeurilor (nivelul de lichid) sunt compatibile cu aspirarea automată și cu pașii de dispensare ai VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Dimensiunile pe înălțime ale plăcii sunt compatibile cu mișcările automate ale VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> </ul>                         | <p>Furnizor general pentru laboratoare</p> <p>Plăci compatibile:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Eppendorf, nr. de componentă 0030129512</li> <li>• Eppendorf, nr. de componentă 30129580</li> <li>• Eppendorf, nr. de componentă 30129598</li> <li>• Eppendorf, nr. de componentă 30129660</li> <li>• Eppendorf, nr. de componentă 30129679</li> <li>• BioRad, nr. de componentă HSP9601</li> </ul> |

| Consumabil   | Furnizor  |
|--|---|
| Unul dintre următoarele sigilii:<br>• Folie „F” Microseal<br>• Folii de sigilare                     | Bio-Rad, nr. catalog MSF1001<br>Beckman Coulter, nr. articol 538619 |
| CE BCT ADN acellular (Cell-Free DNA BCT CE)  | Streck, nr. catalog 218997  |
| Capace cu presiune   | Sarstedt, nr. de comandă 65.802                                     |
| Eprubete de 2 ml cu capac înșurubat  | Furnizor general pentru laboratoare                                 |
| Vârfuri de filtru de 20 µl pentru pipetor de 20 µl   | Furnizor general pentru laboratoare                                 |
| Vârfuri de filtru de 200 µl pentru pipetor de 200 µl   | Furnizor general pentru laboratoare                                 |
| Vârfuri de filtru de 1000 µl pentru pipetor de 1000 µl   | Furnizor general pentru laboratoare                                 |
| Pipete serologice de 25 ml   | Furnizor general pentru laboratoare                                 |
| Pipete serologice de 10 ml   | Furnizor general pentru laboratoare                                 |
| Recomandate:<br>Deconex® SOLARSEPT<br>Deconex® 61 DR   | Borer Chemie AG   |
| Echivalente:<br>Un spray dezinfectant rapid pe bază de alcool<br>O soluție de detergent dezinfectant | Furnizor general pentru laboratoare                                 |

### Materiale opționale, nefurnizate

| Consumabil  | Furnizor                            |
|---|-------------------------------------|
| Eprubetă, capac înșurubat, 10 ml (doar pentru probele de control) | Sarstedt, nr. de comandă 60.551     |
| Eprubetă, capac înșurubat, 50 ml                                  | Furnizor general pentru laboratoare |

## Colectarea, transportul și depozitarea probei



### ATENȚIE

Manevrați toate probele ca și cum ar fi agenți cu potențial infecțios.

- 1 Probele de sânge integral de 7-10 ml trebuie colectate în BCT de ADN acellular Streck.
- 2 Transportarea sângelui integral trebuie să fie în conformitate cu toate reglementările guvernamentale în vigoare privind transportul de agenți etiologici. Se recomandă metode de expediere/transport rapide.
- 3 În timpul transportului, depozitați la temperaturi între 4°C și 30°C. După ce se primesc probele, depozitați-le între 2°C și 8°C până când sunt gata de procesat. Intervalul dintre recoltarea de sânge și izolarea plasmei inițiale nu trebuie să depășească 5 zile.
- 4 În cazul în care este necesară o nouă testare, probele pentru post-procesare se pot astupa din nou cu capacul și depozita la 4°C pentru încă alte 5 zile (până la un număr total de 10 zile de la recoltarea de sânge).



### ATENȚIE

Depășirea perioadei de depozitare menționate anterior poate afecta ratele de eșec ale probelor individuale.

## Avertizări și precauții

- ▶ Acest test conține proteinază K. Se pot produce vătămări corporale prin inhalare, ingerare, contact cu pielea și contact cu ochii. Utilizați într-o zonă bine ventilată, purtați haine de protecție, evitați inspirarea prafului și eliminați orice recipiente și conținut neutilizat în conformitate cu standardele de siguranță guvernamentale în vigoare.

- ▶ Acest test conține clorură de guanidiniu. Se pot produce vătămări corporale prin inhalare, ingerare, contact cu pielea și contact cu ochii. Utilizați într-o zonă bine ventilată, purtați haine de protecție și eliminați orice recipiente și conținut neutilizat în conformitate cu standardele de siguranță guvernamentale locale în vigoare.
- ▶ Acest test conține 2-propanol, o substanță chimică inflamabilă. A se păstra departe de căldură și flacără deschisă. Se pot produce vătămări corporale prin inhalare, ingerare, contact cu pielea și contact cu ochii. Utilizați într-o zonă bine ventilată, purtați haine de protecție și eliminați orice recipiente și conținut neutilizat în conformitate cu standardele de siguranță guvernamentale locale în vigoare.
- ▶ Acest test conține sulfoxid de dimetil, un lichid coroziv și combustibil. Se pot produce vătămări corporale prin inhalare, ingerare, contact cu pielea și contact cu ochii. Utilizați într-o zonă bine ventilată, purtați haine de protecție și eliminați orice recipiente și conținut neutilizat în conformitate cu standardele de siguranță guvernamentale locale în vigoare.
- ▶ Pentru a împiedica formarea de gaze nocive, nu eliminați deșeurile de la extragerea ADN-ului liber circulant (conțin tiocianat de guanidină) împreună cu deșeurile care conțin înălbitor (hipoclorit de sodiu).
- ▶ Manevrați toate probele ca și cum ar conține agenți cu potențial infecțios.
- ▶ Utilizați măsurile de precauție obișnuite pentru activitățile de laborator. Nu pipetați cu gura. Nu mâncați, nu beți și nu fumați în spațiile de lucru desemnate. Purtați mănuși de unică folosință și halate de laborator atunci când manipulați specimene și reactivi pentru testare. După ce manipulați specimene și reactivi pentru teste, spălați-vă temeinic pe mâini.
- ▶ Nu utilizați nicio componentă a testelor care a depășit perioada de valabilitate prezentată pe eticheta cutiei pentru test. Nu interschimbați componentele pentru test din diferite loturi de testare. Loturile de testare sunt identificate pe eticheta cutiei pentru test. Depozitați componentele de testare la temperatura specificată.
- ▶ Pentru a împiedica degradarea probei sau a reactivului, asigurați-vă că toți vaporii de hipoclorit de sodiu de la curățare s-au disipat complet înainte de a începe protocolul.
- ▶ Nerespectarea procedurilor menționate poate duce la rezultate greșite sau la reducerea semnificativă a calității probelor.
- ▶ Raportați imediat orice incidente grave în legătură cu acest produs către Illumina și autoritățile competente ale statelor membre în care sunt rezidenți utilizatorul și pacientul.
- ▶ Pentru informații privind mediul, sănătatea și siguranța, consultați fișele cu date de securitate (SDS) la adresa [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).

## Note procedurale

### Evitarea contaminării

- ▶ Utilizați vârfuri noi și articole de laborator consumabile noi.
- ▶ Utilizați vârfuri rezistente la aerosoli pentru a reduce riscul de transfer și contaminarea încrucișată de la o probă la alta.
- ▶ Datorită potențialului de contaminare, fiți extrem de atenți pentru a vă asigura că întregul conținut rămâne în totalitate în godeu. Nu vărsați stropi din conținut. Centrifugați respectând orice pas privind agitarea.
- ▶ Urmați reglementările de bază aplicabile pentru bunele practici de laborator și igienă atunci când manevrați sânge și derivate din sânge.
- ▶ Nu utilizați spray-uri de decolorare cu aerosoli atunci când efectuați pregătirea bibliotecii. Contaminarea cu decolorant a urmei poate duce la eșuarea testului.

### Curățarea platformei VeriSeq NIPT Microlab STAR

- ▶ Înainte de utilizare, inspectați platforma să vedeți dacă este curată. Cel puțin o dată pe săptămână, efectuați întreținerea săptămânală și respectați aceste instrucțiuni de curățare.

- ▶ Îndepărtați toate suporturile care nu se pot încălca și curățați cu un spray dezinfectant rapid pe bază de alcool (Deconex® SOLARSEPT sau echivalent) și lăsați-le să se usuce. Dacă sunt foarte murdare, imersați-le apoi într-o soluție de detergent dezinfectant (lichid de curățare Deconex® 61 DR sau echivalent), clătiți cu dezinfectant pe bază de alcool și lăsați-le să se usuce.
- ▶ Deschideți capacul frontal și ștergeți platforma cu o lavetă saturată cu Deconex® SOLARSEPT (sau echivalent). Trebuie verificate în special blocurile laterale pentru a se inspecta gradul de curățenie.
- ▶ Scoateți colectorul CVS și curățați colectorul, garnitura și compartimentele interioare ale CVS cu laveta.
- ▶ Goliți resturile din vârf pentru CORE cu 96 de capete și canalul independent.
- ▶ Îndepărtați placa de scoatere a vârfurilor din canalul independent de la unitatea deșeurilor vârfuri și curățați-o: pulverizați Deconex® SOLARSEPT (sau echivalent) direct pe suprafață și ștergeți. Trageți o pungă nouă de plastic peste cadru și prindeți-o. Puneți placa de scoatere pentru vârfuri curată înapoi în poziție.
- ▶ Pulverizați Deconex® SOLARSEPT (sau echivalent) direct pe suprafața cutiei și toboganului de deșeurilor CORE cu 96 de capete și ștergeți.
  - ▶ Dacă acumularea de reziduuri este dificil de îndepărtat de pe deșeurile pentru vârfuri, ștergeți-o cu o lavetă umezită cu apă fără DNază/RNază până la eliminarea acumulării de resturi. Eliminați laveta în mod corespunzător. Continuați cu sterilizarea cu dezinfectant pe bază de alcool.
- ▶ Umeziți o lavetă fără scame sau un tampon de bumbac cu etanol 70%. Tamponați fereastra scannerului laser de la cititorul de coduri de bare. Folosind aceeași lavetă sau același tampon, curățați fiecare godeu de la adaptorul de placă CPAC. Dacă utilizați o lavetă, presați laveta în fiecare godeu al adaptorului, folosind partea din spate a unui creion, pentru a vă asigura că interiorul godeului este curățat corect.
- ▶ Curățați canalele independente:
  - ▶ Pe canalele independente, curățați manșonul de scoatere a vârfurilor (partea exterioară a canalelor pentru extragerea cu pipeta) cu o lavetă fără scame îmbibată cu Deconex® SOLARSEPT (sau echivalent). (Consultați Ghidul de referință Hamilton Microlab STAR nr. 15070074.)
  - ▶ Curățați discul de oprire și garniturile inelare ale capătului pentru extragere cu pipeta (partea exterioară a canalelor pentru extragerea cu pipeta) cu o lavetă fără scame îmbibată cu Deconex® SOLARSEPT (sau echivalent).
- ▶ Curățați CORE cu 96 de capete:
  - ▶ Utilizând aceeași lavetă fără scame îmbibată cu Deconex® SOLARSEPT (sau echivalent), curățați carcasa celor 96 de capete și partea inferioară a discurilor de oprire.
  - ▶ Utilizând aceeași lavetă sau o bucată ruptă de lavetă îmbibată cu Deconex® SOLARSEPT (sau echivalent), treceți laveta pe laturile canalelor pentru extragerea cu pipeta de la cele 96 de capete pentru a curăța garniturile inelare. repetați această procedură pentru fiecare canal pentru extragerea cu pipeta de la cele 96 de capete.
- ▶ Pulverizați capacul superior și lateral cu Deconex® SOLARSEPT (sau echivalent) și ștergeți până se usucă.
- ▶ Curățați panglica de protecție pentru încărcarea automată cu o lavetă îmbibată cu Deconex® SOLARSEPT (sau echivalent) și ștergeți fără a aplica presiune.
- ▶ Când platforma și componentele sunt complet uscate, înlocuiți suporturile.



#### NOTĂ

Curățarea și întreținerea incorecte ale ML STAR pot determina contaminarea încrucișată și performanța nesatisfăcătoare a testului.

## Controlul calității

Materialul de control cu caracteristici de performanță cunoscute poate fi evaluat pentru a detecta diferențele privind procesarea și procedurile tehnice din laborator.



### NOTĂ

Rularea unei probe de control sau control fără șablon reduce numărul total de probe materne necunoscute care pot fi procesate cu fiecare set de pregătire a probelor.

Nu depășiți cele două probe NTC per lot de 24 sau 48 de probe sau cele patru probe NTC per lot de 96 de probe.

## Instrucțiuni de utilizare

### Sfaturi și tehnici

Dacă în protocol nu se specifică un punct de oprire în siguranță, continuați imediat cu pasul următor.

#### Aplicarea codurilor de bare pe plăci

- Codurile de bare pentru plăcile cu manta completă încep cu PL.
- Codurile de bare pentru plăcile cu godeuri adânci încep cu DW.
- Aplicați codurile de bare pe plăcile cu manta completă și plăcile cu godeuri adânci pe partea de lângă coloana 12.
- Încărcați plăcile cu codul de bare spre dreapta pentru a permite scanarea automată.

#### Sigilarea și desigilarea plăcii

- ▶ Sigilați întotdeauna placa cu 96 de godeuri înaintea următorilor pași din protocol:
  - ▶ Pașii de centrifugare
  - ▶ Pașii pentru ciclul termic
- ▶ Pentru a sigila placa, aplicați capacul adeziv la placă și apoi sigilați.
- ▶ Înainte de desigilare:
  - ▶ Centrifugați scurt placa cu 96 de godeuri la 1000 × g timp de 20 de secunde.
  - ▶ Puneți placa pe o suprafață plană înainte de a îndepărta încet sigiliul.

#### VeriSeq NIPT Microlab STAR

- ▶ Înainte de utilizare, efectuați și documentați întreținerea necesară, în conformitate cu instrucțiunile producătorului.
- ▶ Observați ML STAR în timpul etapelor automate. Monitorizați interfața cu software-ul Managerul fluxului de lucru VeriSeq NIPT v2 ca să vedeți solicitările și instrucțiunile pentru operator.
- ▶ Nu modificați locul capacului frontal în timpul funcționării.
- ▶ Țineți platforma curată, fără alte elemente în timpul funcționării.
- ▶ În timpul pașilor de aspirație a plăcii, dacă solicită Managerul fluxului de lucru VeriSeq NIPT v2, ajutați manual la formarea sigiliului între placă și colectorul de vid.
- ▶ Lăsați sistemul să elimine automat vârfurile din adaptor. Nu îndepărtați manual vârfurile dacă software-ul nu solicită acest lucru.
- ▶ Eliminați reactivii consumați și consumabilele utilizate, așa cum vă cere Managerul fluxului de lucru.
- ▶ Goliți zilnic baloanele de sticlă pentru reziduurile aspirate. Primul balon de sticlă nu trebuie să fie niciodată peste ½ plin. Supraplinul deșeurilor aspirate poate afecta pompa de vid și poate reduce vidul aplicat de sistem.

## Procesarea probelor

### Procedura

- 1 Finalizați următoarele etape pentru fiecare parte alicotă:
  - a Centrifugați probele cu cod de bare la 1600 × g timp de 10 minute la 4°C cu frâna oprită.
  - b Atunci când centrifuga se oprește complet, scoateți eprubetele.  
După centrifugare, începeți în decurs de 15 minute izolarea plasmei. Dacă trec mai mult de 15 minute, centrifugați din nou.
- 2 Inspectați fiecare eprubetă pentru a determina adecvarea probei, incluzând verificarea următoarelor:
  - ▶ Volumul probei este cel preconizat.
  - ▶ Proba s-a separat corect în timpul centrifugării.
  - ▶ Nivelul plasmei este cu cel puțin 1,5 ml deasupra peliculei leucocitare.
  - ▶ Proba nu este hemolizată excesiv (adică plasma nu are culoarea roșu-închis).
  - ▶ Proba nu este lipemică (adică plasma nu are culoarea alb tulbure sau alb lăptos opac).
  - ▶ Proba nu prezintă coagulări.



#### ATENȚIE

Probele care au fost depozitate sau manipulate necorespunzător pot deveni necorespunzătoare. Dacă probe necorespunzătoare sunt procesate prin fluxul de lucru, acestea pot înfunda placa de fixare în timpul extragerilor, determinând evenimente de supraplin al probelor în godeurile alăturate.

- 3 Scoateți capacele eprubetelor și încărcați eprubetele în suporturile pentru eprubete. Încărcați toate probele și orice elemente de control al plasmei pentru lot.

## Izolarea plasmei

### Pregătirea

- 1 Etichetați 1 placă cu godeuri adânci cu Plasmă intermediară și aplicați un cod de bare.
- 2 Etichetați 1 placă cu godeuri adânci cu Plasmă finală și aplicați un cod de bare.



#### ATENȚIE

Asigurați-vă că folosiți tipul de placă corect pentru plăcile pentru Plasmă intermediară și pentru Plasmă finală. Utilizarea unui rezervor pentru godeuri adânci în locul unei plăci cu godeuri adânci duce la amestecarea probelor și poate determina rezultate incorecte.

### Procedura

- 1 Deschideți AppLauncher și selectați **VeriSeq NIPT Method** (Metoda VeriSeq NIPT).
  - 2 Introduceți ID-ul de lot și numele utilizatorului, apoi selectați **OK**.  
ID-ul de lot are o limită de 26 de caractere. Folosiți doar cifre, litere, caractere de subliniere ( \_ ) sau liniuțe ( - ).  
De exemplu: 2025-10-16\_Batch3.
  - 3 Selectați **New Batch** (Lot nou).
  - 4 După inițiere, selectați **OK** pentru a începe izolarea plasmei.
  - 5 Efectuați unul dintre următorii pași:
    - Pentru a încărca o fișă de probă existentă pe care ați creat-o anterior, selectați fișa de probă asociată lotului și apoi selectați **OK**.
    - Pentru a continua fără să selectați o fișă de probă, selectați **No Sample Sheet** (Fără fișă de probă).
- Pentru informații privind crearea unei fișe de probă sau stabilirea valorilor implicite, consultați *Ghid software pentru Soluția VeriSeq NIPT v2* (nr. document 1000000067940).

**NOTĂ**

Tipul de probă, făt unic sau gemeni, trebuie înregistrat cu precizie pentru fiecare probă, pentru a se asigura analiza corectă a datelor.

Dacă alegeți No Sample Sheet (Fără fișă de probă), asigurați-vă că ați setat valorile de probă implicite în instrumentele de service Manager flux de lucru.

- 6 Selectați dimensiunea lotului, apoi selectați **OK**.
- 7 Selectați numărul de controale fără șablon (NTC-uri), apoi selectați **OK**.

**NOTĂ**

Locașurile NTC sunt întotdeauna ultimele locașuri selectate. De exemplu, cu două NTC-uri într-o rulare cu 24 de probe, pozițiile 23 și 24 sunt NTC-uri.

- 8 Confirmați că toate codurile de bare sunt atașate și apoi încărcați probele, vârfurile și plăcile (cu codul de bare orientat spre dreapta) pe suport. Selectați **OK** după fiecare solicitare de încărcare.

| Dimensiunea lotului de probe | Suport Tip | Urmă  | Articol  | Poziția locației |
|------------------------------|------------|-------|--|------------------|
| 24, 48, 96                   | Vârf drept | 7–12  | Vârfuri de 1000 µl   | 5                |
|                              |            |       | Vârfuri de 1000 µl (lot doar de 96)  | 4, 5             |
|                              | Eprubetă   | 15    | Eprubete pregătite pentru probe de sânge 1-24 (pentru toate dimensiunile de lot)         | 1–24             |
|                              | Eprubetă   | 16    | Eprubete pregătite pentru probe de sânge 25-48 (doar pentru dimensiunea de lot 48 și 96) | 25–48            |
|                              | Eprubetă   | 17    | Eprubete pregătite pentru probe de sânge 49-72 (doar pentru dimensiunea de lot 96)       | 49–72            |
|                              | Eprubetă   | 18    | Eprubete pregătite pentru probe de sânge 73-96 (doar pentru dimensiunea de lot 96)       | 73–96            |
|                              | Multiflex  | 19–24 | Placă goală cu godeuri adânci, plasmă finală - cu cod de bare                            | 4                |
|                              | Multiflex  | 19–24 | Placă goală cu godeuri adânci, plasmă intermediară - cu cod de bare                      | 5                |
|                              | Reactiv    | 47    | [Opțional] DPBS pentru controlul fără șablon   | 5                |

- 9 Asigurați-vă că suporturile, echipamentele de laborator și reactivii sunt încărcăți corect și apoi selectați **OK** pe ecranul Pre-Spin Deck Verification (Verificare platformă anterioară rotirii).
- 10 Observați ML STAR când efectuează etapele automate.
- 11 Atunci când vi se solicită de către Managerul fluxului de lucru, asigurați-vă că platforma de încărcare ML STAR nu este obstrucționată, pentru a permite ML STAR să descarce suporturile.
- 12 Selectați **Unload** (Descărcare) pentru a descărca platforma.
- 13 Îndepărtați placa cu godeuri adânci pentru plasma intermediară.
  - a Inspectați placa pentru a detecta dacă volumele sunt uniforme în fiecare godeu (fără erori determinate de pipetă). Volumul prevăzut este de 1000 µl.
  - b Notați orice neuniformități și înregistrați-le când se încheie procedura de izolare a plasmei.
  - c Sigilați placa, încărcați la echilibru și centrifugați la 5600 × g timp de 10 minute cu frâna dezactivată sau activată sau la cea mai joasă setare.
- 14 Selectați **Yes** (Da) pentru a continua cu pregătirea plasmei finale.
- 15 Îndepărtați sigiliul plăcii și încărcați din nou placa pe suport.

| Dimensiunea lotului de probe | Suport Tip | Urmă  | Articol  | Poziția locației |
|------------------------------|------------|-------|--|------------------|
| 24, 48, 96                   | Multiflex  | 19–24 | Placă cu godeuri adânci pentru plasmă intermediară | 5                |

- 16 Bifați caseta de validare **Intermediate Plasma plate has been spun** (Placa cu plasmă intermediară a fost rotită) și apoi selectați **OK**.
- 17 Observați ML STAR când efectuează etapele automate.
- 18 Atunci când vi se solicită de către Managerul fluxului de lucru, asigurați-vă că platforma de încărcare ML STAR nu este obstrucționată, pentru a permite ML STAR să descarce suporturile.
- 19 Selectați **Unload** (Descărcare) pentru a descărca platforma.
- 20 Când vi se solicită de către Managerul fluxului de lucru, goliți suporturile și platforma.
- 21 Îndepărtați placa cu godeuri adânci pentru plasma finală.
- 22 Inspectați placa pentru:
  - ▶ Volume constante în fiecare godeu. Volumul prevăzut este de 900 µl.
  - ▶ Pelete celulare vizibile.
  - ▶ Hemoliză excesivă.

Dacă observați pelete celulare vizibile sau o hemoliză excesivă, invalidați proba afectată la finalul metodei de izolare a plasmelor sau folosiți Managerul de loturi. Pentru mai multe informații despre Managerul de loturi, consultați *Ghid software pentru Soluția VeriSeq NIPT v2 (nr. document 100000067940)*.
- 23 Atunci când vi se solicită de către Managerul fluxului de lucru, selectați **OK**.
- 24 Introduceți comentarii despre godeurile afectate, iar apoi selectați **OK**.
- 25 Efectuați unul dintre următorii pași.
  - Pentru a continua cu extragerea de ADN liber circulant, selectați **Yes** (Da).
  - Pentru a vă opri, selectați **Exit** (Ieșire).

#### PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ

Dacă vă opriți, sigilați placa pentru plasma finală și depozitați-o la o temperatură între 2°C și 8°C timp de până la 7 zile.

## Extragerea ADN-ului liber circulant

### Pregătirea

- 1 Examinați vizual cutia de extragere și de accesorii pentru a confirma că acest set nu este expirat.
- 2 Pregătiți următorii reactivi. Etichetați eprubetele pentru rezervoare și rezervoarele pentru godeuri adânci cu numele reactivilor.

| Articol                                      | Depozitare       | Instrucțiuni   |
|--|------------------|--|
| Placă cu godeuri adânci pentru plasma finală | între 2°C și 8°C | Dacă este depozitată anterior, lăsați-o să stea 30 de minute pentru a ajunge la temperatura camerei.<br>Centrifugați la 1000 × g timp de 20 de secunde.<br>Desigilați placa cu godeuri adânci pentru plasma finală înainte de utilizare. |

- 3 Adăugați încet 3,75 ml de soluție tampon de protează în fiecare flacon de protează K.
  - ▶ Pregătiți 3 flacoane pentru 24 și 48 de probe.
  - ▶ Pregătiți 4 flacoane pentru 96 de probe.
- 4 Puneți capacul flacoanelor de protează K și agitați până se resuspendă.



#### ATENȚIE

Nu contaminați dopul de cauciuc. Dacă pe dopul de cauciuc ajung alte substanțe, probele ulterioare pot fi contaminate.

- 5 Cumulați proteaza K preparată din toate flacoanele într-o eprubetă de reactiv și etichetați-o „Protează K”.
- 6 Adăugați 100 ml de EtOH 100% la fiecare sticlă de reactiv Soluție tampon de spălare II.
  - ▶ Pregătiți 1 sticlă pentru 24 și 48 de probe.
  - ▶ Pregătiți 2 sticle pentru 96 de probe.
- 7 Răsturnați sticlele cu Soluție tampon de spălare II pentru a amesteca.
- 8 Bifați casetele de validare de pe sticlele cu Soluție tampon de spălare II.



- 9 Etichetați 1 placă nouă cu manta completă drept Intermediar și aplicați un cod de bare pentru placă.
- 10 Etichetați 1 placă nouă cu manta completă drept Eluțiune pentru ADN liber circulant și aplicați un cod de bare pentru placă.
- 11 Etichetați 1 placă nouă cu godeuri adânci drept Intermediar pentru extragere și aplicați un cod de bare pentru placa cu godeuri adânci.
- 12 Aplicați un cod de bare pentru placă la placa de fixare a ADN-ului.
- 13 Pregătiți o soluție de curățare EtOH 70% (EtOH 70%, apă fără DNază/RNază 30%) pentru curățarea sistemului de aspirație.
- 14 Pregătiți sistemul de aspirație.
  - a Îndepărtați distribuitorul pentru aspirație și curățați cu EtOH 70%.
  - b Goliți deșeurile aspirate.
  - c Asigurați-vă că sistemul de aspirație ML STAR este pornit.

Evitați curățarea garniturii cu EtOH, deoarece materialul poate deveni friabil.

### Procedură

- 1 Selectați **OK** pentru a începe să extrageți ADN liber circulant.
- 2 Dacă nu este deja deschisă VeriSeq NIPT Method (Metoda VeriSeq NIPT):
  - a Deschideți AppLauncher și selectați **VeriSeq NIPT Method** (Metoda VeriSeq NIPT).
  - b Introduceți ID-ul de lot și numele utilizatorului, apoi selectați **OK**.
- 3 Încărcați vârfurile în suportul pentru vârfuri după cum urmează și apoi selectați **OK**.

| Dimensiunea lotului de probe | Suport Tip | Urmă | Articol            | Poziția locației |
|------------------------------|------------|------|--------------------|------------------|
| 24                           | Vârf drept | 1–6  | Vârfuri de 1000 µl | 1                |
|                              |            | 7–12 | Vârfuri de 300 µl  | 1                |
| 48                           | Vârf drept | 1–6  | Vârfuri de 1000 µl | 1, 2             |
|                              |            | 7–12 | Vârfuri de 300 µl  | 1                |
| 96                           | Vârf drept | 1–6  | Vârfuri de 1000 µl | 1, 2, 3, 4       |
|                              |            | 7–12 | Vârfuri de 300 µl  | 1                |

- 4 Încărcați vârfurile numărate pe suportul de vârfuri după cum urmează.

| Dimensiunea lotului de probe | Suport Tip | Urmă  | Articol            | Poziția locației |
|------------------------------|------------|-------|--------------------|------------------|
| 24, 48, 96                   | Vârf drept | 49–54 | Vârfuri de 1000 µl | 1                |
|                              |            |       | Vârfuri de 300 µl  | 2                |
|                              |            |       | Vârfuri de 50 µl   | 3                |

- 5 Introduceți poziția primului și ultimului vârf pentru fiecare stativ de vârfuri, apoi selectați **OK**.

- 6 Scanați codurile de bare ale Cutiei de extragere.
- 7 Introduceți numele utilizatorului sau inițialele preparatorului reactivilor, apoi selectați **OK**.
- 8 Scanați codurile de bare ale Cutiei de accesorii.
- 9 Introduceți numele utilizatorului sau inițialele preparatorului reactivilor, apoi selectați **OK**.
- 10 Confirmați că sunt atașate codurile de bare.
- 11 Desigilați placa cu godeuri adânci pentru plasma finală și încărcați plăcile (cu codul de bare spre dreapta) în suportul de plăci după cum urmează și apoi selectați **OK**.

| Dimensiunea lotului de probe | Suport Tip | Urmă  | Articol  | Poziția locației |
|------------------------------|------------|-------|--|------------------|
| 24, 48, 96                   | Multiflex  | 19–24 | Placă nouă cu manta completă, Intermediar - cu cod de bare                   | 1                |
|                              |            |       | Placă nouă cu manta completă, Eluțiune ADN liber circulant - cu cod de bare  | 2                |
|                              |            |       | Placă nouă cu godeuri adânci, Intermediar pentru extragere - cu cod de bare. | 4                |
|                              |            |       | Placă cu godeuri adânci pentru plasma finală - cu cod de bare                | 5                |

- 12 Confirmați că placa de fixare a ADN-ului este prevăzută cu cod de bare, apoi selectați **OK**.
- 13 Pentru loturile cu plăci parțiale, aplicați o folie de sigilare pentru placă, tăiată la dimensiuni, peste godeurile nefolosite (coloanele 4-12 pentru loturile de 24 de probe și coloanele 7-12 pentru loturile de 48 de probe).
- 14 Încărcați placa de fixare a ADN-ului în colectorul de vid cu codul de bare spre dreapta.
- 15 Bifați caseta de selectare **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (Sunt sigilate coloanele plăcii de fixare a ADN-ului?), apoi selectați **OK**.
- 16 Încărcați eprubetele de reactiv pe suportul de reactiv după cum urmează și apoi selectați **OK**.

| Dimensiunea lotului de probe | Suport Tip | Urmă | Articol                        | Poziția locației |
|------------------------------|------------|------|--------------------------------|------------------|
| 24, 48                       | Reactiv    | 47   | 16 ml soluție tampon de eluție | 1                |
|                              |            |      | 11 ml proteinază K             | 2                |
| 96                           | Reactiv    | 47   | 16 ml soluție tampon de eluție | 1                |
|                              |            |      | 15 ml proteinază K             | 2                |

- 17 Transferați reactivii specificați în rezervoarele pentru godeuri adânci și apoi încărcați rezervoarele pe suporturile cu godeuri adânci după cum urmează.
- 18 Selectați **OK**.

| Dimensiunea lotului de probe | Suport Tip  | Urmă  | Articol                             | Poziția locației |
|------------------------------|-------------|-------|-------------------------------------|------------------|
| 24, 48                       | Godeu adânc | 39–44 | 125 ml soluție tampon de spălare II | 1                |
|                              |             |       | 125 ml soluție tampon de spălare I  | 2                |
|                              |             |       | 60 ml EtOH 100%                     | 3                |
|                              |             |       | 100 ml soluție tampon de liză       | 4                |
|                              |             |       | 60 ml apă fără DNază/RNază          | 5                |
| 96                           | Godeu adânc | 39–44 | 200 ml soluție tampon de spălare II | 1                |
|                              |             |       | 125 ml soluție tampon de spălare I  | 2                |
|                              |             |       | 100 ml EtOH 100%                    | 3                |
|                              |             |       | 100 ml soluție tampon de liză       | 4                |
|                              |             |       | 100 ml apă fără DNază/RNază         | 5                |

- 19 Așteptați să se finalizeze verificarea automată a volumului de reactivi.

- 20 Confirmați că deșeurile din vid nu depășesc jumătate (se recomandă să nu fie deloc), apoi selectați **OK**.
- 21 Confirmați poziționarea tuturor suporturilor, echipamentelor de laborator și reactivilor și apoi selectați **OK** pe ecranul Extraction Deck Verification (Verificarea platformei de extragere).
- 22 Observați ML STAR în timpul etapelor automate.

**ATENȚIE**

Trebuie să invalidați manual supraplinurile de probe nedetectate de sistem anterior contaminării godeurilor din apropiere.

- 23 După etapa de aspirație finală, scoateți placa de fixare a ADN-ului și curățați suprafața inferioară cu EtOH 70%.
- 24 Sigilați orice godeu neacoperit de pe placa de fixare a ADN-ului și puneți-l pe placa cu godeuri adânci pentru plasma finală goală.
- 25 Centrifugați ansamblul placă de fixare a ADN-ului/plasmă finală la 5600 × g timp de 10 minute, cu frâna acționată.
- 26 Selectați **OK**.
- 27 În timpul centrifugării plăcii de fixare a ADN-ului, finalizați curățarea cu vid:
  - a Scoateți colectorul de vid și apoi selectați **OK**.
  - b Așteptați să se încheie eliminarea automată a deșeurilor.
  - c Curățați colectorul de vid și interiorul sistemului de aspirație cu EtOH 70% și apoi înlocuiți colectorul de vid.
  - d Bifați caseta de validare **Manifold is on Vacuum** (Colectorul este pe vid) pentru a iniția transferul plăcii de eluție pe colectorul de vid și apoi selectați **OK**.
- 28 După centrifugare, desigilați godeurile care conțin probe de pe placa de fixare a ADN-ului și plasați-o pe partea superioară a plăcii de eluție pentru ADN liber circulant.  
Placa de eluție pentru ADN liber circulant se află în colectorul de vid.
- 29 Încărcați placa de fixare a ADN-ului cu codul de bare spre dreapta, apoi selectați **OK**.
- 30 Observați ML STAR în timpul etapelor automate.
- 31 După incubare, bifați caseta de selectare **Plates are assembled as indicated** (Plăcile sunt asamblate după indicații) pentru a confirma că ansamblul placă de fixare a ADN-ului/placă de eluție pentru ADN liber circulant este pe baza suportului (dacă trebuie pentru centrifugă).
- 32 Sigilați godeurile neacoperite de pe placa de fixare a ADN-ului
- 33 Centrifugați la 5600 × g timp de 2 minute cu frâna pornită și apoi selectați **OK**.
- 34 Inspectați placa de eluție pentru ADN liber circulant pentru a detecta dacă volumele sunt uniforme în fiecare godeu.  
Volumul așteptat este de aproximativ 55 μl.
- 35 Sigilați și păstrați placa de eluție pentru ADN liber circulant pentru pregătirea bibliotecii.
- 36 Atunci când vi se solicită de către Managerul fluxului de lucru, asigurați-vă că platforma de încărcare ML STAR nu este obstrucționată, pentru a permite ML STAR să descarce suporturile
- 37 Selectați **Unload** (Descărcare) pentru a descărca platforma.
- 38 Descărcați toate suporturile și curățați platforma instrumentului ML STAR, iar apoi selectați **OK**.
- 39 Introduceți comentarii despre godeurile afectate, iar apoi selectați **OK**.
- 40 Efectuați unul dintre următorii pași:
  - Pentru a continua cu Prepare Libraries (Pregătirea bibliotecilor), selectați **Yes** (Da).
  - Pentru a vă opri, selectați **Exit** (Ieșire).

**PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ**

Dacă vă opriți, sigilați placa de eluție pentru ADN liber circulant și depozitați-o la o temperatură între -25°C și -15°C timp de până la 7 zile.

## Pregătirea bibliotecilor

### Pregătirea

- 1 Examinați vizual cutiile de pregătire a bibliotecii și de accesorii pentru a confirma că seturile nu sunt expirate.
- 2 Pregătiți următorii reactivi. Etichetați eprubetele pentru rezervor și rezervoarele pentru godeuri adânci cu numele reactivilor.

| Articol                               | Depozitare           | Instrucțiuni   |
|---------------------------------------|----------------------|--|
| Amestec de reparare capăt             | între -25°C și -15°C | A se dezgheța la temperatura camerei. Agitați pentru a amesteca.   |
| Amestec de poliadenilare              | între -25°C și -15°C | A se dezgheța la temperatura camerei. Agitați pentru a amesteca, apoi centrifugați pentru scurt timp.  |
| Amestec de legare                     | între -25°C și -15°C | A se dezgheța la temperatura camerei. Agitați pentru a amesteca, apoi centrifugați pentru scurt timp.  |
| Soluție tampon de resuspensie         | între 2 °C și 8 °C   | Agitați pentru a amesteca. Depozitați din nou după utilizare.  |
| Soluție tampon de hibridizare         | între -25°C și -15°C | A se dezgheța la temperatura camerei. Agitați pentru a amesteca. Depozitați din nou după utilizare.  |
| Placă adaptor ADN VeriSeq NIPT        | între -25°C și -15°C | A se dezgheța la temperatura camerei. Agitați pentru a amesteca. Centrifugați la 1000 × g timp de 20 de secunde. Aplicați un cod de bare pentru placă.   |
| Bile de purificare probă              | între 2°C și 8°C     | Lăsați-o să stea 30 de minute pentru a ajunge la temperatura camerei. Agitați puternic înainte de fiecare utilizare. Amestecați agitând sau răsturnând, până când toate bilele sunt în suspensie și amestecul este omogen. |
| Placă de eluțiune ADN liber circulant | între -25°C și -15°C | Dacă a fost depozitată anterior, confirmați că placa nu a fost depozitată mai mult de 7 zile și decongealați la temperatura camerei. Agitați la 1500 rpm timp de 1 minut. Centrifugați la 1000 × g timp de 20 de secunde.  |

- 3 Pregătiți proaspăt 50 ml EtOH 80% din 40 ml EtOH 100% și 10 ml apă fără DNază/RNază. Răsturnați EtOH pentru a amesteca.
- 4 Etichetați 1 placă nouă cu manta completă drept Bibliotecă și aplicați un cod de bare pentru placă.
- 5 Asigurați-vă că este pornit controlul termic pentru ML STAR.

### Enzime diluate

- 1 Combinați amestecul de poliadenilare și soluția tampon de resuspensie într-o eprubetă cu capac cu filet. Agitați pentru a amesteca, apoi centrifugați pentru scurt timp.

| Dimensiunea lotului de probe | Amestec de poliadenilare | Soluție tampon de resuspensie |
|------------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| 24, 48                       | 900 µl                   | 1200 µl                       |
| 96                           | 1800 µl                  | 2400 µl                       |

- 2 Combinați amestecul de legare și soluția tampon de resuspensie într-o eprubetă cu capac cu filet. Agitați pentru a amesteca, apoi centrifugați pentru scurt timp.

| Dimensiunea lotului de probe | Amestec de legare | Soluție tampon de resuspensie |
|------------------------------|-------------------|-------------------------------|
| 24, 48                       | 230 µl            | 1713 µl                       |
| 96                           | 440 µl            | 3278 µl                       |

## Procedură

- 1 Selectați **OK** pentru a porni Pregătirea bibliotecii. Dacă nu este deja deschisă VeriSeq NIPT Method (Metoda VeriSeq NIPT):
  - a Deschideți AppLauncher și selectați **VeriSeq NIPT Method** (Metoda VeriSeq NIPT).
  - b Introduceți ID-ul de lot și numele utilizatorului și apoi selectați **OK**.
- 2 Confirmați că următoarele consumabile sunt pregătite așa cum se specifică pe ecranul Reagent Preparation (Pregătirea reactivului):
  - ▶ Amestec de poliadenilare, amestec de legare și EtOH 80%.
  - ▶ Bile de purificare probă, amestec de reparare capăt și placă adaptor ADN VeriSeq NIPT.
- 3 Bifați casetele de validare și apoi selectați **OK**.
- 4 Scanați codurile de bare ale Cutiei de pregătire a bibliotecii.
- 5 Introduceți numele utilizatorului sau inițialele preparatorului reactivilor, apoi selectați **OK**.
- 6 Scanați codurile de bare ale Cutiei de accesorii.
- 7 Introduceți numele utilizatorului sau inițialele preparatorului reactivilor, apoi selectați **OK**.
- 8 Încărcați vârfurile în suportul pentru vârfuri după cum urmează și apoi selectați **OK** pentru fiecare suport.

| Dimensiunea lotului de probe | Suport Tip | Urmă | Articol           | Poziția locației |
|------------------------------|------------|------|-------------------|------------------|
| 24                           | Vârf drept | 1–6  | Vârfuri de 50 µl  | 1                |
|                              |            | 7–12 | Vârfuri de 300 µl | 1, 2             |
| 48                           | Vârf drept | 1–6  | Vârfuri de 50 µl  | 1, 2             |
|                              |            | 7–12 | Vârfuri de 300 µl | 1, 2, 3, 4       |
| 96                           | Vârf drept | 1–6  | Vârfuri de 50 µl  | 1, 2, 3, 4       |
|                              |            | 7–12 | Vârfuri de 300 µl | 1, 2, 3, 4, 5    |

- 9 Dacă ați oprit protocolul după procedura de extragere a ADN-ului liber circulant, încărcați vârfurile numărate pe suportul de vârfuri după cum urmează.

| Dimensiunea lotului de probe | Suport Tip | Urmă  | Articol            | Poziția locației |
|------------------------------|------------|-------|--------------------|------------------|
| 24, 48, 96                   | Vârf drept | 49–54 | Vârfuri de 1000 µl | 1                |
|                              |            |       | Vârfuri de 300 µl  | 2                |
|                              |            |       | Vârfuri de 50 µl   | 3                |

- 10 Introduceți poziția primului vârf pentru fiecare stativ de vârfuri, apoi selectați **OK**.
- 11 Confirmați că sunt atașate codurile de bare și încărcați plăcile (cu codul de bare spre dreapta) pe suport după cum urmează și apoi selectați **OK**.

| Dimensiunea lotului de probe | Suport Tip | Urmă  | Articol   | Poziția locației |
|------------------------------|------------|-------|---|------------------|
| 24, 48, 96                   | Multiflex  | 19–24 | Placă de eluțiune ADN liber circulant - cu cod de bare                      | 1                |
|                              |            |       | Placă de adaptor ADN - cu cod de bare                                       | 2                |
|                              |            |       | Placă nouă cu manta completă și 96 de godeuri, bibliotecii - cu cod de bare | 3                |
|                              |            |       | Plăci noi cu manta completă și 96 de godeuri                                | 4, 5             |

- 12 Încărcați suportul cu godeuri adânci după cum urmează și selectați **OK**.

| Dimensiunea lotului de probe | Suport Tip  | Urmă  | Articol   | Poziția locației |
|------------------------------|-------------|-------|---|------------------|
| 24, 48, 96                   | Godeu adânc | 39–44 | 50 ml EtOH 80% într-un rezervor pentru godeuri adânci | 1                |
|                              |             |       | Plăci noi cu manta completă și 96 de godeuri          | 2, 3, 4, 5       |

- 13 Încărcați eprubetele de reactiv pe suportul de reactiv după cum urmează și apoi selectați **OK**.

| Dimensiunea lotului de probe | Suport Tip | Urmă | Articol   | Poziția locației |
|------------------------------|------------|------|---|------------------|
| 24, 48, 96                   | Reactiv    | 47   | 2,5 ml de amestec de reparare capăt             | 1                |
|                              |            |      | Amestec de poliadenilare pregătit (volum total) | 2                |
|                              |            |      | Amestec de legare pregătit (volum total)        | 3                |
|                              |            |      | 10 ml de bile de purificare probă               | 4                |
|                              |            |      | 12 ml soluție tampon de hibridizare             | 5                |

- 14 Asigurați-vă că suporturile, echipamentele de laborator și reactivii sunt încărcăți corect și apoi selectați **OK** pe ecranul Library Deck Verification (Verificare platformă pentru bibliotecă).
- 15 Așteptați să se finalizeze verificarea automată a volumului de reactivi.
- 16 Observați ML STAR în timpul etapelor automate.
- 17 Atunci când vi se solicită de către Managerul fluxului de lucru, asigurați-vă că platforma de încărcare ML STAR nu este obstrucționată, pentru a permite ML STAR să descarce suporturile și apoi selectați **Unload** (Descărcare) pentru a descărca platforma.
- 18 Inspectați placa Bibliotecii pentru a detecta dacă volumele sunt uniforme în fiecare godeu.



#### ATENȚIE

Dacă volumul godeurilor sunt inconstante, probele pot genera rezultate incorecte.

- 19 Dacă o depozitați, sigilați și păstrați placa Bibliotecii.
- 20 Descărcați suporturile, curățați platforma, iar apoi selectați **OK**.
- 21 Introduceți comentarii despre godeurile afectate, iar apoi selectați **OK**.
- 22 Efectuați unul dintre următorii pași:
- ▶ Pentru a continua cu Quantify Libraries (Cuantificarea bibliotecilor), selectați **Yes** (Da).
  - ▶ Pentru a vă opri, selectați **Exit** (Ieșire).
- 23 Dacă nu vă opriți, treceți imediat la cuantificare.

#### PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ

Dacă vă opriți, sigilați placa Bibliotecii înainte de depozitare. Placa Bibliotecii este stabilă timp de până la 7 zile de la data pregătirii, la o temperatură între -25°C și -15°C.

## Cuantificarea bibliotecilor

### Pregătirea

- 1 Pregătiți următorii reactivi:

| Articol                      | Depozitare         | Instrucțiuni   |
|------------------------------|--------------------|--|
| Reactiv de cuantificare ADN  | între 2 °C și 8 °C | Protejați de lumină.<br>Decongelați la temperatura camerei timp de 30-150 de minute.<br>(Se recomandă eliminarea reactivului la începutul procedurii Pregătirea bibliotecilor.)<br>Agitați pentru a amesteca, apoi centrifugați pentru scurt timp. |
| Standard de cuantificare ADN | între 2 °C și 8 °C | Agitați pentru a amesteca, apoi centrifugați pentru scurt timp.  |

| Articol                       | Depozitare             | Instrucțiuni   |
|-------------------------------|------------------------|--|
| Placa Biblioteci              | între -25 °C și -15 °C | Dacă a fost depozitată anterior, confirmați că placa nu a fost depozitată mai mult de 7 zile și decongelați la temperatura camerei. Agitați pentru a amesteca. Centrifugați la 1000 × g timp de 20 de secunde. |
| Soluție tampon de resuspensie | între 2 °C și 8 °C     | Agitați pentru a amesteca.   |

- 2 Porniți fluorometrul cu 10 minute înainte de utilizare.
- 3 Aplicați un cod de bare pentru placă unei noi plăci cu 384 de godeuri.
- 4 Aplicați un cod de bare pentru placă unei noi plăci cu manta completă.

## Procedură

- 1 Selectați **OK** pentru a începe cuantificarea.
- 2 Dacă nu este deja deschisă VeriSeq NIPT Method (Metoda VeriSeq NIPT):
  - a Deschideți AppLauncher și selectați **VeriSeq NIPT Method** (Metoda VeriSeq NIPT).
  - b Introduceți ID-ul de lot și numele utilizatorului și apoi selectați **OK**.
- 3 Scanați codurile de bare ale Cutiei de accesorii.
- 4 Introduceți numele utilizatorului sau inițialele preparatorului reactivilor, apoi selectați **OK**.
- 5 Încărcați vârfurile în suport după cum urmează și apoi selectați **OK**.

| Dimensiunea lotului de probe | Suport Tip | Urmă | Articol                    | Poziția locației |
|------------------------------|------------|------|----------------------------|------------------|
| 24, 48                       | Vârf drept | 1-6  | Stivă de vârfuri de 300 µl | 1                |
|                              |            |      | Stivă de vârfuri de 50 µl  | 2                |
| 96                           | Vârf drept | 1-6  | Stivă de vârfuri de 300 µl | 1                |
|                              |            |      | Stivă de vârfuri de 50 µl  | 2, 3             |

- 6 Confirmați că sunt atașate codurile de bare și apoi, dacă este necesar, desigilați plăcile Biblioteci.
- 7 Încărcați plăcile (cod de bare spre dreapta) pe suportul Multiflex după cum urmează și apoi selectați **OK**.

| Dimensiunea lotului de probe | Suport Tip | Urmă  | Articol                                       | Poziția locației |
|------------------------------|------------|-------|---|------------------|
| 24, 48, 96                   | Multiflex  | 19-24 | Plăci noi cu manta completă – cu cod de bare  | 1                |
|                              |            |       | Placă nouă cu 384 de godeuri – cu cod de bare | 2                |
|                              |            |       | Placa Bibliotecă – cu cod de bare             | 3                |
|                              |            |       | Plăci noi cu manta completă și 96 de godeuri  | 4, 5             |

- 8 Încărcați eprubetele de reactiv fără capace pe suportul de eprubete după cum urmează și apoi selectați **OK**.

| Dimensiunea lotului de probe | Suport Tip | Urmă | Articol                      | Poziția locației |
|------------------------------|------------|------|------------------------------|------------------|
| 24, 48, 96                   | Eprubetă   | 46   | Standard de cuantificare ADN | 1                |
|                              |            |      | Reactiv de cuantificare ADN  | 2                |

- 9 Încărcați eprubetele de reactiv pe suportul de reactiv după cum urmează și apoi selectați **OK**.

| Dimensiunea lotului de probe | Suport Tip | Urmă | Articol                             | Poziția locației |
|------------------------------|------------|------|-------------------------------------|------------------|
| 24, 48, 96                   | Reactiv    | 47   | Tub de reactiv nou (gol)            | 1                |
|                              |            |      | 16 ml soluție tampon de resuspensie | 2                |

- 10 Dacă ați oprit protocolul după procedura Pregătirea bibliotecilor, încărcați vârfurile numărata pe suportul de vârfuri după cum urmează.

| Dimensiunea lotului de probe | Suport Tip | Urmă  | Articol            | Poziția locației |
|------------------------------|------------|-------|--------------------|------------------|
| 24, 48, 96                   | Vârf drept | 49–54 | Vârfuri de 1000 µl | 1                |
|                              |            |       | Vârfuri de 300 µl  | 2                |
|                              |            |       | Vârfuri de 50 µl   | 3                |

- 11 Introduceți poziția primului și ultimului vârf pentru fiecare stativ de vârfuri, apoi selectați **OK**.
- 12 Asigurați-vă că suporturile, echipamentele de laborator și reactivii sunt încărcați corect și apoi selectați **OK** pe ecranul Quant Deck Verification (Verificare platformă pentru cantitate).
- 13 Așteptați să se finalizeze verificarea automată a volumului de reactivi.
- 14 Observați ML STAR în timpul etapelor automate.
- 15 Atunci când vi se solicită de către Managerul fluxului de lucru, asigurați-vă că platforma de încărcare ML STAR nu este obstrucționată, pentru a permite ML STAR să descarce suporturile.
- 16 Selectați **Unload** (Descărcare) pentru a descărca platforma.
- 17 Descărcați placa Bibliotecii.
- Inspectați placa pentru a detecta dacă volumele sunt uniforme în fiecare godeu.
  - Sigilați placa Bibliotecii și depozitați la temperatura camerei până când se încheie analiza datelor fluorometrice.
- 18 Descărcați plăcile rămase cu 96 de godeuri și verificați dacă există volume constante în fiecare godeu. Erorile mari de volum pot indica o problemă cu etapele de pipetare.
- 19 Descărcați placa cu 384 de godeuri și verificați dacă există lichid în godeurile corespunzătoare.
- 20 Sigilați placa cu o folie de sigilare.
- 21 Centrifugați la 1000 × g timp de 20 de secunde.
- 22 Incubați la temperatura camerei timp de 10 minute, la adăpost de lumină.
- 23 Descărcați toate suporturile și curățați platforma instrumentului ML STAR, iar apoi selectați **OK**.



#### NOTĂ

Nu eliminați reactivii de cuantificare până se obțin date. Aveți nevoie în continuare de reactivi dacă doriți să efectuați o recuantificare.

- 24 După incubare, îndepărtați folia de sigilare și încărcați placa cu 384 de godeuri în cititorul de microplăci. Asigurați-vă că A1 este în colțul stânga sus la încărcare.
- 25 Faceți dublu clic pe șablonul VeriSeq NIPT pentru a-l deschide în SoftMax Pro.
- 26 Selectați **New Experiment** (Experiment nou) în fila Home (Pagină principală).
- 27 Selectați **Read** (Citire).
- 28 Exportați datele ca XML după cum urmează.
- Faceți clic dreapta pe **Plate** (Placă), apoi selectați **Rename** (Redenumire).
  - Scanați codul de bare al plăcii Cuantificare, apoi selectați **OK**.
  - În colțul din stânga sus al ecranului, selectați pictograma placă, apoi selectați **Export** (Exportare) din meniu.
  - Bifați caseta de selectare **Expt name** (Nume export), setați opțiunea de dată a plăcii la raw (brută), setați formatul de ieșire la XML, apoi selectați **OK**.
  - Setați calea și numele fișierului de ieșire, apoi selectați **Save** (Salvare).

Computerul Hamilton trebuie să poată accesa locația fișierului. Nu folosiți spații în numele sau calea fișierului.

#### Analiză

- În Managerul fluxului de lucru, pe ecranul Scanner Information (Informații scanner), introduceți un ID fluorometru.
- Introduceți comentarii despre rularea fluorometrului, iar apoi selectați **OK**.



- 3 Navigați la fișierul de cuantificare XML care conține datele fluorometrice și apoi selectați **OK**.
- 4 Analizați rezultatele analizei pentru curba standard și concentrația probei, apoi selectați **OK**.
- 5 Dacă trebuie să scanați din nou placa, selectați **Rescan** (Scanați din nou).  
Probele sunt sensibile la lumină și au o durată de viață limitată. Când este necesar, efectuați imediat repetarea scanării.
- 6 Introduceți comentarii despre godeurile afectate, iar apoi selectați **OK**.
- 7 Evaluați rezultatele și continuați după cum urmează.
  - Dacă rezultatele corespund specificațiilor, treceți la Cumularea bibliotecilor. Pentru specificații, consultați tabelul de cuantificare a metricilor și limitelor de control al calității din *Ghidul software pentru Soluția VeriSeq NIPT v2 (nr. document 1000000067940)*.
  - Dacă rezultatele nu corespund specificațiilor, sistemul abandonează metoda. Repetați procedurile de cuantificare, începând cu *Pregătirea la pagina 22*.
- 8 Efectuați unul dintre următorii pași:
  - Pentru a continua cu Pool Libraries (Cumularea bibliotecilor), selectați **Yes (Da)**.
  - Pentru a vă opri, selectați **Exit** (Ieșire).

### PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ

Dacă vă opriți, sigilați placa Bibliotecii înainte de depozitare. Placa Bibliotecii este stabilă timp de până la 7 zile de depozitare cumulată, la o temperatură între -25°C și -15°C.

## Cumularea bibliotecilor

### Pregătirea

- 1 Pregătiți următorii reactivi:

| Articol                       | Depozitare           | Instrucțiuni  |
|-------------------------------|----------------------|---|
| Soluție tampon de hibridizare | între -25°C și -15°C | A se dezgheța la temperatura camerei.<br>Agitați pentru a amesteca.<br>Depozitați din nou după utilizare.   |
| Placa Bibliotecii             | între -25°C și -15°C | Dacă este depozitată anterior, a se dezgheța la temperatura camerei.<br>Agitați la 1500 rpm timp de 1 minut.<br>Centrifugați la 1000 × g timp de 20 de secunde. |

- 2 Etichetați o eprubetă de cumulare goală drept Cumularea A. Pentru 96 de probe, etichetați o a doua eprubetă de colectare drept Cumularea B.
- 3 Salvați următorul program de denaturare pe ciclul termic cu capac încălzit.
  - a Alegeți opțiunea de capac preîncălzit și setați la 102°C.
  - b Setați volumul de reacție la 50 μl.
  - c Setați viteza de creștere la maximum (≥2°C pe secundă).
  - d Incubați la 96°C timp de 10 minute și apoi la 4°C timp de 5 secunde.
  - e Mențineți la 4°C.

### Procedură

- 1 Plasați placa Bibliotecii pe ciclul termic programat anterior și rulați programul de denaturare.



#### NOTĂ

Nu denaturați placa Bibliotecii înainte ca funcția de cuantificare să treacă de metricele CC, deoarece este posibil să doriți să efectuați o nouă cuantificare.

- 2 Centrifugați placa Bibliotecii la 1000 × g timp de 20 de secunde.

- 3 Selectați **OK** în Managerul fluxului de lucru pentru a începe cumularea bibliotecilor.
- 4 Dacă nu este deja deschisă **VeriSeq NIPT Method** (Metoda VeriSeq NIPT):
  - a Deschideți AppLauncher și selectați **VeriSeq NIPT Method** (Metoda VeriSeq NIPT).
  - b Introduceți ID-ul de lot și numele utilizatorului, apoi selectați **OK**.
- 5 Selectați concentrația cumulării, apoi selectați **OK**.  
Dacă este necesar, ajustați concentrația de cumulare pentru a atinge densitatea țintă a grupului de celule, de 220-260 k/mm<sup>2</sup>.
- 6 Dacă Managerul fluxului de lucru solicită acest lucru, efectuați unul dintre următorii pași:
  - ▶ Pentru a încărca o fișă de probă, selectați fișa de probă asociată lotului și apoi selectați **Load** (încărcare).
  - ▶ Pentru a utiliza valorile implicite de sistem pentru tipurile de probă rămase, raportarea sexului sau tipul de screening, selectați **Use Default** (Utilizare valori implicite) pentru fiecare setare.  
Pentru informații privind crearea unei fișe de probă, consultați *Ghid software pentru Soluția VeriSeq NIPT v2* (nr. document 100000067940).



**ATENȚIE**

Înainte de a selecta opțiunea Use Default (Utilizare valori implicite), asigurați-vă că ați setat valorile implicite în instrumentele de service Manager flux de lucru. În caz contrar, se poate genera o analiză incompletă a probelor.

- 7 Selectați **Start** pentru a începe cronometrarea plăcii de denaturare.
- 8 Încărcați vârfurile în suportul pentru vârfuri după cum urmează.

| Dimensiunea lotului de probe | Suport Tip | Urmă | Articol                    | Poziția locației |
|------------------------------|------------|------|----------------------------|------------------|
| 24, 48, 96                   | Vârf drept | 7–12 | Vârfuri de filtru de 50 µl | 1                |

- 9 Încărcați placa Bibliotecă denaturată (cod de bare spre dreapta) pe suportul Multiflex după cum urmează și apoi selectați **OK**.

| Dimensiunea lotului de probe | Suport Tip | Urmă  | Articol                                      | Poziția locației |
|------------------------------|------------|-------|--|------------------|
| 24, 48, 96                   | Multiflex  | 19–24 | Placa Bibliotecă denaturată (cu cod de bare) | 1                |

- 10 Încărcați eprubetele de cumulare pe suportul de eprubete după cum urmează și apoi selectați **OK**.

| Dimensiunea lotului de probe | Suport Tip | Urmă | Articol                            | Poziția locației |
|------------------------------|------------|------|------------------------------------|------------------|
| 24, 48                       | Eprubetă   | 46   | Eprubetă de 2 ml nouă, Cumularea A | 1                |
| 96                           | Eprubetă   | 46   | Eprubetă de 2 ml nouă, Cumularea A | 1                |
|                              |            |      | Eprubetă de 2 ml nouă, Cumularea B | 2                |

- 11 Încărcați eprubetele de reactiv pe suportul de reactiv după cum urmează și apoi selectați **OK**.

| Dimensiunea lotului de probe | Suport Tip | Urmă | Articol                            | Poziția locației |
|------------------------------|------------|------|------------------------------------|------------------|
| 24, 48, 96                   | Reactiv    | 47   | 3 ml soluție tampon de hibridizare | 1                |

- 12 Încărcați vârfurile în suportul pentru vârfuri după cum urmează.

| Dimensiunea lotului de probe | Suport Tip | Urmă  | Articol                      | Poziția locației |
|------------------------------|------------|-------|------------------------------|------------------|
| 24, 48, 96                   | Vârf drept | 49–54 | Vârfuri de filtru de 1000 µl | 1                |
|                              |            |       | Vârfuri de filtru de 300 µl  | 2                |
|                              |            |       | Vârfuri de filtru de 50 µl   | 3                |

- 13 Introduceți poziția primului și ultimului vârf pentru fiecare stativ de vârfuri, apoi selectați **OK**.
- 14 Asigurați-vă că suporturile, echipamentele de laborator și reactivii sunt încărcăți corect și apoi selectați **OK** pe ecranul Pooling Deck Verification (Verificare platformă de cumulare).
- 15 Observați ML STAR în timpul etapelor automate.
- 16 Introduceți comentarii despre godeurile afectate, iar apoi selectați **OK**.
- 17 Atunci când vi se solicită de către Managerul fluxului de lucru, asigurați-vă că platforma de încărcare ML STAR nu este obstrucționată, pentru a permite ML STAR să descarce suporturile.
- 18 Selectați **Unload** (Descărcare) pentru a descărca platforma.
- 19 Descărcați suportul pentru eprubete.
- 20 Puneți capacul fiecărei eprubete de cumulare, agitați, apoi centrifugați pentru scurt timp.
- 21 Selectați **OK**.
- 22 Secvențiați bibliotecile cât mai curând posibil după cumulare. Dacă este necesar, sigilați placa Bibliotecii și depozitați-o între -25°C și -15°C timp de cel mult 7 zile pentru a permite o nouă cumulare.

### PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ

Dacă vă opriți, puneți capacul eprubetelor de cumulare și depozitați-le la o temperatură între -25°C și -15°C timp de până la 7 zile.

## Pregătirea bibliotecilor cumulate pentru secvențiere

### Pregătire

- 1 Pregătiți următorii reactivi:

| Articol                  | Depozitare           | Instrucțiuni  |
|--------------------------|----------------------|---|
| Eprubete pentru cumulare | între -25°C și -15°C | Dacă este depozitată anterior, a se dezgheța la temperatura camerei.<br>Agitați scurt.<br>Centrifugați scurt. |

- 2 Pregătiți sistemul de secvențiere de următoare generație finalizând următoarele câmpuri în modulul Local Run Manager al VeriSeq NIPT:

- a Denumire rulare
- b Descriere rulare (opțional)
- c Cod de bare pentru grup

Pentru mai multe informații privind utilizarea modulului Local Run Manager al VeriSeq NIPT, consultați *Ghid software pentru Soluția VeriSeq NIPT v2 (nr. document 100000067940)*.



#### ATENȚIE

Codul de bare pentru grup introdus în modulul Local Run Manager trebuie să fie identic cu codul de bare pentru grup introdus în Managerul fluxului de lucru. Configurările de rulare incorecte sunt respinse de software-ul de analiză și pot necesita o nouă secvențiere.

Procedura următoare descrie încărcarea corectă a bibliotecilor cumulate pe un instrument de secvențiere de nouă generație pe bază de cartuș.

### Procedura

- 1 Adăugați următoarele consumabile în cartușul cu reactivi, apoi pipetați pentru a amesteca.
  - ▶ Soluție tampon de hibridizare 900 µl
  - ▶ 450 µl Cumul A
- 2 Continuați cu secvențierea pe un sistem de secvențiere de nouă generație.  
Pentru instrucțiuni privind secvențierea, consultați ghidul de referință pentru instrumentul de secvențiere de nouă generație. Pentru un NextSeq 550Dx, consultați *Ghidul de referință pentru instrumentul NextSeq 550Dx (nr. document 100000009513)* sau *Prospectul pentru instrumentul NextSeq 550Dx (nr. document 100000043133)*.

- 3 Dacă este necesar, repetați această procedură pentru Cumulul B.
  - ▶ Pentru a atinge intervalul de densitate țintă a grupului de celule, placa Bibliotecă se poate cumula din nou folosind o altă concentrație de cumulare pe Hamilton. Noua cumulare anulează validarea cumulării originale.
  - ▶ Alternativ, raportul cumulării la HT1 (450+900 µl) se poate modifica pentru a se obține intervalul de densitate țintă a grupului de celule.

## Secvențierea de următoare generație

Soluția VeriSeq NIPT v2 poate fi utilizată cu un sistem de secvențiere de nouă generație cu următoarele specificații:

- ▶ capabil de 2x36 citiri cu secvențiere la ambele capete.
  - ▶ compatibil cu adaptoarele index din setul de pregătire a probelor VeriSeq NIPT.
  - ▶ chimie pe două canale.
  - ▶ realizare automată de fișiere .BCL (date brute de la instrumentul de secvențiere).
  - ▶ 400 de milioane de citiri cu secvențiere la ambele capete per rulare.
  - ▶ compatibil cu software-ul de testare VeriSeq NIPT v2.
- NextSeq 550Dx este compatibil cu Soluția VeriSeq NIPT v2.

## Analiza datelor de secvențiere

După ce se încheie secvențierea, datele de secvențiere sunt trimise automat la Software-ul de testare VeriSeq NIPT v2 pentru analiză și generarea unui raport. Raportul include clasificările pentru fiecare probă din lot, precum și o evaluare a tuturor metricilor de CC rulate. Procesul de analiză de la finalizarea secvențierii la rezultatele finale durează aproximativ 4 ore pentru un lot de 48 de probe. Pentru informații detaliate privind analiza datelor și fișierul rezultat, consultați *Ghid software pentru Soluția VeriSeq NIPT v2 (nr. document 100000067940)*.

## Interpretarea rezultatelor

Algoritmul Soluției VeriSeq NIPT v2 folosește un model statistic complex care combină mai multe tipuri diferite de informații din colecția de fragmente de bibliotecă cu secvențiere la ambele capete. Acest model este utilizat pentru a detecta regiunile genomului care sunt sub sau suprareprezentate în biblioteca fiecărei probe. Un aspect important este că acest model determină dacă gradul de sub sau suprareprezentare este în concordanță, din punct de vedere cantitativ, cu un eveniment aneuploid din genomul fetal la nivel de fracție fetală estimată pentru bibliotecă.

Pentru toți cromozomii, datele cu secvențiere la ambele capete sunt aliniate la genomul de referință (HG19). Citirile aliniate neduplicate unice sunt agregate în compartimente de 100 Kb. Contorizările corespunzătoare ale compartimentelor sunt ajustate pentru decalajul GC și în conformitate cu acoperirea genomică specifică regiunii stabilită anterior. Folosind astfel de contorizări de compartiment normalizate, scorurile statistice sunt derivate pentru fiecare autozom prin compararea regiunilor de acoperire care pot fi afectate de aneuploidie cu restul de autozomi. Se calculează un raport de probabilitate logaritmică (log likelihood ratio – LLR) pentru fiecare probă, luând în calcul aceste scoruri pe bază de acoperire și fracția fetală estimată. LLR este probabilitatea ca o probă să fie afectată, având în vedere acoperirea observată și fracția fetală, comparativ cu probabilitatea ca proba să fie neafectată, având în vedere aceeași acoperire observată. Calcularea acestui raport are în vedere și incertitudinea estimată privind fracția fetală. Pentru calculele ulterioare se folosește logaritmul natural al raportului. Software-ul de testare evaluează LLR pentru fiecare cromozom țintă și fiecare probă trebuie să furnizeze o determinare a aneuploidiei.

În timpul creării lotului, trebuie să definiți tipul unei probe (făt unic sau gemeni), tipul de screening (de bază sau la nivel de genom) și raportarea cromozomului sexual (da, nu și SCA) dorite pentru fiecare probă. Împreună, aceste opțiuni determină informațiile raportate pentru fiecare probă.

Pentru toate tipurile de probe, tipul de screening determină ce anomalii autozomale sunt raportate. Pentru tipul de screening de bază se raportează doar evenimentele de trisomie a întregului cromozom care implică cromozomii 13, 18 și 21. Pentru tipul de screening la nivel de genom se raportează deleția sau duplicarea integrale sau parțiale ale oricărui cromozom autozomal. Lungimea celei mai mici deleții sau duplicări cromozomiale parțiale ce se poate raporta este de 7 Mb.

Pentru probele de la făt unic, puteți dezactiva raportarea cromozomului sexual. De asemenea, puteți configura să se raporteze aneuploidiile cromozomului sexual cu sau fără raportarea sexului probelor euploide.

Pentru probele de la gemeni, dacă se selectează Da pentru raportarea cromozomului sexual, rezultatul este limitat la raportarea prezenței sau absenței unui cromozom Y în bibliotecă. Aneuploidia cromozomului sexual nu se poate raporta pentru probele de la gemeni.

Un rezultat ANOMALY DETECTED (Anomalie detectată) indică faptul că proba este detectată pozitivă pentru una sau mai multe anomalii, în conformitate cu tipul de screening selectat și cu opțiunea de raportare a cromozomului sexual. Când se detectează o anomalie, raportul furnizează o descriere a anomaliei în notație citogenică.

Software-ul de testare VeriSeq NIPT v2 utilizează datele statistice generate în timpul secvențierii pentru a furniza o estimare a fracției fetale (FFE) pentru fiecare probă. FFE este componenta ADN liber circulant fetală estimată care este recuperată de test și raportată ca procentaj rotunjit pentru fiecare probă. Abaterile standard medii a acestei estimări pentru toate probele este de 1,3%. FFE nu trebuie utilizată izolat, pentru a exclude probele atunci când se raportează rezultatele.

Pentru a obține citiri de reprezentare cromozomială, software-ul de testare VeriSeq NIPT v2 utilizează testul individualizat de încredere pentru aneuploidia fetală (iFACT), o metrică pentru prag dinamică, care indică dacă sistemul a generat o acoperire de secvențiere suficientă, având în vedere estimarea fracției fetale pentru fiecare probă. Citirile negative sunt raportate doar dacă proba atinge pragul iFACT. Dacă o probă nu atinge acest prag, evaluarea CC afișează FAILED iFACT (iFACT eșuat) și sistemul nu generează un rezultat.

În plus față de iFACT, software-ul de testare VeriSeq NIPT v2 evaluează alte câteva metrici de CC în timpul analizei. Metricile suplimentare includ evaluarea uniformității acoperirii în regiunile genomice de referință și distribuția lungimilor pentru fragmentele de ADN liber circulant. Evaluarea CC afișează fie un marcaj CC, fie o eroare CC pentru orice metrici care nu se încadrează în intervalul acceptabil. În cazul unei erori CC, sistemul nu generează un rezultat pentru probă. Dacă o probă nu trece CC, proba poate fi reprocessată dacă există un volum suficient de plasmă în eprubeta pentru recoltarea de sânge.

Soluția VeriSeq NIPT v2 generează date pentru utilizarea într-un raport final. Nu generează un raport final pentru pacient. Clienții sunt responsabili cu proiectarea și conținutul raportului final care trebuie furnizat medicului de la unitatea de asistență. Illumina nu este răspunzătoare pentru precizia formulării raportului final pentru clienți.



#### ATENȚIE

Verificați estimările fracției fetale ale tuturor probelor. Dacă estimările fracției fetale sunt similare pentru toate probele din cadrul unei rulări, este posibil să se fi produs amestecarea probelor, care să fi afectat rezultatele. Contactați departamentul de Asistență tehnică Illumina pentru ajutor cu soluționarea problemei.

## Caracteristici de performanță

Următoarele date evidențiate în secțiunile referitoare la performanța clinică și la performanță analitică au fost generate de utilizarea protocoalelor și materialelor specificate în Instrucțiunile de utilizare începând cu plasma. Toate datele de secvențiere pentru această secțiune au fost generate pe un sistem de secvențiere NextSeq 500/550 sau un sistem de secvențiere NextSeq 550Dx cu următoarele configurări:

|                               | NextSeq 500/550  | NextSeq 550Dx  |
|-------------------------------|--|--|
| Software pe instrument        | Software de control NextSeq 4.0                                    | Software de operare NextSeq 1.3                                  |
| Versiunea setului de reactivi | Set de reactivi cu debit mare NextSeq 500/550 v2.5 (75 de cicluri) | Set de reactivi cu debit mare NextSeq 550Dx v2.5 (75 de cicluri) |
| Metodă de secvențiere         | Secvențiere la ambele capete 2x36 rulată în mod cu debit mare      | Secvențiere la ambele capete 2x36 rulată în mod cu debit mare    |

## Studiu clinic

Acuratețea clinică pentru Soluția VeriSeq NIPT v2 a fost demonstrată prin evaluarea probelor de plasmă de la femei gravide, cu sarcini cu făt unic și gemelare. Probele au fost obținute din probe de plasmă anonimizate, care au fost prelucrate anterior din probe de sânge periferic integral. Au fost avute în vedere peste 45.000 de probe pentru includerea în studiu. Aceste probe au fost supuse unui screening prenatal anterior în legătură cu aneuploidiile cromozomiale fetale și delețiile și duplicările parțiale de 7 Mb sau mai mari. Toate probele de la sarcinile afectate și un set de probe consecutive de la sarcinile neafectate au fost eligibile pentru testare dacă au fost disponibile rezultatele clinice și s-au respectat criteriile privind proba. În setul de analiză pentru testare au existat în total 2.335 de probe. Din acest set, 2.328 de probe au fost de la sarcini cu făt unic și șapte probe au fost de la sarcini gemelare.

Din aceste probe, 28 (1,2%, 28/2335) de probe nu au îndeplinit CC pentru test la prima testare în timpul analizei datelor de secvențiere finalizate:

- 27 erori iFACT (un XO, 26 neafectate)
- O eroare pentru datele care nu sunt cuprinse în intervalul prevăzut

### Caracteristici privind datele demografice și sarcina

Vârsta maternă, vârsta gestațională și trimestrul de sarcină sunt prezentate pe scurt în [Tabelul 7](#) pentru probele din screeningul la nivel de genom, inclusiv probele mozaic cunoscute.

Datele demografice au fost evaluate între cohortele de bază și cele la nivel de genom și nu au indicat nicio diferență statistică. Caracteristicile privind datele demografice și sarcina au fost similare, fie că au fost incluse sau excluse mozaicurile cunoscute.

Tabelul 7 Caracteristici privind datele demografice și sarcina

| Date statistice pe scurt                                      | La nivel de genom<br>(inclusiv mozaicurile cunoscute) |
|---|---|
| Număr de probe  | 2307*   |
| <b>Vârsta maternă - ani</b>                                   |   |
| Mediu   | 35,08   |
| Abatere standard  | 4,04  |
| Mediană   | 34,95   |
| Percentila 25, percentila 75                                  | 32,31, 37,79  |
| Minim, maxim  | 20,22, 53,02  |
| <b>Vârsta gestațională la recoltarea de sânge - săptămâni</b> |   |
| Mediu   | 10,93   |
| Abatere standard  | 1,20  |
| Mediană   | 10,57   |
| Percentila 25, percentila 75                                  | 10,29, 11,14  |
| Minim, maxim  | 10,00, 27,86  |
| <b>Trimestru de sarcină - n (%)</b>                           |   |
| < Primul (<14 săptămâni)                                      | 2.252 (98%)   |
| Al doilea   | 54 (2%)   |
| Al treilea (≥ 27 săptămâni)                                   | 1 (0%)  |

\* Probele finale prezentate au inclus 7 gemeni.

## Performanța clinică

Rezultatele, așa cum au fost determinate de Soluția VeriSeq NIPT v2, au fost comparate cu rezultatele conform standardului de referință clinic. Toate probele studiului au avut rezultate conform standardului de referință clinic (realitatea clinică) cu privire la starea aneuploidiei cromozomiale fetale și delețiile și duplicatele parțiale de 7 Mb sau mai mari. Rezultatul conform standardului de referință clinic pentru probele incluse în acest studiu a depins de analiza cromozomială sau de un examen fizic al nou-născutului cu un screening negativ NIPT bazat pe NGS. Personalul de studiu calificat a efectuat clasificarea datelor standardului de referință clinic în conformitate cu documentul Codificarea medicală primit de la sponsor.

Metodele de analiză a cromozomului au includ cariotiparea, fluorescența la hibridizarea in situ (FISH) sau micro-matricea cromozomului (CMA) de hibridizare genomică comparativă. Analiza cromozomului a fost efectuată pe sânge periferic sau salivă de sugar, probe de produse de concepție (POC), amniocite, vilii corionici, țesuturi placentare sau sânge din cordonul ombilical postnatal.

Mozaicismul este definit drept prezența a două sau mai multe linii celulare cu compoziție cromozomială diferită la un individ. Liniile celulare își au originea în același zigot. Tipul și nivelul de mozaicism diferă și depinde de momentul evenimentelor de mozaicism din timpul embriogenezei și dezvoltării fetale. În diagnosticele prenatale apar diferite tipuri de mozaicism, în funcție de distribuția liniilor celulare anormale comparativ cu cele normale din citotrofoblast, mezenchim sau făt.<sup>10</sup> Deși mozaicismul se poate vedea la orice anomalie cromozomială, este mai frecvent la trisomiile rare decât la trisomiile cromozomilor 21, 18 și 13 (T21, T18 și T13).<sup>11</sup> La evaluarea performanței, cazurile de mozaicism au fost incluse în analiza la nivel de genom, deoarece scopul acestui tip de screening pentru respectivul test este de a detecta aneuploidiile autozomale rare (RAA).

### Performanța screeningului de bază

Pentru screeningul de bază, anomaliile includ T21, T18 și T13. În analiză a fost inclus un număr total de 2.243 de probe de făt unic și gemeni. Toate cele șapte sarcini gemelare au fost detectate corect drept T21 și nu sunt raportate în tabelul următor.

Tabelul 8 Sensibilitatea și specificitatea Soluției VeriSeq NIPT v2 pentru detectarea trisomiilor 21, 18 și 13 într-un screening de bază pentru sarcinile cu făt unic (cu excepția mozaicurilor cunoscute)

|                  | T21                | T18                | T13                |
|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Sensibilitate    | > 99,9% (130/130)  | > 99,9% (41/41)    | > 99,9% (26/26)    |
| ÎI 95% bilateral | 97,1%, 100%        | 91,4%, 100%        | 87,1%, 100%        |
| Specificitate    | 99,90% (1982/1984) | 99,90% (1995/1997) | 99,90% (2000/2002) |
| ÎI 95% bilateral | 99,63%, 99,97%     | 99,64%, 99,97%     | 99,64%, 99,97%     |

Performanța testului la screeningul de bază, după cum se arată în [Tabelul 8](#), este calculată excluzând un subset de 64 de probe afectate de RAA, deleții sau duplicări parțiale autozomale sau mozaicism cunoscut. Aceste 64 de probe au inclus opt mozaicuri T21 și trei mozaicuri T18. Cinci dintre aceste 11 probe au fost identificate ca afectate de anomalia detectată de software-ul de testare VeriSeq NIPT v2.

### Performanța screeningului la nivel de genom

Pentru screeningul la nivel de genom, orice anomalie include trisomiile, monosomiile și delețiile sau duplicatele parțiale de 7 Mb sau mai mari. Probele pentru screeningul la nivel de genom au cuprins 36 de probe cu mozaicism cunoscut. Au fost testate un număr total de 2.307 de probe de făt unic și gemeni. Toate cele șapte sarcini gemelare au fost detectate corect drept având o anomalie la nivelul cromozomului 21 și nu sunt raportate în tabelele următoare.

## Performanța screeningului la nivel de genom pentru orice anomalie

Tabelul 9 Sensibilitate și specificitatea Soluției VeriSeq NIPT v2 pentru detectarea oricărei anomalii în cadrul screeningului la nivel de genom (inclusiv mozaicurile cunoscute)

|                  | <b>Sensibilitate</b> | <b>Specificitate</b> |
|------------------|----------------------|----------------------|
| Estimare % (n/N) | 95,5% (318/333)      | 99,34% (1954/1967)   |
| Î 95% bilateral  | 92,7%, 97,3%         | 98,87%, 99,61%       |

## Performanța screeningului la nivel de genom pentru aneuploidia autozomală rară

Tabelul 10 Sensibilitate și specificitatea Soluției VeriSeq NIPT v2 pentru aneuploidia autozomală rară (RAA) în cadrul screeningului la nivel de genom (inclusiv mozaicurile cunoscute)

|                  | <b>Sensibilitate</b> | <b>Specificitate</b> |
|------------------|----------------------|----------------------|
| Estimare % (n/N) | 96,4% (27/28)        | 99,80% (2001/2005)   |
| Î 95% bilateral  | 82,3%, 99,4%         | 99,49%, 99,92%       |

## Performanța screeningului la nivel de genom pentru delețiile și duplicatale parțiale

Tabelul 11 Sensibilitate și specificitatea Soluției VeriSeq NIPT v2 pentru delețiile și duplicatale parțiale de 7 Mb sau mai mari în cadrul screeningului la nivel de genom (inclusiv mozaicurile cunoscute)

|                  | <b>Sensibilitate</b> | <b>Specificitate</b> |
|------------------|----------------------|----------------------|
| Estimare % (n/N) | 74,1% (20/27)        | 99,80% (2000/2004)   |
| Î 95% bilateral  | 55,3%, 86,8%         | 99,49%, 99,92%       |

## Diferențele de performanță între screeningul de bază și screeningul la nivel de genom

Metodologia de evaluare pentru trisomiile comune și aneuploidiile cromozomilor sexuali este aceeași pentru screeningul de bază și screeningul la nivel de genom. Screeningul de bază aplică algoritmul doar pentru T21, T18 și T13. Cu toate acestea, screeningul la nivel de genom dezvoltă această metodologie, pentru a evalua toate trisomiile și RAA și duplicările și delețiile parțiale.

Există două diferențe între raportarea performanței descrisă între screeningul de bază și screeningul la nivel de genom. Prima, pentru screeningul la nivel de genom, probele cu mozaicism cunoscut atât pentru trisomiile comune și RAA, cât și pentru deleții sau duplicări parțiale au fost incluse în metricile de performanță. A doua, screeningul la nivel de genom poate raporta preferențial detecția unei deleții sau duplicări parțiale la o trisomie completă. Prezența unei trisomii complete în plus față de o deleție sau duplicare parțială poate fi observată prin referire la scorul LLR furnizat în raportul suplimentar.

### Includerea mozaicurilor în screeningul la nivel de genom

Mozaicismul este enumerat ca o limitare a acestui test. Când mozaicismul este prezent, semnalul fetal al unei anomalii este redus și prin urmare poate fi mai dificil de detectat fără a compromite specificitatea de ansamblu a testului. Cu toate acestea, deoarece mozaicismul este mai relevant pentru conținutul extins, probele cu mozaicism au fost incluse în screeningul la nivel de genom.

Dintre cele 64 de probe incluse în screeningul la nivel de genom, dar nu în screeningul de bază, 36 de probe au fost identificate ca având mozaicism conform standardului de referință clinic. Dintre aceste 36 de probe, 23 de definiții au corespuns standardului de referință clinic.

### Deleția sau duplicarea parțială comparativ cu detectarea aneuploidiei cromozomiale complete

Soluția VeriSeq NIPT v2 prezintă opțiuni de meniu atât pentru un screening de bază, cât și pentru un screening la nivel de genom. La screeningul de bază, un rezultat ANOMALY DETECTED (anomalie detectată) este raportat doar



când se detectează o aneuploidie completă la cromozomii 21, 18 sau 13 și dacă se îndeplinesc toate metricile de control al calității. La screeningul la nivel de genom, sistemul detectează aneuploidia la toți autozomii și evenimentele de deleție și duplicare parțială de cel puțin 7 Mb.

Atunci când se folosește screeningul la nivel de genom, sistemul acordă prioritate de raportare unui eveniment de deleție sau duplicare parțială față de definirea cromozomului complet, dacă dimensiunea deleției sau duplicării parțiale acoperă mai puțin sau egal cu 75% din cromozomul la care este detectat evenimentul. Dacă regiunea cu deleție și duplicare parțială detectată este mai mare de 75% din dimensiunea cromozomului, evenimentul este raportat drept trisomie completă sau monosomie a întregului cromozom. Prin urmare, delețiile și duplicările semnificativ de mari care sunt mai mici de 75% din dimensiunea cromozomului pot fi elocvente pentru aneuploidie a cromozomului complet.

În toate probele, scorul LLR pentru clasificarea întregului cromozom este disponibil în raportul suplimentar. Scorul LLR trebuie analizat în legătură cu întreruperea specificată în [Figura 2 la pagina 40](#) înainte de interpretarea rezultatului. Scorurile LLR la nivel de cromozom care depășesc întreruperea oferă sprijin suplimentar în interpretarea conformă unei aneuploidii a întregului cromozom.

În cadrul studiului clinic au existat două probe de sarcină cu făt unic cu duplicări semnificativ de mari (una pe cromozomul 21 și una pe cromozomul 18) care au reprezentat mai puțin de 75% din dimensiunea relativă a cromozomului (consultați [Tabelul 12](#)). Ambele evenimente au fost raportate drept duplicări parțiale și nu o trisomie completă pentru cromozomul respectiv. Scorurile LLR pentru aceste evenimente au fost peste întrerupere, în conformitate cu un rezultat afectat pentru o trisomie completă. Pentru o duplicare parțială sau pentru o definire de trisomie completă, gestionarea urmăririi pentru o citire NIPT pozitivă oferă pacientului testarea pentru confirmare prin intermediul unui diagnostic prenatal.

Tabelul 12 Exemple de evenimente de duplicare mari identificate în timpul screeningului la nivel de genom

|         | Realitatea clinică   | Rezultatul sistemului la nivel de genom | Dimensiunea anomaliei (MB) | % din cromozom | Scoruri LLR |
|---------|----------------------|---|----------------------------|----------------|-------------|
| Proba 1 | Trisomie 21 făt unic | Duplicare parțială la 21                | 22,50                      | 48,9%          | 19,43       |
| Proba 2 | Trisomie 18 făt unic | Duplicare parțială la 18                | 47,00                      | 60,2           | 12,99       |

Consultați *Ghid software pentru Soluția VeriSeq NIPT v2 (nr. document 1000000067940)* pentru informații suplimentare privind metricile de control al calității folosite pentru a raporta rezultatele aneuploidiei.

## Cromozomii sexuali

Rezultatele privind cromozomii sexuali ai Soluției VeriSeq NIPT v2 au fost comparate cu rezultatul conform standardului de referință clinic și sunt rezumate în tabelul următor. Concordanța procentuală a fost calculată pentru șase cromozomi sexuali, în cadrul fiecărui rezultat conform standardului de referință clinic. Concordanța procentuală a fost calculată drept numărul de probe în care definirea cromozomului sexual cu Soluția VeriSeq NIPT v2 a corespuns cu clasificarea conform standardului de referință clinic, împărțit la numărul total de probe cu aceeași clasificare conform standardului de referință clinic.

Tabelul 13 Concordanța procentuală pentru clasificarea în funcție de sexul fătului\*

| Clasificarea în funcție de sexul fătului |          | Fenotip din examenul fizic al nou-născutului |          | Rezultate citogenetice |    |    |     |     |     |         |        |
|--|----------|--|----------|------------------------|----|----|-----|-----|-----|---------|--------|
| Detectate                                | Cariotip | Feminin                                      | Masculin | XX                     | XY | XO | XXX | XXY | XYY | Altele* | Absent |
| Anomalie nedetectată                     | XX       | 997  | 0        | 21                     | 0  | 2  | 0   | 0   | 0   | 0       | 0      |
| Anomalie nedetectată                     | XY       | 0  | 966      | 0                      | 15 | 0  | 0   | 0   | 0   | 0       | 1      |
| Anomalie detectată                       | XO       | 0  | 0        | 0                      | 0  | 19 | 0   | 0   | 1   | 0       | 0      |

| Clasificarea în funcție de sexul fătului |          | Fenotip din examenul fizic al nou-născutului |          | Rezultate citogenetice |     |      |     |     |      |              |              |
|--|----------|--|----------|------------------------|-----|------|-----|-----|------|--------------|--------------|
| Detectate                                | Cariotip | Feminin                                      | Masculin | XX                     | XY  | XO   | XXX | XXY | XYY  | Altele*      | Absent       |
| Anomalie detectată                       | XXX      | 0  | 0        | 0                      | 0   | 0    | 17  | 0   | 0    | 1            | 0            |
| Anomalie detectată                       | XXY      | 0  | 0        | 0                      | 0   | 0    | 0   | 23  | 0    | 1            | 0            |
| Anomalie detectată                       | XYY      | 0  | 0        | 0                      | 0   | 0    | 0   | 0   | 11   | 0            | 0            |
| Totală                                   |          | 997  | 966      | 21                     | 15  | 21   | 17  | 23  | 12   | 2            | 1            |
| Concordant cu procentajul                |          | 100  | 100      | 100                    | 100 | 90,5 | 100 | 100 | 91,7 | Nu se aplică | Nu se aplică |

\* Cinci sarcini gemelare au fost clasificate corect drept prezență Y. Două sarcini au fost clasificate corect drept lipsă prezență Y.

\*\* Alte rezultate citogenetice au fost XXXXX și XXYY.

### Valoarea predictivă pozitivă și valoarea predictivă negativă a Soluției VeriSeq NIPT v2

Valoarea predictivă pozitivă (PPV) și valoarea predictivă negativă (NPV) ale testului oferă informații privind capacitatea testului de a comunica deciziile clinice în funcție de sensibilitatea, specificitatea testului și probabilitatea pretestării ca un făt să fie afectat de trisomie (prevalența). Deoarece PPV și NPV depind de prevalență și prevalența pentru aceste aneuploidii poate varia în funcție de diferitele populații de subiecți, PPV și NPV au fost calculate pentru o serie de valori de prevalență plauzibile, în funcție de valorile de sensibilitate și specificitate observate la screeningul de bază (fără mozaicuri cunoscute) al studiului clinic privind acuratețea. Tabelul 17 are la bază screeningul la nivel de genom (cu mozaicuri cunoscute).

Tabelul 14 Prevalență trisomie 21, PPV și NPV în screening de bază (cu excepția mozaicurilor cunoscute)

| Prevalență (%) | 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 |

Tabelul 15 Prevalență trisomie 18, PPV și NPV în screening de bază (cu excepția mozaicurilor cunoscute)

| Prevalență (%) | 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 |

Tabelul 16 Prevalență trisomie 13, PPV și NPV în screening de bază (cu excepția mozaicurilor cunoscute)

| Prevalență (%) | 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 |

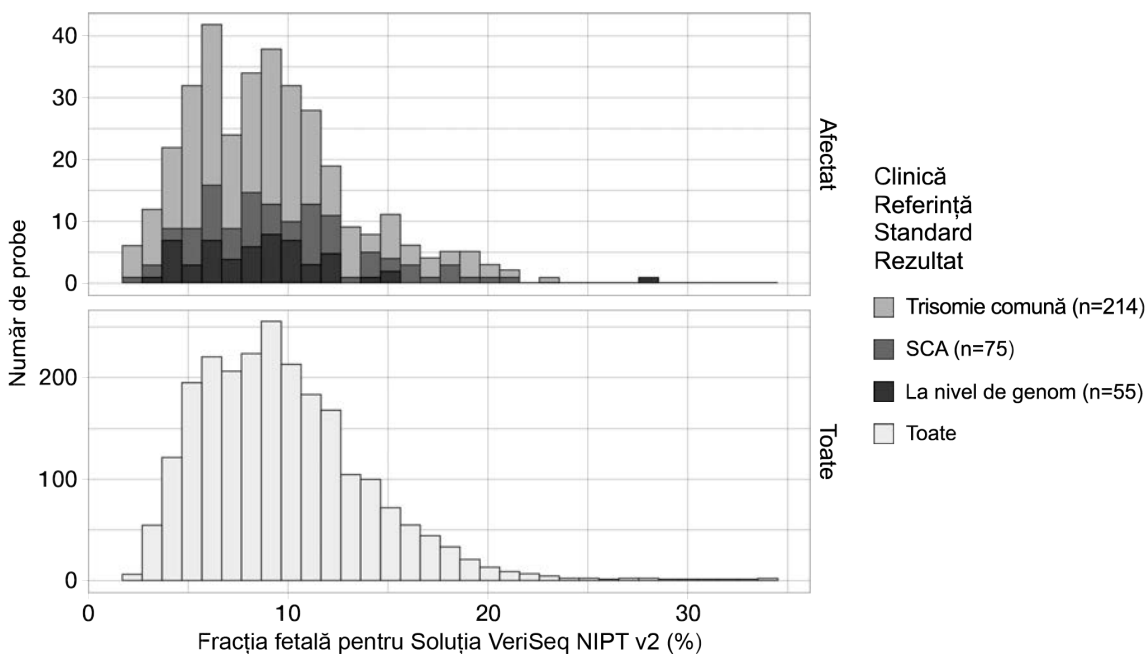
Tabelul 17 Orice prevalență cunoscută, PPV și NPV în screening la nivel de genom (inclusiv mozaicurile cunoscute)

| Prevalență (%) | 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   |

### Distribuția fracției fetale

Estimările pentru distribuția fracției fetale (FF) pentru Soluția VeriSeq NIPT v2 din screeningul la nivel de genom cu mozaicuri cunoscute sunt prezentate de categoria de rezultate conform standardului de referință clinic în [Figura 1](#).

Figura 1 Distribuția fracției fetale



5 probe au prezentat anomalii în mai multe categorii.

Trisomia comună include probele cu trisomia 21, 18 și/sau 13.

Nivelul de genom include probele cu RAA sau deleții și/sau duplicări parțiale.

Estimările privind FF au variat între 2% și 34% în total, cu o mediană de 9% și interval intercuartilic (IQ) între 6% și 12%. Estimarea privind mediana FF pentru trisomiile comune și evenimentele detectate de screeningul la nivel de genom este de 8% și pentru SCA-uri este de 9%. Intervalul din cadrul estimărilor FF a fost constant pentru toate rezultatele. Nu există nicio modificare aparentă în distribuția FF între trisomiile comune, SCA-uri, evenimentele detectate de screeningul la nivel de genom sau toate probele din analiza la nivel de genom.

## Performanța la sarcinile gemelare

### Estimarea trisomiei 13, 18 și 21 și performanța cromozomului Y la sarcinile gemelare

Datorită prevalenței reduse a trisomiei 21, 18 și 13 la sarcinile gemelare, doar un număr mic de probe gemelare afectate a fost disponibil pentru studiul clinic. Pentru a estima performanța Soluției VeriSeq NIPT v2 la sarcinile gemelare, modelele *in silico* bazate pe observațiile din probele clinice au fost utilizate pentru a simula populațiile de sarcini gemelare. Această simulare a fost în conformitate cu populația pentru utilizarea preconizată. Distribuția fracției fetale a fost determinată din aproximativ 4.500 de probe gemelare și a fost comparată cu distribuția din aproximativ 120.000 de probe cu făt unic. Distribuția fracției fetale condiționată de starea aneuploidiei a fost determinată din definițiile prezumtive pentru făt unic (1.044 trisomie 21, 307 trisomie 18 și 192 trisomie 13). Combinarea celor două distribuții a permis interferențele detectării aneuploidiei la gemeni. Au fost simulate seturi de gemeni dizigoți și monoziigoți și s-a realizat o medie ponderată care reprezintă prevalența acestora în populația pentru utilizarea preconizată (2 dizigoți:1 monozigot) pentru a se estima sensibilitatea. Pentru specificitate s-au simulat seturi de gemeni neafecțați.

Fracția din fiecare probă simulată afectată de trisomie (mai exact, fracția afectată) a fost calculată diferit pentru fiecare categorie de probă:

- ▶ Pentru gemenii monoziigoți, fracția afectată din fiecare probă a fost setată la 1,0, deoarece, în această situație, trisomia afectează ambii gemeni.
- ▶ Pentru gemenii dizigoți, s-a presupus că doar unul dintre gemeni a fost afectat (este extrem de rară situația când ambii gemeni dizigoți sunt afectați). Valorile fracției afectate au fost simulate folosind distribuția cunoscută a rapoartelor de fracție fetală, așa cum s-a determinat din probele clinice gemelare care diferă în funcție de sex. S-a apelat la o abordare tradițională prin care s-a presupus că geamănul afectat are cea mai mică fracție fetală dintre cei doi gemeni. S-a aplicat un factor de corecție pentru fracțiile fetale care sunt în medie mai mici la sarcinile cu trisomie 13 și 18.
- ▶ Pentru gemenii neafecțați, fracția afectată din fiecare probă a fost setată la zero.

Pentru gemenii afectați de trisomia 18 sau 13, s-a redus fracția fetală care corespunde fracției afectate a probei.

Reducerea a fost proporțională cu reducerea medie pentru fracția fetală observată în datele clinice privind fătul unic cu trisomie 18 sau 13 față de feții unici euploizi.

Dar fracția fetală totală și fracția afectată pentru fiecare probă simulată au fost apoi utilizate pentru a calcula un scor pentru aneuploidie, folosind algoritmul Soluției VeriSeq NIPT v2. Sensibilitatea s-a calculat determinând cât de des scorurile pentru aneuploidie pentru gemenii afectați simulați au fost mai mari decât oprirea aneuploidiei corespondente. În consecință, sensibilitatea s-a calculat determinând cât de des scorurile pentru aneuploidie pentru gemenii neafecțați simulați au fost mai mici decât oprirea aneuploidiei corespondente (Tabelul 18). Intervalele de încredere 95% au fost estimate în funcție de numărul de probe gemelare clinice reale din setul de date original, care au fost clasificate fie drept afectate fie neafectate de către trisomia relevantă.

Pentru a estima sensibilitatea cromozomului Y în probele gemelare au fost simulate seturi de gemeni XY/XY și XX/XY. S-a folosit o medie ponderată care reprezintă prevalența în populația de utilizare preconizată (1 XY/XY: 1 XX/XY). Pentru a estima specificitatea cromozomului Y la gemeni s-a simulat un set de gemeni XX/XX. Valorile totale pentru fracția fetală au fost simulate în conformitate cu distribuția cunoscută a fracției fetale în probele gemelare clinice.

Pentru gemenii XY/XY și XX/XY s-au estimat scorurile corespunzătoare ale cromozomului Y, folosind relația cunoscută dintre fracția fetală și scorurile cromozomului Y din probele cu făt unic clinice clasificate drept sex masculin. Doar pentru gemenii XX/XY s-au simulat valorile fracției fetale afectate (mai exact sex masculin), folosind distribuția cunoscută de rapoarte de fracție fetală observate între gemenii din aceeași sarcină, așa cum s-a determinat

din probele gemelare clinice diferite din punctul de vedere al sexului. S-a apelat la o abordare tradițională prin care fracția afectată a fost selectată astfel încât să corespundă celui mai mic dintre cei doi gemeni. Pentru fiecare probă XX/XY simulată, scorul cromozomului Y a fost înmulțit cu fracția afectată.

Pentru gemenii XX/XX, scorurile cromozomului Y au fost prelevate din scorurile observate la probele de făt unic clinice, clasificate drept sex feminin. Scorul cromozomului Y și fracția fetală totală au fost apoi folosite pentru a clasifica fiecare probă simulată ca având cromozom Y prezent sau cromozom Y absent, utilizând algoritmul standard din Soluția VeriSeq NIPT v2.

Sensibilitatea a fost calculată determinând cât de des gemenii simulați XY/XY sau XX/XY au fost clasificați corect drept având cromozom Y prezent. Specificitatea a fost calculată determinând cât de des gemenii simulați XX/XX au fost clasificați corect drept având cromozom Y absent. Intervalele de încredere 95% au fost estimate în funcție de numărul de probe gemelare clinice reale din setul de date original, care au fost clasificate având cromozom Y prezent sau cromozom Y absent.

Tabelul 18 Estimările pentru trisomia 21, 18 și 13 în populația simulată de sarcini gemelare

|                  | Trisomia 21      | Trisomia 18      | Trisomia 13      | Prezența Y       |
|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Sensibilitate    | 96,4%            | 95,7%            | 93,6%            | > 99,9%          |
| ÎI 95% bilateral | (86,4%, 98,9%)   | (68,3%, 99,4%)   | (64,1%, 98,9%)   | (99,9%, > 99,9%) |
| Specificitate    | 99,9%            | > 99,9%          | > 99,9%          | > 99,9%          |
| ÎI 95% bilateral | (99,8%, > 99,9%) | (99,9%, > 99,9%) | (99,9%, > 99,9%) | (99,7%, > 99,9%) |

**Tabelul 18** prezintă estimările punctuale și intervalele de încredere 95% pentru sensibilitatea și specificitatea Soluției VeriSeq NIPT v2 în detectarea trisomiei 21, 18 și 13 și prezența Y într-o populație simulată de sarcini gemelare, conformă cu populația de utilizare preconizată. Intervalele de încredere au fost estimate în funcție de numărul de controale de calitate trecute de probele gemelare clinice fie drept afectate, fie drept neafectate de trisomia respectivă. Calcularea sensibilității presupune că două treimi din sarcinile gemelare afectate sunt dizigote cu un gemăn afectat, în timp ce o treime din sarcinile gemelare afectate sunt monozigote, cu ambii gemeni afectați.

Estimările prezentate în **Tabelul 18** se referă doar la sarcinile gemelare. Datorită prevalenței și mai reduse, datele pentru sarcinile de ordin superior (tripleți sau număr mai mare de copii) au fost insuficiente pentru a stabili modele statistice adecvate pentru estimarea preciziei detectării aneuploidiei.

## Performanță analitică

### Precizie

Pentru a evalua și cuantifica precizia testului s-a efectuat o nouă analiză a datelor utilizând software-ul de rețea pentru analiză Soluția VeriSeq NIPT v2 din două studii anterioare privind Soluția VeriSeq NIPT:

- ▶ Studiul multicentric privind reproductibilitatea, ce a cuprins trei rulări efectuate de trei operatori din trei centre, folosind un singur lot de reactiv pentru un număr total de nouă secvențe.
- ▶ Studiul privind precizia din cadrul laboratorului, ce a cuprins 12 rulări la un singur centru, folosind două ML STAR-uri, două sisteme de instrumente de secvențiere și trei loturi de reactivi de secvențiere.

Obiectivul studiului de precizie a fost să cuantifice precizia testului în legătură cu trisomia 21 (T21) și cromozomul Y și să estimeze variabilitatea în rândul diferitelor instrumente, seturi de pregătire a bibliotecii și loturi de reactivi de secvențiere.

S-a creat un grup T21 cu fracție fetală 5%, combinând ADN liber circulant extras din plasma maternă a femeilor însărcinate (cu făt afectat de T21) și ADN liber circulant extras din plasma femeilor care nu sunt însărcinate. De asemenea, s-a creat un grup de ADN liber circulant matern-masculin (făt XY) cu fracție fetală 10%. Panoul de probe pentru fiecare rulare efectuată a inclus 4 duplicate pentru grupul de probe afectate T21 cu fracție fetală 5% și 20 de duplicate pentru grupul de ADN liber circulant matern-masculin cu fracție fetală 10%. Testarea s-a efectuat timp de 10 zile pentru un total de 21 de rulări, pentru cele două studii combinate.

T21 și prezența cromozomului Y au fost alese pentru evaluare în funcție de reprezentativitatea bolilor clinice și complexitatea detectării anomaliei. Deoarece este cel mai mic autozom uman, dimensiunea cromozomului 21 are un impact direct asupra sensibilității detectării T21, în special la valori mici ale fracției fetale ca, de exemplu, cele utilizate în acest studiu. Cromozomul Y, așa cum este prezent în plasma maternă, este de origine exclusiv fetală și, prin urmare, este mai ușor de detectat de către test.

Abaterile medii și standard observate pentru scorul LLR al cromozomului 21 și valorile cromozomiale normalizate (NCV) pentru cromozomul Y au indicat faptul că abaterea standard (SD) a duplicatului a fost cea mai mare sursă de variabilitate. Diferențele dintre centre, instrumente și loturi de reactiv au adăugat o cantitate nesemnificativă de variabilitate, așa cum s-a dovedit de către diferența dintre SD totală și SD duplicat în [Tabelul 19](#) și [Tabelul 20](#).

Tabelul 19 Rezumatul abaterii standard (SD) standard la răspunsul secvențial multicentric (reproductibilitate)

| Răspuns              | N   | Mediu  | SD duplicat | SD pentru reproductibilitate totală* |
|----------------------|-----|--------|-------------|--------------------------------------|
| Scor LLR cromozom 21 | 36  | 34,43  | 11,36       | 11,36                                |
| NCV cromozom Y       | 180 | 190,56 | 7,96        | 10,20                                |

\*Totalul include variabilitatea generată de centru, operator, rulare, zi și duplicat.

Tabelul 20 Rezumatul preciziei de reacție a secvențierii din cadrul laboratorului

| Răspuns              | N   | Mediu  | SD duplicat | SD totală în cadrul laboratorului* |
|----------------------|-----|--------|-------------|------------------------------------|
| Scor LLR cromozom 21 | 48  | 36,01  | 9,07        | 10,25                              |
| NCV cromozom Y       | 240 | 198,68 | 7,63        | 7,82                               |

\*Totalul include variabilitatea generată de instrumentul de secvențiere, lotul de reactiv, operator, rulare, zi și duplicat.

S-a efectuat un studiu suplimentar pentru a compara precizia de secvențiere a Soluției VeriSeq NIPT v2 (abatere standard totală) folosind versiunea 2.0 a unui Flow Cell comparativ cu versiunea 2.5. Studiul a inclus două tipuri de Flow Cell (v2.0 și v2.5), trei loturi de seturi de secvențiere, patru sisteme de instrumente și două rulări de secvențiere pentru un total de 48 de teste la un singur centru. Un grup de secvențiere a fost pregătit din plăcile pentru ADN liber circulant ce au fost pregătite manual. Panoul de probe a inclus 4 duplicate pentru grupul de probe afectate T21 cu fracție fetală 5% și 20 de duplicate pentru grupul de ADN liber circulant matern-masculin (făt XY) cu fracție fetală 10%. Rezultatele studiului sunt prezentate în [Tabelul 21](#) și sprijină afirmația că nu există nicio diferență în precizia de secvențiere când se utilizează Flow Cell v2.0 comparativ cu Flow Cell v2.5.

Tabelul 21 Rezumatul preciziei de reacție la secvențiere pentru Flow Cell v2.0 versus Flow Cell v2.5

| Răspuns              | Număr de observații per versiune | SD totală v2.0* | SD totală v2.5* | Rezultat statistic**                     |
|----------------------|----------------------------------|-----------------|-----------------|--|
| Scor LLR cromozom 21 | 96                               | 9,56            | 8,44            | Echivalent statistic (valoarea p = 0,25) |
| NCV cromozom Y       | 480                              | 7,74            | 7,38            | Echivalent statistic (valoarea p = 0,38) |

\*Totalul include variabilitatea generată de instrumentul de secvențiere, lotul de reactiv, rulare, zi, duplicat

\*\*În funcție de testarea F pentru egalitatea de variabile (abateri standard la pătrat)

## Contaminarea încrucișată

Contaminarea încrucișată a fost evaluată în fluxul de pregătire a probei pentru Soluția VeriSeq NIPT. Grupele de plasmă de la femeile neînsărcinate (CC) și bărbații adulți (XY) au fost testate într-un tipar tablă de șah în formatul placă cu 96 de godeuri, pe 4 plăci. N = 48 fiecare pentru probele de la femei și bărbați per placă, pentru un total de 192 de probe de la femei și 192 de la bărbați. Niciuna dintre probele de la femei nu a demonstrat acoperirea cromozomului Y care a fost mai mare din punct de vedere statistic decât fondul estimat, indicând faptul că nu a existat contaminare încrucișată de la probele de la bărbați în cadrul aceleiași plăci. În Soluția VeriSeq NIPT nu s-a observat nicio contaminare încrucișată detectabilă.

## Substanțe care pot interfera

Impactul substanțelor care pot interfera a fost evaluat în Soluția VeriSeq NIPT prin evaluarea performanței testului în prezența unor astfel de substanțe.

Albumina, bilirubina, hemoglobina și trigliceridele (endogene) au fost depistate în grupele de plasmă maternă de la sarcini neafectate cu făt de sex feminin (făt XX). Au fost testate la două concentrații pentru fiecare substanță de testare (n=16 pentru fiecare). Nu s-a observat nicio interferență în performanța testului.

Tabelul 22 Substanțe care pot interfera (endogene)

| Substanță de testare | Concentrație de testare joasă (mg/ml) | Concentrație de testare ridicată (mg/ml) |
|----------------------|---------------------------------------|--|
| Albumină             | 35                                    | 50                                       |
| Bilirubină           | 0,01                                  | 0,15                                     |
| Hemoglobină          | 100                                   | 200                                      |
| Trigliceride         | 1,5                                   | 5  |

ADN-ul genomic matern (gDNA) care apare în mod natural în plasmă poate, de asemenea, să interfereze cu performanța testului, deoarece poate fi extras împreună cu ADN-ul liber circulant fetal. Nivelurile de ADN genomic la 1,6, 3,3 și 4,9 ng per probă (corespunzând abaterilor standard 1, 2 și 3 peste concentrațiile de gDNA medii prevăzute după 7 zile de depozitare a sângelui integral<sup>12</sup>) au fost adăugate la ADN-ul circulant liber extras din plasma maternă de la sarcini neafectate cu făt de sex feminin (făt XX). Probele au fost apoi testate în Soluția VeriSeq NIPT (n=16 pentru fiecare concentrație). Nu s-a observat nicio interferență în performanța testului în prezența nivelurilor ridicate de gDNA.

Douăzeci de substanțe care pot interfera pe bază medicamentoasă (exogene) folosite sau prescrise în mod frecvent în timpul sarcinii au fost testate în conformitate cu EP7-A2 (Testarea interferențelor în chimia clinică; linii directe aprobate - ediția doi). Cele 20 de soluții care pot interfera au fost combinate în patru grupuri, identificate în plasma maternă de la femei neafectate cu făt de sex feminin (făt XX) și au fost testate în Soluția VeriSeq NIPT (n=16 pentru fiecare grup). Nu s-a observat nicio interferență în performanța testului în prezența acestor substanțe exogene.

Tabelul 23 Substanțe care pot interfera (exogene)

| Grupul 1       | Grupul 2       | Grupul 3          | Grupul 4        |
|----------------|----------------|-------------------|-----------------|
| Acetaminofenă  | Difenhidramină | Albuterol         | Cetirizină      |
| Acetilcisteină | Eritromicină   | Bupropionă        | Dextrometorfan  |
| Bisoprolol     | Guaifenesină   | Cafeină           | Acid L-ascorbic |
| Citalopram     | Heparină       | Sertralină        | Metoprolol      |
| Desloratadină  | Lidocaină      | Fluorură de sodiu | Nadolol         |

## Limita de detecție

Limita de detecție (LOD) este definită drept nivelul de fracție fetală care corespunde probabilității de detecție de 95% a unei boli de interes, ca, de exemplu, T21. Pentru a evalua LOD pentru Soluția VeriSeq NIPT v2 pentru diferite boli frecvente, s-au efectuat studii și analize statistice.

Probabilitatea detectării unei boli de interes într-o probă afectată procesată de Soluția VeriSeq NIPT v2 depinde în principal de trei factori:

- ▶ fracția fetală
- ▶ profunzimea secvențierii
- ▶ dimensiunea și complexitatea zonei de interes genomice.

Presupunând că profunzimea secvențierii este constantă, o anumită aberație este mai ușor de detectat într-o probă cu un procentaj de fracție fetală mai mare decât într-o probă cu un procentaj de fracție fetală mai mic. În schimb, presupunând că fracția fetală este constantă, o anumită aberație este mai ușor de detectat într-o probă cu o

profundzime a secvențierii mai mare decât într-o probă cu o profundzime a secvențierii mai mică. În cele din urmă, aberațiile din zonele genomice mai mici sau mai complexe sunt mai greu de detectat decât aberațiile din zonele genomice mai mari sau mai puțin complexe, presupunând o fracție fetală și o profundzime a secvențierii constante.

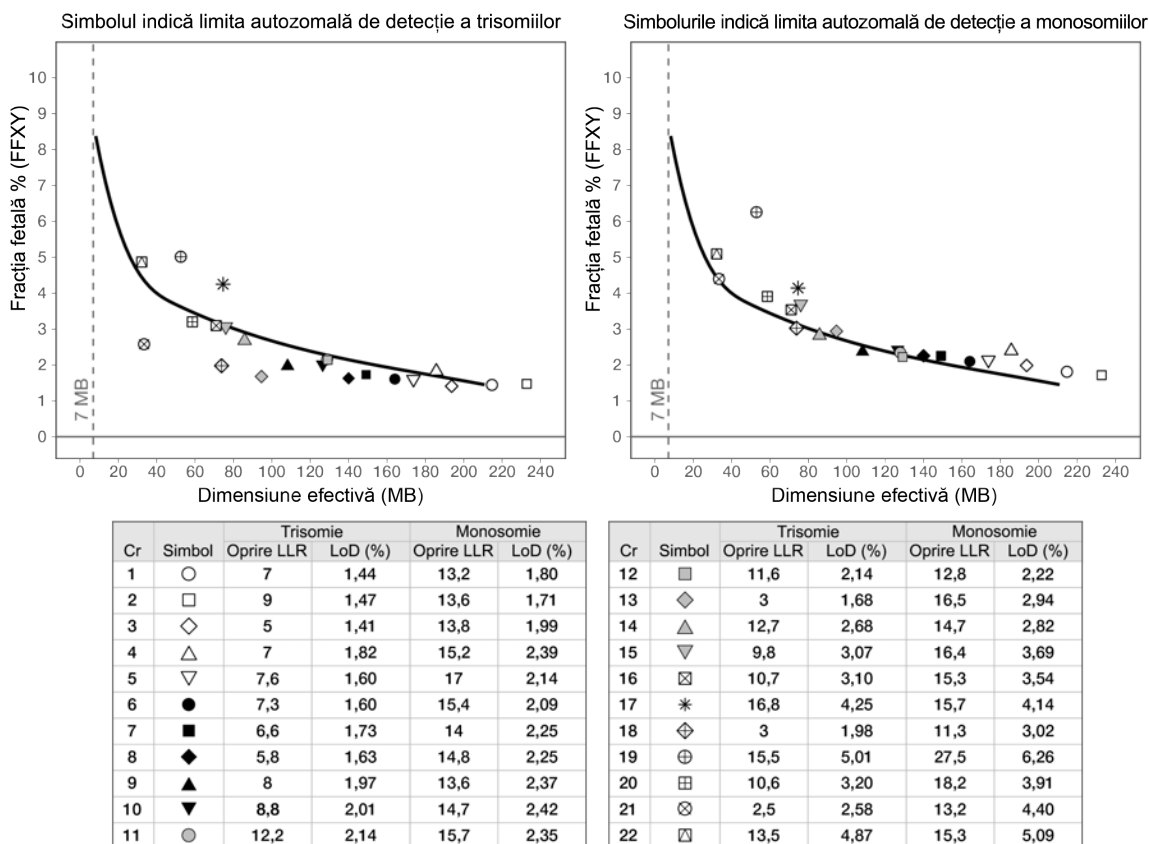
Pentru a determina LOD pentru detectarea T21 s-au analizat probele care conțin amestecuri de probe T21 cumulate și probe neafectate cumulate. Cele două tipuri de analit au fost combinate cu o serie de titrări pentru a crea un set de șapte niveluri de fracție fetală (0, 2, 3, 4, 5, 6 și 10%). Fiecare nivel a fost reprezentat de un număr total de 10 duplicate.

Pentru a crește și mai mult rezoluția grilei fracție fetală pentru analiza LOD, datele din studiu au fost adăugate la datele obținute dintr-o diluare in silico. Efectele diluării experimentale au fost simulate de combinarea controlată a datelor de secvențiere. Datele de la această titrare in silico au acoperit un set de 14 niveluri de fracție fetală (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 și 4,50%) cu 32 de duplicate pentru fiecare nivel. S-a aplicat o analiză a probiturilor la datele rezultate pentru a se determina LOD pentru T21.

În mod independent s-a dezvoltat un model statistic care utilizează fracția fetală, profundzimea secvențierii și dimensiunea/complexitatea genomică pentru a prevedea probabilitatea de detectare a oricărei aberații din orice probă. Acest model a fost determinat pe baza datelor care corespund unui set de 1.405 probe XY. LOD pentru T21, așa cum a fost prevăzută prin acest model, a fost determinată să fie în conformitate cu estimarea bazată pe probituri descrisă mai sus. Acest model statistic a fost utilizat pentru a estima valorile LOD pentru aneuploide la toți autozomii și pentru delețiile și duplicările parțiale.

Figura 2 prezintă probabilitatea de detecție de 95% pentru zonele medii în funcție de dimensiuni și de limitele de detecție autozomale pentru toate trisomiile și monosomiile.

Figura 2 Probabilitățile de detecție de 95% pentru zonele medii în funcție de dimensiune pentru Soluția VeriSeq NIPT v2





## Depanare

### Soluția VeriSeq NIPT v2 – Depanare

| Mod eroare                       | Rezultat posibil   | Interpretare  | Acțiune recomandată   | Observații  |
|----------------------------------|--|---|---|---|
| Plasmă introdusă insuficientă    | Eroare CC pentru probă   | Volum de plasmă insuficient   | Recoltare nouă  | În funcție de inspecția vizuală a volumului de plasmă.  |
| Eroare eprubetă de sânge         | Sângele nu este separat în straturi                            | Proba nu a fost centrifugată  | Asigurați-vă că a început centrifugarea și că eprubeta a fost rotită cu o forță corectă. Recoltați din nou proba.   |   |
|                                  |  | Depozitare sau transport impropriu al probei (hemolizarea probei)                                       | Recoltați din nou proba.  | Probele congelate nu se separă. Condițiile de transport sau depozitare improprie pot duce la hemolizarea probelor.  |
| Colmatarea probei/Curgerea lentă | Contaminarea plasmei   | Probele individuale pot colmata placa de fixare dacă există o contaminare importantă a probei de plasmă | Inspectați proba, dacă plasma rămasă în eprubetă este roșie sau lăptoasă, anulați proba și solicitați o nouă recoltare. Dacă proba pare normală, testați din nou proba. |   |
|                                  | Supraplin probă  | Inspecție vizuală inadecvată a fiecărei eprubete în ceea ce privește adecvarea probei                   | Invalidați orice probe din godeurile din apropiere afectate de supraplin.   | Ar putea indica un transport sau o condiție de depozitare necorespunzătoare a probei înainte de procesare. Trebuie să excludeți de la procesare probele inadecvate.   |
|                                  | Defecțiuni de hardware   | Digerare inadecvată a materialului în timpul extragerii   | Testați din nou proba. Dacă problema persistă în locația godeului și cu alte probe, contactați departamentul de Asistență tehnică Illumina.                             |   |
| Eroare CC pentru cuantificare    | Rulare de cuantificare eșuată - mediană lot sub valoare minimă | Randament insuficient al procesului   | Repetăți cuantificarea. Dacă și repetarea eșuează, contactați departamentul de Asistență tehnică Illumina.  | Transmiterea standardelor pentru indicatorii de curbă indică o problemă la pregătirea bibliotecii.  |
|                                  | Rulare de cuantificare eșuată                                  | Eroare de curbă standard  | Repetăți cuantificarea. Dacă și repetarea eșuează, contactați departamentul de Asistență tehnică Illumina.  | Cauzele standard ale erorii de curbă standard includ reactiv de cuantificare decongelat încorect, volume inconsecvente în godeuri datorită vărsării și degradarea reactivului de cuantificare ADN (de exemplu, datorită expunerii la lumină). |

| Mod eroare                                     | Rezultat posibil                                     | Interpretare  | Acțiune recomandată  | Observații  |
|--|--|---|--|---|
| Eroare de grupare                              | Nu s-a putut finaliza gruparea probei                | Analiza grupării nu poate calcula volumele de grup corecte  | Reevaluați concentrația grupului țintă, rulați din nou analiza de grupare.   | Poate apărea când toate probele dintr-un lot au valori de cuantificare scăzute, în timp ce ați setat o concentrație ridicată a grupului (de regulă mai mare de 3 - 5 pm).   |
| Eroare de CC pentru analiza probei individuale | Eroare CC pentru secvențiere                         | Elemente genetice introduse insuficiente SAU transfer greșit în timpul manevrării probei SAU eroare la reactivul de secvențiere | Verificați adnotarea probei. Verificați dacă există o performanță similară la probele anterioare în poziția corespunzătoare pe placă. Testați din nou proba. | Indică fie o introducere de probă greșită, fie un transfer greșit pe ML STAR. Materialul genetic insuficient se poate datora ADN-ului acelular insuficient din plasmă sau AND-ului din celule care determină supradiluarea probei pentru secvențiere. |
|  | Număr FF redus sau centre care nu sunt excluse (NES) | Date insuficiente generate pentru a obține o raportare exactă   | Testați din nou din plasmă.  |   |

## Depanarea VeriSeq NIPT Microlab STAR

| Etapă de proces  | Cod de eroare | Dialog de eroare   | Descriere  | Soluția pentru utilizator   |
|------------------|---------------|--|--|---|
| Crearea unui lot | EM0044        | The Batch ID entered contains forbidden characters. (ID lot introdus conține caractere interzise.)                       | Soluția VeriSeq NIPT v2 acceptă numai numere, litere, caractere de subliniere și linii pentru toate câmpurile de date. | Redenumiți lotul folosind un nume care nu conține niciun caracter text special.   |
| Crearea unui lot | EM0051        | The Batch ID is greater than 26 characters in length. (ID lot este mai lung de 26 de caractere.)                         | Soluția VeriSeq NIPT v2 limitează lungime numelor de lot la 26 de caractere sau mai puțin.                             | Redenumiți lotul folosind un nume care să aibă mai puțin de 26 de caractere.  |
| Crearea unui lot | EM0076        | Unable to connect to VeriSeq Onsite Server v2 (Imposibil de conectat la Serverul local VeriSeq v2)                       | Serverul local VeriSeq v2 nu răspunde la solicitările de date primite de la Managerul fluxului de lucru.               | Asigurați-vă că:<br>1. ML STAR este conectat la rețea.<br>2. Serverul local VeriSeq v2 este pornit.<br>3. ML STAR se poate conecta la Serverul local VeriSeq v2 (prin solicitare ping).<br>4. Dacă pașii de mai sus nu rezolvă problema, trimiteți un e-mail departamentului de Asistență tehnică Illumina.<br>5. Verificați sticla cu reziduuri de aspirație pentru a vedea dacă este mai mult de jumătate plină. Dacă este, goliți sticla cu reziduuri. |
| Crearea unui lot | EM0118        | This batch has been failed and cannot be further processed. (Acest lot nu a reușit și nu poate fi procesat mai departe.) | Lotul specificat deja nu a reușit și nu mai poate fi procesat mai departe.   | Înregistrarea lotului pe Serverul local VeriSeq v2 indică faptul că lotul selectat nu a reușit. Nu este permisă procesarea ulterioară. Creați un alt lot cu probele dorite.   |

| Etapă de proces  | Cod de eroare      | Dialog de eroare  | Descriere   | Soluția pentru utilizator  |
|------------------|--------------------|---|---|--|
| Crearea unui lot | Nu este disponibil | This batch has already completed processing. Would you like to repool? (Acest lot a încheiat deja procesarea. Doriți să reluați cumularea?) | Lotul indicat a fost procesat prin cumulare. Singura procesare permisă este o nouă cumulare.                  | Pentru a relua cumularea, selectați <b>Re-Pool</b> (Reluare cumulare). SAU Abandonați metoda și verificați de două ori Batch Name (Denumire lot).  |
| Izolarea plasmei | WP0087             | Duplicate sample barcodes loaded. (S-au încărcat coduri de bare duplicat pentru probă.)   | În sistem s-au încărcat probe cu coduri de bare identice.   | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Urmați indicațiile Managerului fluxului de lucru pentru a identifica ce probe sunt duplicate.</li> <li>2. Îndepărtați probele respective și reetichetați-le sau înlocuiți-le.</li> <li>3. Reîncărcați probele.</li> </ol>                                  |
| Izolarea plasmei | EP0102             | Samples specified in the Sample Sheet were not loaded. (Probele specificate în fișa probei nu au fost încărcate.)                           | Probele incluse în fișa probei nu au fost incluse în codurile de bare încărcate.                              | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Urmați indicațiile Managerului fluxului de lucru pentru a identifica probele lipsă.</li> <li>2. Adăugați probele lipsă în lot și reîncărcați probele SAU Abandonați metoda, modificați după cum este necesar fișa de probă și reporniți metoda.</li> </ol> |
| Sarcina plăcii   | Nu este disponibil | Venus Barcode Mask Error (Eroare mască pentru cod de bare Venus)  | Managerul fluxului de lucru impune asocierea corectă placă-la-lot, folosind măștile pentru cod de bare Venus. | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Verificați poziționarea plăcii pentru a confirma dacă așezarea plăcii este corectă.</li> <li>2. Asigurați-vă că placa încărcată este placa corectă pentru lotul indicat.</li> </ol>  |

| Etapă de proces                     | Cod de eroare | Dialog de eroare   | Descriere  | Soluția pentru utilizator   |
|-------------------------------------|---------------|--|--|---|
| Extragerea ADN-ului liber circulant | WE0150        | Pressure in the vacuum chamber is too low. (Presiunea din camera de vid este prea joasă).  | Managerul fluxului de lucru nu va continua dacă presiunea detectată pe tubul de aspirație de repaus este < 400 Torr.                                       | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Verificați să nu existe îndoitori sau alte obstrucții pe tubul de aspirație.</li> <li>2. Deschideți clemele de eliberare de pe tubul de aspirație, permiteți eliberarea presiunii, închideți complet clemele de eliberare de pe tub.</li> <li>3. Asigurați-vă că sunt pornite unitate de control și pompa de vid.</li> <li>4. Dacă problema persistă, luați legătura cu departamentul de Asistență tehnică Illumina.</li> </ol>   |
|                                     | WE0153        | Pressure in the vacuum chamber is too high. (Presiunea din camera de vid este prea ridicată).  | Dacă presiunea măsurată pentru vid este prea mare înainte de a se porni controlul presiunii, este posibil ca sistemul să funcționeze defectuos.            | Verificați pe partea posterioară a unității de control ca toate racordurile și tuburile să fie prinse corect.   |
|                                     | WE0996        | Vidul nu a fost etanșat.   | Sistemul nu creează o etanșare cu vid pe placa de fixare.  | <p><b>NOTĂ Nu selectați OK până când eroarea de etanșare nu este complet soluționată.</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Asigurați-vă că placa de fixare este la același nivel cu colectorul de vid. Cu mâna protejată de mânășă, apăsați forțat pe placa de fixare.</li> <li>2. Selectați <b>OK</b> pentru a continua să extrageți ADN liber circulant.</li> <li>3. Dacă acest mesaj de eroare este afișat de mai mult de trei ori într-o rulare, trimiteți un e-mail departamentului de Asistență tehnică Illumina.</li> </ol> |
| Extragerea ADN-ului liber circulant | WM0219        | If Vacuum is on, manually rest the pump. (Dacă vidul este pornit, puneți pompa manual în repaus.)  | Vidul poate rămâne activat după abandonarea unei metode în timpul extragerii.  | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Pe unitatea de control pentru vid, apăsați butonul de pornire pentru a decupla vidul.</li> <li>2. Așteptați 10 secunde, apoi apăsați din nou butonul de pornire pentru a activa vidul.</li> </ol>   |
|                                     | EE0477        | An error has occurred while moving a plate. (iSWAP error) (A intervenit o eroare la deplasarea unei plăci. Eroare iSWAP)                               | Dacă apare o eroare iSWAP (căderea plăcii, imposibilitate de ridicare și altele), sistemul va solicita utilizatorului să finalizeze manual mutarea plăcii. | <p>Asigurați-vă că placa se poate recupera (nu există material vărsat).</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- În caz contrar, abandonați rularea.</li> <li>- Dacă da, urmați instrucțiunile afișate pentru a finaliza manual transferul plăcii.</li> </ul>   |
|                                     | EE0519        | Scanned barcode does not match binding plate barcode on record. (Codul de bare scanat nu corespunde codului de bare al plăcii de fixare din evidențe.) | Placa de fixare încărcată nu corespunde codului de bare al plăcii scoase.  | Asigurați-vă că placa încărcată corespunde codului de bare înregistrat (consultați jurnalul de urmărire pentru a vedea codul de bare prevăzut).   |

| Etapă de proces | Cod de eroare | Dialog de eroare   | Descriere  | Soluția pentru utilizator   |
|-----------------|---------------|--|--|---|
| API             | EA0372        | Unable to connect to the data server. (Incapacitate de conectare la serverul de date.)   | Serverul local VeriSeq v2 nu răspunde la solicitările de date primite de la Managerul fluxului de lucru.     | Asigurați-vă că:<br>1. ML STAR este conectat la rețea.<br>2. ML STAR se poate conecta la Serverul local VeriSeq v2 (prin solicitare ping).<br>3. Serverul local VeriSeq v2 este pornit. |
|                 | EA0774        | Connection Error (Eroare de conexiune)<br>Conexiunea la serverul API nu a fost validată. | Serverul local VeriSeq v2 nu mai răspunde la solicitările de date primite de la Managerul fluxului de lucru. | Asigurați-vă că:<br>1. ML STAR este conectat la rețea.<br>2. ML STAR se poate conecta la Serverul local VeriSeq v2 (prin solicitare ping).<br>3. Serverul local VeriSeq v2 este pornit. |
|                 | EA0780        | 403: Invalid Request (403: Solicitare nevalidă)<br>Tranzacția curentă nu este validă.    | Datele trimise încalcă logica fluxului de lucru al sistemului.   | Consultați detaliile de eroare pentru mai multe informații.<br>Cauzele frecvente implică introduceri prea lungi sau care nu respectă lista de caractere permise.                        |

## Referințe

- 1 Nagaoka S, Hassold T, Hunt P. Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nat Rev Genet.* 2012;13(7):493-504. doi:10.1038/nrg3245.
- 2 Garnder RJ, Sutherland GR, Schaffer LG. *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling.* 4th edition. New York (NY): Oxford University Press; 2012.
- 3 Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, Ogilvie C, D'Antonio F. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015 Jan;45(1):16-26. doi: 10.1002/uog.14636.
- 4 American College of Obstetricians and Gynecologists. Screening for fetal aneuploidy. Practice Bulletin No. 163. *Obstet Gynecol.* 2016; 127(5):e123-137.
- 5 Gil MM, Accurti V, Santacruz B, Plana MN, Nicolaidis KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2017 Apr 11. doi: 10.1002/uog.17484.
- 6 Bianchi D, Parker R, Wentworth J et al. DNA Sequencing versus Standard Prenatal Aneuploidy Screening. *N Engl J Med.* 2014;370(9):799-808. doi:10.1056/nejmoa1311037.
- 7 Benn P, Borrell A, Chiu RW, et al. "Position statement from the Chromosome Abnormality Screening Committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis." *Prenat Diagn* 35 (2015): 725-34.
- 8 Gregg AR, Skotko BG, Benkendorf JL, et al. Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med.* 2016; doi:10.1038/gim.2016.97.
- 9 Dondorp W, de Wert G, Bombard Y, et al. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy and beyond: challenges of responsible innovation in prenatal screening. *Eur J Hum Genet.* 2015 Nov;23(11):1438-50.
- 10 Grati, et al. "Fetoplacental mosaicism: potential implications for false-positive and false-negative noninvasive prenatal screening results." *Genetics in Medicine* 16 (2014): 620–624.
- 11 Wellesley, et al. "Rare chromosome abnormalities, prevalence and prenatal diagnosis rates from population-based congenital anomaly registers in Europe." *European Journal of Human Genetics* 20 (2012): 521-526.
- 12 Norton S, Lechner J, Williams T, Fernando M et al. A Stabilizing Reagent Prevents Cell-free DNA Contamination by Cellular DNA in Plasma During Blood Sample Storage and Shipping as Determined by Digital PCR. *Clin. 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 fetoplacental disease." *Sci Transl Med* 9 (2017): ean1240.

## Istoricul reviziilor

| Document                          | Data               | Descrierea modificării   |
|-----------------------------------|--------------------|--|
| Nr. document<br>1000000078751 v06 | August<br>2021     | <ul style="list-style-type: none"> <li>S-a actualizat adresa Reprezentantului autorizat în Comunitatea Europeană.</li> </ul>   |
| Nr. document<br>1000000078751 v05 | Decembrie<br>2020  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Actualizarea secțiunilor Principiile procedurii, Avertizări și precauții și Etichetarea produsului cu clarificări suplimentare, pentru a îndeplini cerințele de reglementare.</li> <li>Actualizări minore ale conținutului din protocol, pentru a corespunde stilului și organizației Illumina actuale.</li> <li>Corectarea descrierii cromozomului 21, din „cel de-al doilea cel mai mic autozom uman” în „cel mai mic autozom uman” în secțiunea Precizie din Performanța analitică.</li> <li>Adăugarea de atenționări pentru a preveni utilizarea necorespunzătoare a rezervoarelor și riscurile de amestecare a probelor în secțiunile Izolarea plasmei, Pregătire și Interpretarea rezultatelor.</li> <li>Adăugarea de noi numere de componentă pentru server și software, pentru lansarea noului model de server și actualizările numerelor de componentă pentru software.</li> <li>Adăugarea de atenționări la informațiile despre protocol și depanare, pentru a preveni supraîncălzirea de probe.</li> <li>Actualizarea ingredientelor active din Standardul de cuantificare ADN reactiv din cutia de accesorii, pentru a-l armoniza cu Fișa cu date de securitate.</li> <li>Actualizarea convențiilor de denumire ale modulului Local Run Manager al VeriSeq NIPT, pentru consecvența cu alte documentații.</li> <li>Adăugarea istoricului reviziilor.</li> </ul> |
| Nr. document<br>1000000078751 v04 | Octombrie<br>2020  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Corecturi minore.</li> </ul>  |
| Nr. document<br>1000000078751 v03 | Septembrie<br>2020 | <ul style="list-style-type: none"> <li>Actualizarea listei de materiale pentru a prezenta specificațiile echipamentului de laborator, împreună cu opțiunile compatibile cunoscute.</li> </ul>  |
| Nr. document<br>1000000078751 v02 | Februarie<br>2020  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Actualizarea prezentării informațiilor din secțiunea Performanța clinică, pentru a reda mai bine diferențele dintre tipurile de screening de bază și pentru întregul genom.</li> <li>Adăugarea noii secțiuni Diferențe de performanță între screeningul de bază și screeningul la nivel de genom.</li> <li>Eliminarea informațiilor contradictorii despre caracterul opțional al raportului suplimentar din secțiunea Principiile procedurii.</li> <li>Actualizarea convenției de denumire pentru software-ul v2 Managerul fluxului de lucru VeriSeq NIPT în întregul document, pentru uniformitate stilistică.</li> <li>Actualizarea etichetării adreselor pentru Illumina din Australia și Țările de Jos, pentru a reflecta schimbări recente.</li> </ul>   |
| Nr. document<br>1000000078751 v01 | August 2019        | Eliminarea pasului dublat din Extragerea ADN-ului liber circulant, cauzat de o eroare a software-ului de publicare.  |
| Nr. document<br>1000000078751 v00 | Mai 2019           | Versiunea inițială.  |

## Brevete și mărci comerciale

Prezentul document și conținutul său constituie proprietatea Illumina, Inc. și a afiliaților săi („Illumina”) și sunt destinate exclusiv pentru utilizarea contractuală de către client în legătură cu folosirea produsului sau produselor descrise în prezentul document și în niciun alt scop. Acest document și conținutul său nu trebuie utilizate sau distribuite pentru niciun alt scop și/sau nici comunicate, divulgate sau reproduse în orice alt mod și în orice formă fără consimțământul prealabil acordat în scris de Illumina. Illumina nu transmite, în temeiul brevetelor sale, mărcilor sale comerciale, drepturilor sale de autor sau în temeiul dreptului comun, nicio licență și nici drepturi similare ale oricăror terți prin acest document.

The instructions in this document must be strictly and explicitly followed by qualified and properly trained personnel in order to ensure the proper and safe use of the product(s) described herein. Înainte de utilizarea acestui produs/acestor produse, întreg conținutul acestui document trebuie citit și înțeles în întregime.

FAPTUL DE A NU CITI COMPLET ȘI DE A NU RESPECTA ÎN MOD EXPLICIT TOATE INSTRUCȚIUNILE CUPRINSE ÎN PREZENTUL DOCUMENT POATE DUCE LA DETERIORAREA PRODUSULUI SAU PRODUSELOR, LA VĂTĂMAREA PERSOANELOR, INCLUSIV A UTILIZATORILOR SAU ALTOR PERSOANE ȘI LA DAUNE ALE ALTOR PROPRIETĂȚI ȘI VA ANULA ORICE GARANȚIE APLICABILĂ PRODUSULUI SAU PRODUSELOR.

ILLUMINA NU ÎȘI ASUMĂ NICIO RĂSPUNDERE CARE DECURGE DIN UTILIZAREA INADECVATĂ A PRODUSULUI SAU PRODUSELOR DESCRISE ÎN PREZENTUL DOCUMENT (INCLUSIV A COMPONENTELOR SAU SOFTWARE-ULUI ACESTORA).

© 2021 Illumina, Inc. Toate drepturile rezervate.

Toate mărcile comerciale sunt proprietatea Illumina, Inc. sau a proprietarilor lor respectivi. Pentru informații specifice privind mărcile comerciale, consultați [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Informații de contact



Illumina

5200 Illumina Way

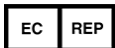
San Diego, California 92122 S.U.A.

+1.800.809.ILMN (4566)

+1.858.202.4566 (în afara Americii de Nord)

[techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)

[www.illumina.com](http://www.illumina.com)



Illumina Netherlands B.V.

Steenoven 19

5626 DK Eindhoven

The Netherlands

### Sponsor australian

Illumina Australia Pty Ltd

Nursing Association Building

Level 3, 535 Elizabeth Street

Melbourne, VIC 3000

Australia

## Etichetarea produsului

Pentru referințe complete la simbolurile care pot apărea pe ambalajele și etichetele produselor, consultați legenda simbolurilor pentru setul dvs. la adresa [support.illumina.com](http://support.illumina.com).

Un sumar privind siguranța și performanțele (SSP) este disponibil la <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>, după lansarea Bazei de date europene privind dispozitivele medicale (Eudamed), în care este asociat cu Basic UDI-DI (0081627002NIPTRP).