

## Ulotka dołączona do opakowania

DO STOSOWANIA W DIAGNOSTYCE IN VITRO.

## Przeznaczenie

VeriSeq™ NIPT Solution v2 jest testem diagnostycznym *in vitro*, przeznaczonym do stosowania jako test przesiewowy wykrywający anomalie genetyczne płodu w całym genomie na podstawie próbek obwodowej krwi pełnej pobranych od kobiety w co najmniej 10. tygodniu ciąży. VeriSeq NIPT Solution v2 wykorzystuje metodę sekwencjonowania całego genomu do wykrywania statusu aneuploidii dla wszystkich chromosomów oraz częściowych duplikacji i delecji we wszystkich autosomach. Test umożliwia też wykrycie aneuploidii chromosomów płci (SCA). Wyniki tego testu nie mogą być jedyną podstawą decyzji diagnostycznych lub innych decyzji dotyczących prowadzenia ciąży.

Zestaw VeriSeq NIPT Solution v2 obejmuje: oprogramowanie VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 do platformy VeriSeq NIPT Microlab STAR, zestaw do przygotowania próbek VeriSeq NIPT Sample Prep Kit oraz serwer lokalny VeriSeq Onsite Server v2 z oprogramowaniem VeriSeq NIPT Assay Software v2. Test VeriSeq NIPT Solution v2 jest przeznaczony do stosowania z sekwenatorem nowej generacji.

## Podsumowanie i wyjaśnienie zasady działania testu

Nieprawidłowości chromosomalne płodu, szczególnie aneuploidia, tj. nieprawidłowa liczba chromosomów, są częstą przyczyną niepowodzeń rozrodu, wad wrodzonych, opóźnień w rozwoju i niepełnosprawności intelektualnej. Aneuploidia dotyczy około 1 na 300 żywych urodzeń, przy czym znacznie wyższa częstość wiąże się z poronieniem i urodzeniem martwym<sup>1,2</sup>. Do niedawna istniały dwa rodzaje testów prenatalnych w kierunku tych zaburzeń: testy diagnostyczne lub badania przesiewowe. Testy diagnostyczne obejmują procedury inwazyjne, takie jak amniopunkcja lub biopsja kosmówki. Te metody są uznawane za złoty standard w wykrywaniu aneuploidii płodu. Wiążą się one jednak z ryzykiem utraty ciąży wynoszącym między 0,11% a 0,22%<sup>3</sup>. Konwencjonalne badania przesiewowe z użyciem wielu markerów nie powodują ryzyka utraty ciąży, ponieważ są nieinwazyjne, ale są mniej dokładne niż testy diagnostyczne. Wskaźniki wykrywalności tych metod dla trisomii 21 wahają się między 69–96% w zależności od badania przesiewowego, wieku matki i wieku ciążowego w momencie wykonania badania<sup>4</sup>. Co ważne, charakteryzują się one wskaźnikiem wyników fałszywie dodatnich wynoszącym około 5%, co może prowadzić do konieczności wykonania inwazyjnych testów diagnostycznych w celu potwierdzenia i w związku z tym do ryzyka utraty ciąży związanego z procedurą<sup>4</sup>. Ultrasonograficzne badania przesiewowe mogą również wykrywać nieprawidłowości chromosomalne, ale uzyskiwane wyniki charakteryzują się jeszcze mniejszą pewnością niż w przypadku pozostałych metod.

Aneuploidię płodu dla chromosomów 21, 18, 13, X i Y można wykryć z dużą dokładnością za pomocą nieinwazyjnych testów prenatalnych (NIPT) przy użyciu sekwencjonowania całego genomu pozakomórkowego DNA (cfDNA) uzyskanego z osocza krwi matki w 10. tygodniu ciąży lub później. W przeprowadzonej niedawno metaanalizie wielu badań klinicznych wykazano następujące ważne łączne wskaźniki wykrywania i swoistości dla trisomii 21 i trisomii 18 w ciążach pojedynczych: trisomia 21 99,7% i 99,96% oraz trisomia 18 97,9% i 99,96% (odpowiednio)<sup>5</sup>. Jedno z badań sugeruje, że zastosowanie NIPT jako podstawowego badania przesiewowego we wszystkich ciążach może spowodować zmniejszenie liczby potwierdzających procedur inwazyjnych o 89%<sup>6</sup>.

Biorąc pod uwagę znaczne zmniejszenie liczby wyników badań fałszywie dodatnich w przypadku NIPT w porównaniu z konwencjonalnymi badaniami przesiewowymi uwzględniającymi dużą liczbę markerów, wiele profesjonalnych organizacji medycznych wydało opinie wspierające kilka wskazań do stosowania NIPT.

W szczególności Międzynarodowe Towarzystwo Diagnostyki Prenatalnej, Amerykańskie Kolegium Położników i Ginekologów (ACOG) / Towarzystwo Medycyny Matczyno-Płodowej (SMFM), Amerykańskie Kolegium Genetyki Medycznej i Genomiki (ACMG) oraz Europejskie Towarzystwo Genetyki Człowieka / Amerykańskie Towarzystwo Genetyki Człowieka popierają proponowanie NIPT wszystkim ciężarnym<sup>7,8,9</sup>. Zaleca się poradę przed testem, uzyskanie świadomej zgody i wykonanie testów diagnostycznych w celu potwierdzenia pozytywnego wyniku badania przesiewowego cfDNA<sup>4</sup>.

VeriSeq NIPT Solution v2 to nieinwazyjny test diagnostyczny in vitro (IVD), który wykorzystuje sekwencjonowanie całego genomu fragmentów cfDNA pochodzących z próbek obwodowej krwi pełnej matki pobranych od kobiet ciężarnych w co najmniej 10. tygodniu ciąży. Test umożliwia wykonywanie dwóch typów badań przesiewowych: podstawowego i obejmującego cały genom. Podstawowe badanie dostarcza informacji na temat stanu aneuploidii chromosomów 21, 18, 13, X i Y. Badania przesiewowe całego genomu dostarczają informacji o częściowych duplikacjach i delecjach dla wszystkich autosomów oraz o stanie aneuploidii dla wszystkich chromosomów. Oba rodzaje badań przesiewowych umożliwiają zgłaszanie aneuploidii chromosomów płci (SCA) z podaniem płci płodu lub bez. Opcję zgłaszania SCA można wyłączyć. Jeśli opcja zgłaszania SCA jest wyłączona, informacje na temat płci płodu również nie są podawane. Więcej informacji na temat opcji raportowania płci można znaleźć w *Przewodniku użytkownika oprogramowania VeriSeq NIPT Solution v2* (nr dokumentu: 1000000067940).

## Zasady dotyczące procedury

VeriSeq NIPT Solution v2 to automatyczne rozwiązanie do przeprowadzania badań NIPT w warunkach laboratoryjnych, które obejmuje automatyczne przygotowanie próbki i analizę danych sekwencjonowania. Zestawy do przygotowania próbek VeriSeq NIPT Sample Preparation Kit to specjalistyczne, jednorazowe odczynniki stosowane w połączeniu z platformą VeriSeq NIPT Microlab STAR do przygotowania 24-, 48- lub 96-próbkowych partii do sekwencjonowania nowej generacji. Dane z sekwencjonowania sparowanych końców w całym genomie są analizowane za pomocą specjalistycznego oprogramowania VeriSeq NIPT Assay Software v2, które generuje raport zawierający wyniki jakościowe.

Procedura składa się z następujących etapów: pobranie próbki, izolacja osocza, ekstrakcja cfDNA, przygotowanie biblioteki, kwantyfikacja biblioteki, pulowanie biblioteki, sekwencjonowanie i analiza, które zostały opisane bardziej szczegółowo poniżej.

- **Pobranie próbki** — 7–10 ml obwodowej krwi pełnej matki pobiera się do probówki Streck do pobierania krwi w celu oznaczenia pozakomórkowego DNA (probówka BCT), która zapobiega lizie komórek i skażeniu genomu oraz stabilizuje krew pełną.
- **Izolacja osocza** — w ciągu 5 dni od pobrania osocze jest izolowane z obwodowej krwi pełnej matki za pomocą standardowych technik wirowania. Platforma VeriSeq NIPT Microlab STAR aspiruje i dozuje osocze do płytki z 96 głębokimi dołkami w celu późniejszego przetworzenia. Jeśli wymagane jest ponowne oznaczenie, próbki po przetworzeniu można ponownie zamknąć i przechowywać w temperaturze 4°C przez kolejne 5 dni (łącznie nie więcej niż 10 dni od pobrania krwi).

**PRZESTROGA**

Przekroczenie wspomnianych powyżej czasów przechowywania może negatywnie wpłynąć na wskaźniki niepowodzeń poszczególnych próbek.

- **Ekstrakcja cfDNA** — oczyszczanie cfDNA z osocza osiąga się poprzez adsorpcję na płytce do izolacji, wypłukanie płytki do izolacji w celu usunięcia zanieczyszczeń oraz elucję.
- **Przygotowanie biblioteki** — oczyszczone fragmenty cfDNA podlegają procesowi naprawy końców w celu przekształcenia lepkich końców 5' i 3' w tępe końce. Następnie do końców 3' dodawany jest nukleotydy deoksyadenozynowy, aby utworzyć lepki koniec składający się z jednej zasady. Indeksowane adaptory zawierające lepki koniec składający się z jednej zasady 3' deoksytymidyny są ligowane do przetworzonych fragmentów cfDNA. Zligowany DNA jest oczyszczany za pomocą kulek do odwracalnej immobilizacji w fazie stałej. Każda próbka w zestawie 24, 48 lub 96 otrzymuje unikalny indeksowany adapter. Adaptory są stosowane w 2 celach:

**PRZESTROGA**

Należy zachować najwyższą ostrożność, aby nie dopuścić do zanieczyszczenia krzyżowego indeksów, ponieważ może to prowadzić do niepoprawnych wyników.

- Indeksy umożliwiają identyfikację próbki podczas późniejszego sekwencjonowania.
- Adaptory indeksowane umożliwiają uchwycenie biblioteki na stałej powierzchni komory przepływowej do sekwencjonowania w celu wygenerowania klastra i późniejszego sekwencjonowania.
- **Kwantyfikacja** — produkt biblioteki jest oznaczany ilościowo za pomocą barwnika fluorescencyjnego o stężeniu określonym przez porównanie z krzywą wzorcową DNA.
- **Pulowanie biblioteki i sekwencjonowanie** — biblioteki próbek są łączone w pule po 24 lub 48 próbek w dostosowanych ilościach, aby zminimalizować zmienność pokrycia. Każda pula jest następnie sekwencjonowana za pomocą systemu sekwencjonowania nowej generacji.
- VeriSeq NIPT Solution v2 nie obejmuje sprzętu do sekwencjonowania ani materiałów eksploatacyjnych.
- **Analiza** — w przypadku każdej próbki analiza obejmuje następujące elementy:
  - Identyfikacja fragmentów biblioteki według sekwencji indeksowej i zgodności odczytów sparowanych końców z ludzkim genomem referencyjnym.

- Oszacowanie płodowej frakcji biblioteki poprzez połączenie informacji z dystrybucji zarówno długości, jak i genomowych współrzędnych fragmentów biblioteki.
- Po uwzględnieniu znanych obciążeń systematycznych model statystyczny wykrywa regiony genomu, które są podreprezentowane lub nadreprezentowane w bibliotece w sposób zgodny z anomalią na oszacowanym poziomie frakcji płodowej.
- Raport NIPT dostarcza podsumowania wyników dla wybranego menu testu i zawiera wskazanie ANOMALY DETECTED (Wykryto anomalię) lub NO ANOMALY DETECTED (Nie wykryto anomalii) obok oszacowania frakcji płodowej dla próbek, które przeszły kontrolę jakości.
- Raport dodatkowy zawiera parametry ilościowe, które charakteryzują każdą wykrytą anomalię.

## Ograniczenia dotyczące procedury

### Ograniczenia oznaczenia

- Dowody potwierdzające czułość i swoistość testu obejmują ciążę pojedynczą i bliźnięta. Niniejsza instrukcja użycia nie zawiera danych na temat czułości i swoistości dla ciąż trojaczych ani ciąż mnogich wyższego rzędu.
- Test VeriSeq NIPT Solution v2 nie jest przeznaczony do wykrywania poliploidii, np. triploidii.
- Test VeriSeq NIPT Solution v2 nie jest przeznaczony do wykrywania zrównoważonych rearanżacji chromosomowych.
- Do oznaczenia wymagane są próbki obwodowej krwi pełnej od ciężarnej, pobrane nie wcześniej niż w 10. tygodniu ciąży.
- W przypadku podstawowych badań przesiewowych test VeriSeq NIPT Solution v2 wyszukuje swoiste zaburzenia chromosomalne. Wyniki podane jako NO ANOMALY DETECTED (Nie wykryto anomalii) nie wykluczają możliwości występowania zaburzeń chromosomalnych badanych chromosomów. Wynik ujemny nie wyklucza możliwości, że ciąża charakteryzuje się innymi zaburzeniami chromosomalnymi, chorobami genetycznymi lub wadami wrodzonymi (np. wada otwartej cewy nerwowej).
- W przypadku badań przesiewowych całego genomu stosunkowo duże delecje i duplikacje, które stanowią mniej niż 75% chromosomu, mogą zasadniczo wskazywać na aneuploidię całego chromosomu.
- W przypadku badań przesiewowych całego genomu pewne regiony są wykluczone z analizy. Lista takich wykluczonych regionów jest dostępna na stronie internetowej działu pomocy firmy Illumina. Wykrywanie anomalii genomowych jest wykonywane wyłącznie w regionach niewykluczonych.
- Raportowanie płci płodu jest niedostępne we wszystkich regionach, co wynika z lokalnych przepisów w sprawie raportowania płci.
- Na podstawie dowodów z literatury wiadomo, że wyniki badań przesiewowych wykonanych z użyciem pozakomórkowego DNA mogą być zakłócone przez pewne czynniki matczyne i płodowe. Niektóre z nich podano poniżej, ale nie jest to lista kompletna:
  - niedawna transfuzja krwi u matki,

- wcześniejszy przeszczep narządu u matki / przeszczep komórek macierzystych u matki,
- choroba autoimmunologiczna u matki,
- nowotwory u matki (łagodne i złośliwe),
- mozaicyzm u matki,
- zmienność liczby kopii u matki,
- mozaicyzm płodowo-łożyskowy / ograniczony mozaicyzm łożyskowy,
- zgon płodu / znikający bliźniak.

## Opracowanie raportu dotyczącego testu VeriSeq NIPT Solution v2

- VeriSeq NIPT Solution v2 to test przesiewowy i dlatego nie należy rozpatrywać go odrębnie od innych obserwacji klinicznych i wyników testów. Wniosków dotyczących stanu płodu ani decyzji dotyczących prowadzenia ciąży nie należy opierać wyłącznie na wynikach badania przesiewowego NIPT<sup>7</sup>.
- VeriSeq NIPT Solution v2 dostarcza następujących informacji:
  - Podstawowy test przesiewowy analizujący nadreprezentację chromosomów 13, 18 i 21.
  - Test przesiewowy całego genomu analizujący podreprezentację i nadreprezentację wszystkich autosomów, w tym częściowe delecje i duplikacje o wielkości co najmniej 7 Mb.
  - W przypadku ciąż pojedynczych, jeśli jako opcję raportowania płci wybrano Yes (Tak) lub SCA, zgłaszane są następujące nieprawidłowości chromosomów płci: X0, XXX, XXY oraz XYY.
  - W przypadku ciąż pojedynczych, jeśli jako opcję raportowania płci wybrano Yes (Tak), zgłaszana jest płć płodu.
  - Obecność chromosomu Y w przypadku ciąż bliźniaczych.

## Elementy produktu

Rozwiązanie VeriSeq NIPT Solution v2 składa się z następujących zestawów do przygotowania próbek:

- VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (24 samples) (nr kat. 20025895)
- VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (48 samples) (nr kat. 15066801)
- VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (96 samples) (nr kat. 15066802)

Rozwiązanie VeriSeq NIPT Solution v2 składa się z następujących komponentów oprogramowania:

- Oprogramowanie VeriSeq NIPT Assay Software v2 (nr kat. 20047024), zainstalowane fabrycznie na serwerze lokalnym VeriSeq Onsite Server v2.
  - Serwer lokalny VeriSeq Onsite Server v2 (nr kat. 20028403, 20047000, 20101927) lub istniejący serwer lokalny VeriSeq Onsite Server (nr kat. 15076164 lub nr kat. 20016240) zaktualizowany do wersji v2.
- Oprogramowanie VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 (nr kat. 20044988), zainstalowane fabrycznie na platformie VeriSeq NIPT Microlab STAR.

- Platforma VeriSeq NIPT Microlab STAR (nr kat. Hamilton Company Reno: 95475-01 (115 V) i 95475-02 (230 V), Hamilton Company Bonaduz: 806288).
- Moduł Local Run Manager VeriSeq NIPT (nr kat. 20044989)

## Odczynniki

### Dostarczane odczynniki

Firma Illumina dostarcza następujące odczynniki: zestaw do przygotowania próbek VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (24 samples) (nr kat. 20025895), zestaw do przygotowania próbek VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (48 samples) (nr kat. 15066801) oraz zestaw do przygotowania próbek VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (96 samples) (nr kat. 15066802). Zestawy VeriSeq NIPT do przygotowania próbek są skonfigurowane do użytku z platformą VeriSeq NIPT Microlab STAR (ML STAR) (nr kat. 95475-01, 95475-02 lub 806288), która jest dostarczana przez firmę Hamilton Company.

### Zestaw do przygotowania próbek VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, zestaw ekstrakcyjny Extraction Box

Tabela 1 VeriSeq NIPT Extraction Box (24) i (48), nr kat. 20025869 i 15066803

Nazwa odczynnika na etykiecie	Liczba pojemników w zestawie	Składniki aktywne	Przechowywanie
Bufor do lizy	1	Chlorowodorek guanidyny w buforowanym roztworze wodnym	Od 15°C do 30°C
Bufor płuczący I	1	Chlorowodorek guanidyny i 2-propanol w buforowanym roztworze wodnym	Od 15°C do 30°C
Bufor płuczący II	1	Buforowany roztwór wodny zawierający sole	Od 15°C do 30°C
Bufor elucyjny	1	Buforowany roztwór wodny	Od 15°C do 30°C
Bufor dla proteiny	1	Glicerol w buforowanym roztworze wodnym	Od 15°C do 30°C
Proteinaza K	3	Liofilizowana proteinaza K	Od 15°C do 30°C

Tabela 2 VeriSeq NIPT Extraction Box (96), nr kat. 15066807

Nazwa odczynnika na etykiecie	Liczba pojemników w zestawie	Składniki aktywne	Przechowywanie
Bufor do lizy	1	Chlorowodorek guanidyny w buforowanym roztworze wodnym	Od 15°C do 30°C
Bufor płuczący I	1	Chlorowodorek guanidyny i 2-propanol w buforowanym roztworze wodnym	Od 15°C do 30°C
Bufor płuczący II	2	Buforowany roztwór wodny zawierający sole	Od 15°C do 30°C
Bufor elucyjny	1	Buforowany roztwór wodny	Od 15°C do 30°C
Bufor dla proteinyzy	1	Glicerol w buforowanym roztworze wodnym	Od 15°C do 30°C
Proteinaza K	4	Liofilizowana proteinaza K	Od 15°C do 30°C

### Zestaw do przygotowania próbek VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, zestaw do przygotowania biblioteki Library Prep Box

Tabela 3 VeriSeq NIPT Library Prep Box (24) i (48), nr kat. 20026030 i 15066809

Nazwa odczynnika na etykiecie	Liczba pojemników w zestawie	Składniki aktywne	Przechowywanie
Mieszanina do naprawy końców	1	Polimeraza DNA i dNTP w buforowanym roztworze wodnym	Od -25°C do -15°C
Mieszanina do tworzenia ogona poli-A	1	Polimeraza DNA i dATP w buforowanym roztworze wodnym	Od -25°C do -15°C
Mieszanina zawierająca ligazę	1	Ligaza DNA w buforowanym roztworze wodnym	Od -25°C do -15°C
Bufor hybrydizacyjny	1	Buforowany roztwór wodny	Od -25°C do -15°C
Płytki z adapterami DNA NIPT	1	Oligonukleotydy w buforowanym roztworze wodnym	Od -25°C do -15°C

Tabela 4 VeriSeq NIPT Library Prep Box (96), nr kat. 15066810

Nazwa odczynnika na etykiecie	Liczba pojemników w zestawie	Składniki aktywne	Przechowywanie
Mieszanka do naprawy końców	1	Polimeraza DNA i dNTP w buforowanym roztworze wodnym	Od -25°C do -15°C
Mieszanka do tworzenia ogona poli-A	2	Polimeraza DNA i dATP w buforowanym roztworze wodnym	Od -25°C do -15°C
Mieszanka zawierająca ligazę	2	Ligaza DNA w buforowanym roztworze wodnym	Od -25°C do -15°C
Bufor hybrydizacyjny	1	Buforowany roztwór wodny	Od -25°C do -15°C
Płytki z adapterami DNA NIPT	1	Oligonukleotydy w buforowanym roztworze wodnym	Od -25°C do -15°C

## Zestaw do przygotowania próbek VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, zestaw akcesoriów Accessory Box

Tabela 5 VeriSeq NIPT Accessory Box, nr kat. 15066811

Nazwa odczynnika na etykiecie	Liczba pojemników w zestawie	Składniki aktywne	Przechowywanie
Płytki do izolacji DNA	1	Mikropłytki z polipropylenu ze zmodyfikowaną membraną silikonową	Od 2°C do 8°C
Bufor do ponownego zawieszania (RSB)	1	Buforowany roztwór wodny	Od 2°C do 8°C
Kulki do oczyszczania próbki	1	Kulki paramagnetyczne fazy stałej w buforowanym roztworze wodnym	Od 2°C do 8°C
Odczynnik do kwantyfikacji DNA	1	Barwnik interkalujący DNA w DMSO	Od 2°C do 8°C
Standard kwantyfikacji DNA	1	Wzorzec dsDNA, nieswoiste DNA i azydek sodu w buforowanym roztworze wodnym	Od 2°C do 8°C



## Zestaw do przygotowania próbek VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, probówki proceduralne i etykiety Workflow Tubes and Labels

Tabela 6 Workflow Tubes and Labels, nr kat. 15071543

Nazwa elementu na etykiecie	Liczba elementów w zestawie	Przechowywanie
Etykieta (LBL) — kod kreskowy płytki	9	Od 15°C do 30°C
Etykieta (LBL) — kod kreskowy płytki z głębokimi dołkami	12	Od 15°C do 30°C
Probówka (TB) — pusta probówka puli	5	Od 15°C do 30°C

## Odczynniki niedostarczane

### Odczynniki wymagane, ale niedostarczane

- Odczynniki do sekwencjonowania i materiały eksploatacyjne wymagane do systemu sekwencjonowania nowej generacji (NGS)
- Certyfikowana woda pozbawiona DNazy/RNazy do zastosowań w biologii molekularnej
- Etanol, 100% (200 proof) do zastosowań w biologii molekularnej

**UWAGA** Etanol nieprzeznaczony do zastosowań w biologii molekularnej może mieć potencjalnie niekorzystny wpływ na działanie oznaczenia.

### Odczynniki opcjonalne i niedostarczane

- Sól fizjologiczna z buforem fosforanowym Dulbecco (DPBS) do kontroli ujemnej

## Przechowywanie i sposób postępowania

- 1 Temperaturę pokojową zdefiniowano jako 15°C do 30°C.
- 2 Wszystkie odczynniki nadają się do wykorzystania tylko raz. Po przygotowaniu odczynników należy niezwłocznie ich użyć.
- 3 Jeśli jakiegokolwiek opakowanie lub zawartość elementów VeriSeq NIPT Solution są uszkodzone lub ich jakość jest w jakikolwiek inny sposób pogorszona, należy skontaktować się z działem obsługi klienta firmy Illumina.
- 4 Odczynniki zachowują stabilność do terminu ważności podanego na etykietach zestawu pod warunkiem przechowywania zgodnie ze wskazaniem. Informacje na temat warunków przechowywania zawiera kolumna „Przechowywanie” w sekcji [Odczynniki](#). Nie należy używać odczynników po upływie ich terminu ważności.

- 5 Zmiany w fizycznym wyglądzie odczynników mogą wskazywać na pogorszenie się stanu materiałów. Jeśli wystąpią zmiany w wyglądzie fizycznym (np. oczywiste zmiany koloru odczynnika lub zmętnienie widoczne w wyniku skażenia mikrobiologicznego), odczynników nie należy używać.
- 6 Podczas pracy z kulkami do oczyszczania próbki należy przestrzegać następujących najlepszych praktyk.
  - Nigdy nie zamrażać kulek.
  - Przed użyciem odczekać, aż kulki osiągną temperaturę pokojową.
  - Bezpośrednio przed użyciem wymieszać kulki mieszadłem wirowym, aż będą dobrze zawieszane, a ich kolor będzie jednolity.
- 7 Bufor do lizy, bufor płuczący I, bufor płuczący II, bufor elucyjny oraz bufor dla proteiny mogą tworzyć widoczny osad lub kryształy. Przed użyciem wymieszać intensywnie mieszadłem wirowym, a następnie obejrzeć, aby upewnić się, że nie ma osadu.
- 8 Nigdy nie należy zamrażać pobranej krwi pełnej.
- 9 Sekwencjonowanie bibliotek należy wykonać jak najszybciej po pulowaniu. Pule bibliotek zachowują stabilność do 7 dni w temperaturze od -25°C do -15°C. Dodatkowa denaturacja nie jest wymagana w przypadku przechowywania przez wskazany okres we wskazanych warunkach.

## Sprzęt i materiały

### Sprzęt i materiały wymagane, ale niedostarczane

#### Sprzęt wymagany, ale niedostarczany

Wyposażenie	Dostawca
System sekwencjonowania nowej generacji (NGS) z następującymi funkcjami: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sekwencjonowanie w trybie sparowanych końców 2 × 36 bp</li> <li>• Zgodność z adapterami podwójnie indeksowanymi z zestawu do przygotowania próbek VeriSeq NIPT Sample Prep Kit</li> <li>• Automatyczne tworzenie plików BCL</li> <li>• Dwukanałowa analiza biochemiczna</li> <li>• 400 milionów odczytów w trybie sparowanych końców na przebieg</li> <li>• Zgodny z oprogramowaniem VeriSeq NIPT Assay Software v2 lub systemem sekwencjonowania NextSeq 550Dx Sequencing System.</li> </ul>	Dostawca aparatu lub Illumina, nr kat. 20005715
Zamrażarka, od -25°C do -15°C	Ogólny dostawca laboratoryjny

Wyposażenie	Dostawca
Mikrowirówka	Ogólny dostawca laboratoryjny
Pipeta pomocnicza	Ogólny dostawca laboratoryjny
Chłodziarka, od 2°C do 8°C	Ogólny dostawca laboratoryjny
Pipety jednokanałowe 20 µl	Ogólny dostawca laboratoryjny
Pipety jednokanałowe 200 µl	Ogólny dostawca laboratoryjny
Pipety jednokanałowe 1000 µl	Ogólny dostawca laboratoryjny
Mieszadło wirowe	Ogólny dostawca laboratoryjny
Wirówka i rotor do próbek do pobierania krwi	
Odpowiednik: <ul style="list-style-type: none"> <li>Wirówka z chłodzeniem, 1600 × g, z opcją bez hamulca</li> <li>Rotor wychylny na kosze, z koszami</li> <li>Wkładki do koszy o głębokości co najmniej 76 mm</li> <li>Wsuwane adaptery na próbki do pobierania krwi, 16 mm x 100 mm</li> </ul>	Ogólny dostawca laboratoryjny
Zalecane: <ul style="list-style-type: none"> <li>Wirówka Allegra X12R Series Centrifuge, 1600 × g</li> <li>Rotor Allegra Centrifuge GH-3.8 z koszami</li> <li>Oslony kosza do wirówek Allegra, dwie w zestawie</li> <li>Zespół adaptera do wirówki Allegra, 16 mm, cztery sztuki w zestawie</li> </ul>	Beckman Coulter, nr kat. 392304 (120 V lub 230 V)
	Beckman Coulter, nr kat. 369704
	Beckman Coulter, nr kat. 392805
	Beckman Coulter, nr kat. 359150
Wirówka i rotor do mikroplacytek	
Odpowiednik: <ul style="list-style-type: none"> <li>Wirówka 5600 × g</li> <li>Rotor wychylny na płytki z uchwytami na płytki z 96 dołkami, minimalna głębokość: 76,5 mm</li> <li>Multifuge X4 Pro-MD 120 V TX-1000BT</li> <li>Wirówka Sorvall Legend XTR Centrifuge</li> </ul>	Ogólny dostawca laboratoryjny
	Thermo Fisher Scientific, nr kat. 75016034
	Thermo Fisher Scientific, nr kat. 75004521 (120 V) lub nr kat. 75004520 (230 V)

Wyposażenie	Dostawca
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rotor do mikroplatek HIGHPlate 6000 Microplate Rotor</li> <li>• Rotor do płytek High Plate 6000</li> </ul> Podstawka na mikroplatetki <ul style="list-style-type: none"> <li>• Zalecane:               <ul style="list-style-type: none"> <li>• Podstawka MicroAmp z 96 dołkami</li> <li>• Uchwyt na płytce PCR z 96 dołkami</li> </ul> </li> </ul>	Thermo Fisher Scientific, nr kat. 75003606 Thermo Scientific VWR, nr kat. 97040-244  Thermo Fisher Scientific, nr kat. 4379590 Thermo Fisher Scientific, nr kat. AB-0563/1000
Jeden z następujących czytników mikroplatek (fluorometr), lub równoważny, z oprogramowaniem SoftMax Pro w wersji od 6.2.2 do 7.1.2: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Gemini XPS</li> <li>• SpectraMax M2, M3, M4 i M5.               <ul style="list-style-type: none"> <li>• Do czytnika mikroplatek wymagana jest fioletowa wkładka do użycia w procedurze.</li> </ul> </li> </ul>	Molecular Devices, nr kat. XPS Molecular Devices, nr kat. M2, M3, M4 i M5
SpectraMax High-Speed USB, adapter szeregowy	Molecular Devices, nr kat. 9000-0938
Termocykler o następujących cechach: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Podgrzewana pokrywa</li> <li>• Zakres temperatur: od 4°C do 98°C</li> <li>• Dokładność pomiaru temperatury: ±2°C</li> <li>• Minimalna szybkość spadku/przyrostu temperatury: 2°C na sekundę</li> <li>• Zgodny z płytką PCR Twin.tec z 96 dołkami, z wysoką ramką boczną</li> </ul>	Ogólny dostawca laboratoryjny
VeriSeq NIPT Microlab STAR	Hamilton, nr kat. 95475-01 (115 V), nr kat. 95475-02 (230 V) lub nr kat. 806288 (Hamilton Company Bonaduz)
Serwer lokalny VeriSeq Onsite Server v2 lub ulepszona wersja serwera lokalnego VeriSeq Onsite Server	illumina, nr kat. 20028403 lub 20047000 (v2) lub 20101927 lub nr kat. 15076164 lub nr kat. 20016240 (ulepszona wersja)
W przypadku korzystania z systemu sekwencjonowania NextSeq 550Dx Sequencing System: <ul style="list-style-type: none"> <li>• NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5, 75 cycles</li> </ul>	illumina, nr kat. 20028870

## Sprzęt opcjonalny i niedostarczony

Wyposażenie	Dostawca
System zdejmowania korków Pluggo	LGP Consulting, nr kat. 4600 4450

Wyposażenie	Dostawca
Fluorescencyjna płytko walidacyjna SpectraMax SpectraTest FL1	Molecular Devices, nr kat. 0200-5060
Mieszadło/rotator probówek, probówki 15 ml, 40 obr./min, 100–240 V	Thermo Scientific, nr kat. 88881001 (USA) lub 88881002 (UE)

## Materiały wymagane, ale niedostarczane

Materiał eksploatacyjny	Dostawca
Przewodzące niesterylne końcówki filtrujące 1000 µl	Hamilton, nr kat. 235905
Przewodzące niesterylne końcówki filtrujące 300 µl	Hamilton, nr kat. 235903
Przewodzące niesterylne końcówki filtrujące 50 µl	Hamilton, nr kat. 235948
Zbiornik z głębokimi dołkami o następujących cechach: <ul style="list-style-type: none"> <li>Format mikropłytek SLAS 1–2004 z 96 dołkami z dnem w kształcie piramidy lub stożka i minimalną pojemnością 240 ml.</li> <li>Polipropylen o niskim potencjale tworzenia wiązań z DNA na wszystkich powierzchniach kontaktowych stykających się z próbką.</li> <li>Wymiary wewnętrzne (poziom cieczy) są zgodne z automatycznymi etapami aspiracji i dozowania platformy VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>Wysokości są zgodne z automatycznymi ruchami platformy VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> </ul>	Ogólny dostawca laboratoryjny  Zgodne zbiorniki: <ul style="list-style-type: none"> <li>Corning Axygen, nr kat. RES-SW96-HP-SI</li> <li>Agilent, nr kat. 201246-100</li> </ul>
Rynienka na odczynniki o następujących cechach: <ul style="list-style-type: none"> <li>Rynienka, którą można bezpiecznie i bez użycia siły umieścić w nośniku VeriSeq NIPT Microlab STAR, ze stożkowym dnem i minimalną pojemnością 20 ml.</li> <li>Polipropylen niezawierający RNazy/DNazy.</li> <li>Gdy używane są objętości odczynników z oznaczenia, wymiary wewnętrzne zbiornika (poziom cieczy) zapewniają taki poziom cieczy, który jest zgodny z automatycznymi etapami aspiracji i dozowania platformy VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>Wysokości są zgodne z automatycznymi ruchami platformy VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> </ul>	Zgodne pojemniki: <ul style="list-style-type: none"> <li>Illumina, rynienka na odczynniki Illumina Reagent Tub, nr kat. 20095418</li> </ul>

Materiał eksploatacyjny	Dostawca
<p>Płytki z głębokimi dołkami o następujących cechach:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Format mikroplatek SLAS 1–2004, 3–2004 oraz 4–2004 z 96 dołkami z dnem w kształcie piramidy lub stożka i minimalną pojemnością dołka 2 ml.</li> <li>• Przezroczysty polipropylen o niskim potencjale tworzenia wiązań z DNA na wszystkich powierzchniach kontaktowych stykających się z próbką.</li> <li>• Wymiary dołka zapewniają taki poziom cieczy, który jest zgodny z automatycznymi etapami aspiracji i dozowania platformy VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Ramka boczna, która umożliwia umieszczenie kodów kreskowych płytki, w przypadku których wymagane jest przywieranie do bezpiecznej, płaskiej powierzchni.</li> <li>• Ramka odporna na moment obrotowy, która może wytrzymywać przyspieszenie co najmniej 5600 × g.</li> <li>• Wysokość płytki jest zgodna z automatycznymi ruchami platformy VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> </ul>	<p>Ogólny dostawca laboratoryjny</p> <p>Zgodne płytki:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Eppendorf, nr kat. 0030505301</li> <li>• Eppendorf, nr kat. 30502302</li> <li>• USA Scientific, nr kat. 1896-2000</li> </ul>
<p>Płytki z 384 dołkami o następujących cechach:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mikroplatek z 384 dołkami, dostosowana do małych objętości, o minimalnej pojemności dołka 50 µl.</li> <li>• Czarny, nieprzejrysty i nieprzepuszczający światła polistyren o niskim potencjale tworzenia wiązań z DNA na wszystkich powierzchniach kontaktowych stykających się z próbką.</li> <li>• Wymiary dołka zapewniają poziomy cieczy zgodne z automatycznymi etapami aspiracji i dozowania platformy VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Wysokość płytki jest zgodna z automatycznymi ruchami platformy VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Ramka boczna, która umożliwia umieszczenie kodów kreskowych płytki, w przypadku których wymagane jest przywieranie do bezpiecznej, płaskiej powierzchni.</li> </ul>	<p>Ogólny dostawca laboratoryjny</p> <p>Zgodne płytki:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Corning, nr kat. 3820</li> </ul>

Materiał eksploatacyjny	Dostawca
<p>Płytką z 96 dołkami o następujących cechach:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mikro płytką z ramką odporną na moment obrotowy, która może wytrzymać przyspieszenie co najmniej <math>5600 \times g</math>, i 96 przezroczystymi dołkami z dnem stożkowym, podniesionymi krawędziami i minimalną pojemnością dołka 150 <math>\mu\text{l}</math>.</li> <li>• Niezawierający RNazy/DNazy polipropylen o niskim potencjale tworzenia wiązań z DNA na wszystkich powierzchniach kontaktowych stykających się z próbką.</li> <li>• Wymiary dołka zapewniają poziomy cieczy zgodne z automatycznymi etapami aspiracji i dozowania platformy VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Wysokość płytki jest zgodna z automatycznymi ruchami platformy VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> </ul> <p><b>UWAGA:</b> Zgodne akcesoria z tworzyw sztucznych, ale o innych numerach części — na przykład zgodne płytki 96-dołkowe innych producentów, mogą nie stanowić odpowiedniego zamiennika bez właściwej dla części kalibracji systemu VeriSeq NIPT Microlab STAR przez personel działu serwisowego i wsparcia firmy Illumina. Aby stosować zamiennie akcesoria z tworzyw sztucznych, należy skontaktować się z zespołem wsparcia firmy Illumina.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ramka boczna, która umożliwia umieszczenie kodów kreskowych płytki, w przypadku których wymagane jest przywieranie do bezpiecznej, płaskiej powierzchni.</li> <li>• Zgodne z termocyklerami do denaturacji.</li> </ul>	<p>Ogólny dostawca laboratoryjny</p> <p>Zgodne płytki:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Eppendorf, nr kat. 0030129512</li> <li>• Eppendorf, nr kat. 30129580</li> <li>• Eppendorf, nr kat. 30129598</li> <li>• Eppendorf, nr kat. 30129660</li> <li>• Eppendorf, nr kat. 30129679</li> <li>• Bio-Rad, nr kat. HSP9601</li> </ul>
<p>Jedna z następujących uszczelek:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Folia Microseal typu „F”</li> <li>• Uszczelki foliowe</li> </ul>	<p>Bio-Rad, nr kat. MSF1001 Beckman Coulter, nr kat. 538619</p>
<p>Probówki Cell-Free DNA BCT CE</p>	<p>Streck, nr kat. 218997</p>
<p>Zatyczki</p>	<p>Sarstedt, nr kat. 65.802</p>
<p>Probówki o pojemności 2 ml, z zakrętką</p>	<p>Ogólny dostawca laboratoryjny</p>
<p>Końcówki z filtrem 20 <math>\mu\text{l}</math> do pipetora 20 <math>\mu\text{l}</math></p>	<p>Ogólny dostawca laboratoryjny</p>
<p>Końcówki z filtrem 200 <math>\mu\text{l}</math> do pipetora 200 <math>\mu\text{l}</math></p>	<p>Ogólny dostawca laboratoryjny</p>
<p>Końcówki z filtrem 1000 <math>\mu\text{l}</math> do pipetora 1000 <math>\mu\text{l}</math></p>	<p>Ogólny dostawca laboratoryjny</p>

Materiał eksploatacyjny	Dostawca
Odpowiednik: <ul style="list-style-type: none"> <li>Szybko działający spray dezynfekujący na bazie alkoholu</li> <li>Roztwór środka dezynfekującego</li> </ul> Zalecane: <ul style="list-style-type: none"> <li>Woda dejonizowana i alkohol 70%</li> </ul>	Ogólny dostawca laboratoryjny

## Materiały opcjonalne i niedostarczane

Materiał eksploatacyjny	Dostawca
Sól fizjologiczna z buforem fosforanowym Dulbecco (DPBS) do kontroli ujemnej	Ogólny dostawca laboratoryjny
Probówka z zakrętką, 10 ml (tylko do próbek kontrolnych)	Sarstedt, nr kat. 60.551
Probówka z zakrętką, 50 ml	Ogólny dostawca laboratoryjny
Pipety serologiczne 25 ml	Ogólny dostawca laboratoryjny
Pipety serologiczne 10 ml	Ogólny dostawca laboratoryjny

## Pobieranie, transport i przechowywanie próbek



### PRZESTROGA

Wszelkie próbki należy traktować jako potencjalnie zakaźne.

- Próbki krwi pełnej o wielkości 7–10 ml należy pobierać do probówek Streck do pobierania krwi w celu oznaczenia pozakomórkowego DNA (probówek BCT). Nie zamrażać.
- Krew pełną należy transportować zgodnie ze wszystkimi obowiązującymi przepisami w zakresie transportu czynników etiologicznych. Zaleca się korzystanie z metod przyspieszonej wysyłki/transportu.
- Podczas transportu przechowywać w temperaturze od 4°C do 30°C. Otrzymane próbki przechowywać w temperaturze od 2°C do 8°C do momentu, gdy wszystko będzie gotowe do dalszych czynności. Czas pomiędzy pobraniem krwi a wstępną izolacją osocza nie powinien przekraczać 5 dni.
- Jeśli wymagane jest ponowne oznaczenie, próbki po przetworzeniu można ponownie zamknąć i przechowywać w temperaturze 4°C przez kolejne 5 dni (łącznie nie więcej niż 10 dni od pobrania krwi).



### PRZESTROGA

Narażenie na zbyt wysokie temperatury powyżej wspomnianych zakresów może negatywnie wpłynąć na odsetek niepowodzeń i/lub wydajność poszczególnych próbek.



## Ostrzeżenia i środki ostrożności

- Ten test zawiera proteinazę K. Wdychanie, połknięcie, kontakt ze skórą i oczami mogą powodować uszczerbek na zdrowiu. Odczynniki należy stosować w dobrze wentylowanych pomieszczeniach, należy unikać wdychania pyłu, nosić odzież ochronną, a pojemniki i nieużytą zawartość należy utylizować zgodnie z rządowymi normami bezpieczeństwa w kraju użytkowania.
- Ten test zawiera chlorowodorek guanidyny. Wdychanie, połknięcie, kontakt ze skórą i oczami mogą powodować uszczerbek na zdrowiu. Odczynniki należy stosować w dobrze wentylowanych pomieszczeniach, nosić odzież ochronną, a pojemniki i nieużytą zawartość należy utylizować zgodnie z rządowymi normami bezpieczeństwa w kraju użytkowania.
- Ten test zawiera 2-propanol — łatwopalną substancję chemiczną. Trzymać z dala od źródeł ciepła i otwartego ognia. Wdychanie, połknięcie, kontakt ze skórą i oczami mogą powodować uszczerbek na zdrowiu. Odczynniki należy stosować w dobrze wentylowanych pomieszczeniach, nosić odzież ochronną, a pojemniki i nieużytą zawartość należy utylizować zgodnie z rządowymi normami bezpieczeństwa w kraju użytkowania.
- Ten test zawiera dimetylosulfotlenek — żrącą i łatwopalną ciecz. Wdychanie, połknięcie, kontakt ze skórą i oczami mogą powodować uszczerbek na zdrowiu. Odczynniki należy stosować w dobrze wentylowanych pomieszczeniach, nosić odzież ochronną, a pojemniki i nieużytą zawartość należy utylizować zgodnie z rządowymi normami bezpieczeństwa w kraju użytkowania.
- Aby zapobiec powstawaniu szkodliwych gazów, nie wolno wyrzucać odpadów po ekstrakcji cfDNA (zawierają chlorowodorek guanidyny) razem z odpadami zawierającymi wybielacz (podchloryn sodu).
- Wszelkie próbki należy traktować jako zawierające czynniki potencjalnie zakaźne.
- Należy przestrzegać środków ostrożności dotyczących rutynowych badań laboratoryjnych. Nie należy pipetować ustami. Nie należy jeść, pić ani palić tytoniu w wyznaczonych obszarach roboczych. Podczas posługiwania się próbkami i odczynnikami testowymi należy nosić jednorazowe rękawice i fartuchy laboratoryjne. Po zakończeniu posługiwania się próbkami i odczynnikami testowymi należy dokładnie umyć ręce.
- Nie należy używać żadnego ze składników testu po upływie terminu ważności podanego na etykiecie umieszczonej na opakowaniu testu. Nie należy mieszać składników testów z różnych partii. Numer partii testu znajduje się na etykiecie umieszczonej na opakowaniu testu. Składniki testu należy przechowywać w określonej temperaturze.
- Aby zapobiec degradacji próbki lub odczynnika, przed rozpoczęciem protokołu należy upewnić się, czy opary podchlorynu sodu z czyszczenia całkowicie się rozproszyły.
- Nieprzestrzeganie przedstawionych procedur może powodować błędy w wynikach lub znaczne obniżenie jakości próbek.
- Wszelkie poważne incydenty związane z tym produktem należy niezwłocznie zgłaszać do firmy Illumina i właściwych organów państw członkowskich, w których użytkownik ma siedzibę i/lub w których mieszka pacjent.

- Informacje dotyczące ochrony środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa zawiera karta charakterystyki (SDS) dostępna na stronie [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html).

## Uwagi dotyczące procedury

### Unikanie skażenia

- Należy używać nowych końcówek i świeżych laboratoryjnych materiałów eksploatacyjnych.
- Używać końcówek z filtrem, aby zmniejszyć ryzyko przeniesienia i zanieczyszczenia krzyżowego między próbkami.
- Ze względu na ryzyko zanieczyszczenia należy upewnić się, że zawartość dołka nie wypływa poza dołek. Nie rozlewać zawartości dołka. Wirować po każdym etapie mieszania mieszadłem wirowym.
- Przestrzegać obowiązujących przepisów dotyczących właściwej praktyki laboratoryjnej i higieny podczas obchodzenia się z krwią i produktami krwiopochodnymi.
- Podczas przygotowywania biblioteki nie należy stosować wybielaczy w aerozolu. Zanieczyszczenie śladową ilością wybielacza może prowadzić do niepowodzenia oznaczenia.
- Podczas rozpierania płytki należy ją umieścić na płaskiej, stabilnej powierzchni, na której płytka będzie stabilnie spoczywać. Uszczelnienie należy zdejmować powoli, upewniając się, że nie styka się ono z odsłoniętymi dołkami. Zachować ostrożność, aby nie dotknąć odsłoniętych dołków i nie zaburzać zawartości. Zanieczyszczenie krzyżowe na skutek przeniesienia zawartości między dołkami może spowodować nieprawidłowe wyniki.

### Czyszczenie platformy VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Przed użyciem należy sprawdzić, czy platforma stacji jest czysta. Konserwację urządzenia należy wykonać co najmniej raz w tygodniu. Należy postępować zgodnie z poniższymi instrukcjami czyszczenia.
- Zdemontować wszystkie nośniki, które można wyjąć ze stacji, po czym wyczyścić je szybko działającym środkiem dezynfekującym na bazie alkoholu w sprayu, wodą dejonizowaną i 70% etanolem, a następnie zostawić do wyschnięcia. Jeżeli nośniki są mocno zabrudzone, po oczyszczeniu należy namoczyć je w roztworze detergentu dezynfekującego, a następnie spłukać środkiem dezynfekującym na bazie alkoholu i pozostawić do wyschnięcia.
- Otworzyć pokrywę przednią i wytrzeć platformę szmatką nasączoną wodą dejonizowaną i 70% etanolem. Należy szczególnie dokładnie sprawdzić czystość klocków ślizgowych.
- Wyjąć kolektor podstawowego systemu próżniowego (BVS, Basic Vacuum System) i wytrzeć szmatką kolektor, uszczelkę i wewnętrzne przegrody BVS. Należy unikać czyszczenia uszczelki etanolem, ponieważ materiał stanie się podatny na uszkodzenia.
- Z głowicy CORE 96 i niezależnego kanału usunąć zużyte końcówki.

- Wyjąć i wyczyścić płytkę wyrzutnika końcówek z niezależnego kanału w stacji zużytych końcówek: rozpylić wodę dejonizowaną i 70% etanol bezpośrednio na powierzchnię płytki, a następnie wytrzeć. Założyć nowy worek foliowy na ramę i ponownie zamocować płytkę. Umieścić czystą płytkę wyrzutnika końcówek z powrotem na miejscu.
- Rozpylić wodę dejonizowaną i 70% etanol bezpośrednio na powierzchnię pojemnika i zsypu na odpady z głowicy CORE 96, a następnie wytrzeć do czysta.
  - Jeśli do powierzchni zużytych końcówek przylega materiał, który trudno jest usunąć, należy przecierać je szmatką zwilżoną wodą pozbawioną DNazy/RNazy aż do jego usunięcia. Zutylizować szmatkę w odpowiedni sposób. Następnie należy wykonać sterylizację środkiem dezynfekującym na bazie alkoholu.
- Zwilżyć niestrzępiącą się szmatkę lub wymazówkę etanolem o stężeniu 70%. Przetrzeć okienko skanera laserowego czytnika kodów kreskowych. Wyczyścić każdy dołek adaptera płytki CPAC, używając tej samej szmatki lub wymazówki. Jeżeli do czyszczenia użyto szmatki, należy ją wsuwać do każdego dołka adaptera, posługując się końcówką ołówka lub długopisu, aby upewnić się, że wewnątrz dołka zostało odpowiednio wyczyszczone.
- Oczyszczyć niezależne kanały:
  - Oczyszczyć tuleję do wysuwania końcówek znajdującą się na kanałach niezależnych (zewnętrzną część kanałów pipetujących), używając niestrzępiącej się szmatki nasączonej wodą dejonizowaną i 70% etanolem. (Patrz: *Instrukcja obsługi platformy Hamilton Microlab STAR, nr kat. 15070074*).
  - Wyczyścić tarczę blokującą i pierścienie typu o-ring głowicy pipetującej (zewnętrzna część kanałów pipetujących) niestrzępiącą się szmatką nasączoną wodą dejonizowaną i 70% etanolem.
- Czyszczenie głowicy CORE 96:
  - Niestrzępiącą się szmatką nasączoną wodą dejonizowaną i 70% etanolem wyczyścić obudowę głowicy 96 oraz spód tarcz blokujących.
  - Tą samą szmatką nasączoną wodą dejonizowaną i 70% etanolem lub jej oderwanym paskiem oczyścić przestrzenie po bokach kanałów pipetujących głowicy 96, aby wyczyścić pierścienie typu o-ring. Tę procedurę należy powtórzyć w każdym kanale pipetującym głowicy 96.
- Na pokrywę przednią i boczną rozpylić wodę dejonizowaną i 70% etanol, po czym wytrzeć do sucha.
- Taśmę zabezpieczającą podczas automatycznego wysuwania wyczyścić szmatką nasączoną wodą dejonizowaną i 70% etanolem, a następnie wytrzeć bez wywierania nacisku.
- Zamontować nośniki, kiedy platforma i elementy będą całkowicie suche.

**UWAGA** Niewłaściwe czyszczenie i konserwacja stacji ML STAR może być przyczyną zanieczyszczeń krzyżowych i nieprawidłowych wyników testu.

## Kontrola jakości

Materiał kontrolny o znanej charakterystyce działania może być oceniany w celu wykrycia różnic w przetwarzaniu i procedurach technicznych w laboratorium.

Wykonanie analizy próbki kontrolnej lub kontroli ujemnej zmniejsza łączną liczbę nieznanych próbek matki, które mogą zostać przetworzone w ramach każdego przygotowania próbek.

Nie przekraczać liczby dwóch próbek NTC na partię 24 lub 48 próbek bądź czterech próbek NTC na partię 96 próbek.

## Instrukcja użytkowania

### Porady i techniki

O ile w protokole nie wyszczególniono punktu bezpiecznego przerwania oznaczeń, należy natychmiast przejść do następnego etapu.

#### Znakowanie płytek kodem kreskowym

- Kody kreskowe płytek z wysoką ramką boczną zaczynają się od liter PL.
- Kody kreskowe płytek głębokodołkowych zaczynają się od liter DW.
- Na płytkach z wysoką ramką boczną oraz płytkach głębokodołkowych kody kreskowe umieszcza się na boku, obok kolumny 12.
- Załadować płytki kodem kreskowym skierowanym w prawą stronę, aby umożliwić automatyczne skanowanie.

#### Pieczętownanie i rozpieczętowanie płytki

- Należy zachować najwyższą ostrożność, aby nie dopuścić do zanieczyszczeń krzyżowych — na spodzie uszczelnienia nie powinien być widoczny żaden płyn.
  - Upewnić się, że odsłonięty spód uszczelnienia nie styka się z odsłoniętymi dołkami.
  - Zachować ostrożność, aby nie dotykać odsłoniętych dołków.
- Należy zawsze zapieczętować płytkę 96-dołkową przed wykonaniem następujących etapów w protokole:
  - Etapy wirowania
  - Etapy w termocyklerze
- Aby zapieczętować płytkę, należy nałożyć na nią uszczelnienie z folii, a następnie uszczelnić. Docisnąć uszczelnienie na całej płytce i upewnić się, że przywiera ono ciasno do każdego dołka.
- Przed rozpieczętowaniem płytki wykonać następujące czynności:
  - Krótco odwirowywać płytkę 96-dołkową z prędkością  $1000 \times g$  przez 20 sekund.
  - Umieścić płytkę na płaskiej powierzchni, a następnie powoli zdjąć uszczelnienie.

## VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Przed użyciem należy wykonać i udokumentować przeprowadzenie wymaganej konserwacji, zgodnie z instrukcją producenta.
- Monitorować działanie platformy ML STAR w trakcie wykonywania kroków automatycznych. Należy kontrolować, czy w interfejsie oprogramowania VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 nie pojawiają się komunikaty lub instrukcje dla operatora.
- Podczas pracy przednia pokrywa powinna być zamknięta.
- Podczas pracy w systemie nie mogą znajdować się żadne elementy.
- Jeśli podczas usuwania błędu pojawi się przycisk opcji **Exclude** (Wyklucz), w żadnych okolicznościach nie należy wybierać tej opcji. Jeśli nie można kontynuować metody po przeprowadzeniu procedury usuwania błędu, a opcje jego usuwania są ograniczone, należy przerwać przebieg.
- Jeśli podczas etapów podciśnieniowej obróbki próbek oprogramowanie VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 wyświetli stosowny komunikat, należy ręcznie wspomóc utworzenie uszczelnienia pomiędzy płytką a kolektorem próżniowym.
- Umożliwić systemowi automatyczne usuwanie końcówek z adaptera. Nie zdejmować końcówek ręcznie, chyba że oprogramowanie wyda takie polecenie.
- Usunąć zużyte odczynniki i materiały eksploatacyjne zgodnie z instrukcjami wyświetlanymi w oprogramowaniu Workflow Manager.
- Codziennie należy opróżniać butle próżniowe na odpady. Pierwsza butla zawsze powinna być wypełniona maksymalnie do połowy. Przelanie się odpadów próżniowych może uszkodzić pompę próżniową i zmniejszyć podciśnienie stosowane w systemie.
- Przed uruchomieniem metody załadować pełny statyw policzonych pojedynczo końcówek 8-kanałowych (dla partii 24, 48 i 96 próbek).

## Przetwarzanie próbek

### Procedura

- 1 Dla każdej podwielokrotności wykonać następujące czynności:
  - a. Próbkę oznaczoną kodem kreskowym odwirować z prędkością 1600 × g przez 10 minut w temperaturze 4°C przy wyłączonym hamulcu.
  - b. Wyjąć probówkę z próbkami, gdy wirówka całkowicie się zatrzyma.  
W ciągu 15 minut po odwirowaniu rozpocząć izolowanie osocza. Jeśli minie ponad 15 minut, odwirować jeszcze raz.
- 2 Sprawdzić każdą probówkę pod kątem odpowiedniości próbki, w tym sprawdzić, czy:
  - objętość próbki jest zgodna z oczekiwaną;
  - po wirowaniu widoczne jest wyraźne rozdzielenie warstwy krwinek czerwonych i osocza próbek;
  - poziom osocza sięga przynajmniej 1,5 ml powyżej kożuszka leukocyтарно-platekowego;

- próbka nie jest silnie zhemolizowana (tj. osocze nie jest ciemnoczerwone);
- próbka nie jest lipemiczna (tj. osocze nie jest mętno-białe lub mleczne);
- w próbce nie występują skrzepy.



### PRZESTROGA

Próbki, które były nieprawidłowo przechowywane lub z którymi obchodzono się w niewłaściwy sposób, mogą być nieodpowiednie. Jeśli podczas procedury przetworzone zostaną takie nieodpowiednie próbki, mogą one zapchać płytkę do izolacji podczas ekstrakcji i spowodować przelanie próbek do sąsiednich dołków.

- 3 Zdjąć zatyczki z probówek i załadować je do nośników. Załadować wszystkie próbki i kontrole osocza dla partii.



### PRZESTROGA

Jeśli po wystąpieniu błędu podczas procedury jego usuwania pojawi się opcja Exclude (Wyklucz), nie należy jej wybierać. Jeśli nie można kontynuować metody po przeprowadzeniu procedury usuwania błędu, a opcje jego usuwania są ograniczone, należy przerwać przebieg.

## Wyizolowanie osocza

### Przygotowanie

- 1 Oznaczyć 1 płytkę z głębokimi dołkami na osocze pośrednie i przykleić kod kreskowy.
- 2 Oznaczyć 1 płytkę z głębokimi dołkami na osocze końcowe i przykleić kod kreskowy.
- 3 Przed uruchomieniem metody załadować pełny statyw policzonych osobno końcówek 8-kanalowych (dla partii 24, 48 i 96 próbek).



### PRZESTROGA

Należy upewnić się, że użyto prawidłowego typu płytki na osocze pośrednie i osocze końcowe. Użycie zbiornika z głębokimi dołkami zamiast płytki z głębokimi dołkami prowadzi do amalgamacji próbek i może dawać nieprawidłowe wyniki.

### Procedura

- 1 Uruchomić oprogramowanie AppLauncher, a następnie wybrać opcję **VeriSeq NIPT Method** (Metoda VeriSeq NIPT).
- 2 Wprowadzić unikalny identyfikator partii i nazwę użytkownika, a następnie wybrać przycisk **OK**. Identyfikator partii może zawierać  $\leq 26$  znaków. Należy używać cyfr, liter, znaków podkreślenia (\_) lub myślników (-). Na przykład: 2025-10-16\_Batch3.  
W identyfikatorze partii nie są rozróżniane wielkości liter. Identyfikatory partii, w których rozróżniane są wielkości liter, nie są traktowane jako unikalne.

Nazwy partii muszą być unikalne i nie mogą różnić się tylko pod względem wielkości liter. Na przykład nazwy partii Batch01 i batch01 nie są unikalne. To samo dotyczy nazywania identyfikatorów próbek.

- 3 Wybrać opcję **New Batch** (Nowa partia).
- 4 Po uruchomieniu wybrać przycisk **OK**, aby rozpocząć izolowanie osocza.
- 5 Wybrać wielkość partii, a następnie wybrać przycisk **OK**.
- 6 Wybrać liczbę kontroli ujemnych (NTC), a następnie wybrać przycisk **OK**.  
Gniazda NTC są zawsze ostatnimi wybieranymi gniazdami. Na przykład jeżeli użyto dwóch NTC w serii 24 próbek, pozycje 23 i 24 to gniazda NTC.
- 7 Wykonać jeden z następujących kroków:
  - Aby załadować arkusz próbek, należy wybrać arkusz próbki powiązany z partią, a następnie wybrać przycisk **OK**.
  - Aby kontynuować bez wybierania arkusza próbki, należy wybrać opcję **No Sample Sheet** (Brak arkusza próbki).

Informacje na temat tworzenia arkusza próbki można znaleźć w *Przewodniku użytkownika oprogramowania VeriSeq NIPT Solution v2* (nr dokumentu: 1000000067940).

**UWAGA** Należy dokładnie zarejestrować typ każdej próbki, tj. próbkę z ciąży pojedynczej lub bliźniaczej, w celu zapewnienia prawidłowej analizy danych. W przypadku wybrania opcji **No Sample Sheet** (Brak arkusza próbki) należy upewnić się, że w narzędziach serwisowych oprogramowania Workflow Manager ustawiono domyślne wartości próbki. Więcej informacji można znaleźć w *Przewodniku użytkownika oprogramowania VeriSeq NIPT Solution v2* (nr dokumentu: 1000000067940).

- 8 Należy upewnić się, że wszystkie kody kreskowe są umieszczone we właściwym miejscu, a następnie załadować próbki, końcówki i płytki (z kodem kreskowym skierowanym w prawo) na nośnik.
- 9 Wybrać przycisk **OK** po każdym komunikacie o załadunku.

Wielkość partii próbek	Typ nośnika	Ścieżka	Element	Pozycja
24, 48, 96	Kończówka	7–12	Kończówki 1000 µl	5
			Kończówki 1000 µl (tylko partia 96 próbek)	4, 5
	Probówka	15	Przygotowane probówki z próbkami krwi 1–24 (dla wszystkich wielkości partii)	1–24
	Probówka	16	Przygotowane probówki z próbkami krwi 25–48 (tylko dla wielkości partii 48 i 96 próbek)	25–48
	Probówka	17	Przygotowane probówki z próbkami krwi 49–72 (tylko dla wielkości partii 96 próbek)	49–72
	Probówka	18	Przygotowane probówki z próbkami krwi 73–96 (tylko dla wielkości partii 96 próbek)	73–96
	Multiflex	19–24	Pusta płytka z głębokimi dołkami z osoczem końcowym — z kodem kreskowym	4
	Multiflex	19–24	Pusta płytka z głębokimi dołkami z osoczem pośrednim — z kodem kreskowym	5
	Odczynnik	47	<b>[Opcjonalnie]</b> Sól fizjologiczna z buforem fosforanowym Dulbecco (DPBS) — stosowana do kontroli ujemnej	5

- 10 Upewnić się, że nośniki, szkło laboratoryjne i odczynniki są poprawnie załadowane.
- 11 Na ekranie Pre-Spin Deck Verification (Sprawdzanie systemu przed wirowaniem) wybrać przycisk **OK**.
- 12 Obserwować działanie platformy ML STAR w trakcie wykonywania etapów automatycznych.
- 13 Po wyświetleniu komunikatu przez oprogramowanie Workflow Manager należy upewnić się, że nic nie zakłóca działania platformy załadunkowej ML STAR, aby umożliwić jej rozładunek nośników.
- 14 Wybrać opcję **Unload** (Rozładuj), aby rozładować platformę.
- 15 Wyjąć płytkę z głębokimi dołkami z osoczem pośrednim w sposób opisany poniżej.
  - a. Sprawdzić płytkę pod kątem jednakowych objętości w każdym dołku (braku błędów pipety). Oczekiwana objętość wynosi 1000 µl.
  - b. Zwrócić uwagę na wszelkie niezgodności i odnotować je po zakończeniu procedury izolacji osocza.
  - c. Zapieczętować płytkę, załadować przeciwwagę i wirować z prędkością 5600 × g przez 10 minut z wyłączonym hamulcem lub przy jego najniższym ustawieniu.
- 16 Wybrać **Yes** (Tak), aby przejść do przygotowania końcowego osocza.



17 Zdjąć uszczelnienie płytki i załadować płytkę na nośnik.

Wielkość partii próbek	Typ nośnika	Ścieżka	Element	Pozycja
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Płytką z głębokimi dołkami z osoczem pośrednim	5

18 Zaznaczyć pole wyboru **Intermediate Plasma plate has been spun** (Płytką z osoczem pośrednim została odwirowana), a następnie wybrać przycisk **OK**.

19 Obserwować działanie platformy ML STAR w trakcie wykonywania etapów automatycznych.

20 Po wyświetleniu komunikatu przez oprogramowanie Workflow Manager należy upewnić się, że nic nie zakłóca działania platformy załadunkowej ML STAR, aby umożliwić jej rozładunek nośników.

21 Wybrać opcję **Unload** (Rozładuj), aby rozładować platformę.

22 Po wyświetleniu komunikatu przez oprogramowanie Workflow Manager opróżnić nośniki i platformę.

23 Wyjąć płytkę z głębokimi dołkami z osoczem końcowym.

24 Sprawdzić płytkę pod kątem następujących błędów:

- niezgodnych objętości w każdym dołku; oczekiwanej objętości, która powinna wynosić 900 µl;
- widocznego osadu komórkowego;
- nadmiernej hemolizy.

W razie zaobserwowania widocznego osadu komórkowego lub nadmiernej hemolizy pod koniec metody izolacji osocza próbkę, której dotyczy problem, należy unieważnić lub użyć modułu Batch Manager (Menedżer partii). Więcej informacji na temat modułu Batch Manager (Menedżer partii) można znaleźć w *Przewodniku użytkownika oprogramowania VeriSeq NIPT Solution v2 (nr dokumentu: 1000000067940)*.

25 Po wyświetleniu komunikatu przez oprogramowanie Workflow Manager należy nacisnąć **OK**.

26 Wprowadzić komentarz dotyczący konkretnych dołków, a następnie nacisnąć **OK**.

27 Wykonać jeden z następujących kroków:

- Aby kontynuować ekstrakcję cfDNA, należy wybrać opcję **Yes** (Tak).
- Aby zatrzymać, należy wybrać opcję **Exit** (Wyjdź).

## PUNKT BEZPIECZNEGO PRZERWANIA OZNACZEŃ

Na czas przerwy w wykonywaniu testów należy szczelnie zabezpieczyć płytkę na osocze końcowe i przechowywać ją w temperaturze od 2°C do 8°C nie dłużej niż przez 7 dni.

## Ekstrakcja cfDNA

### Przygotowanie

1 Wzrokowo sprawdzić zestaw do ekstrakcji i akcesoria. Upewnić się, że nie upłynął okres przydatności.

- 2 Przygotować wymienione poniżej odczynniki. Oznaczyć nazwami odczynników podłużne pojemniki i zbiorniki z głębokimi dołkami.

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje
Płytki z głębokimi dołkami na osocze końcowe	Od 2°C do 8°C	Jeśli element był wcześniej przechowywany, należy go odstawić na 30 minut, aby ogrzał się do temperatury pokojowej. Wirować z prędkością 1000 × g przez 20 sekund. Przed użyciem należy rozpieczętować płytkę z głębokimi dołkami na osocze końcowe.

- 3 Powoli dodawać 3,75 ml buforu dla proteinazy do każdej fiołki z odczynnikiem (proteinazą K).
- Przygotować 3 fiołki na 24 i 48 próbek.
  - Przygotować 4 fiołki na 96 próbek.
- 4 Zabezpieczyć fiołki z proteinazą K korkiem, a następnie wymieszać mieszadłem wirowym do ponownego zawieszenia.



#### PRZESTROGA

Należy zachować ostrożność, aby nie skazić gumowego korka. Pozostałości innych substancji na gumowym korku mogą spowodować skażenie kolejnych próbek.

- 5 Zebrać przygotowaną proteinazę K ze wszystkich fiołek i wlać do rynienki na odczynniki, a następnie oznaczyć jako proteinaza K.
- 6 Do każdej butelki z buforem płuczającym II dodać 100 ml 100% EtOH.
- Przygotować 1 butelkę na 24 i 48 próbek.
  - Przygotować 2 butelki na 96 próbek.
- 7 Odwrócić butelki z buforem płuczającym II w celu wymieszania.
- 8 Zaznaczyć pola wyboru na butelkach z buforem płuczającym II.
- 9 Oznaczyć 1 nową płytkę z wysoką ramką boczną na osocze pośrednie i przykleić kod kreskowy.
- 10 Oznaczyć 1 nową płytkę z wysoką ramką boczną do elucji cfDNA i przykleić kod kreskowy.
- 11 Oznaczyć 1 nową płytkę z głębokimi dołkami do ekstrakcji pośredniej i przykleić kod kreskowy płytki z głębokimi dołkami.
- 12 Przykleić kod kreskowy na płytkę do izolacji DNA.
- 13 Na nieużywane dołki (w przypadku partii 24 i 48 próbek) nałożyć fiołę uszczelniającą.
- 14 Przygotować roztwór czyszczący zawierający 70% EtOH (70% EtOH, 30% wody pozbawionej DNazy/RNAzy) do czyszczenia systemu próżniowego.

- 15 Przygotować system próżniowy w sposób opisany poniżej.
  - a. Zdjąć kolektor próżniowy i wyczyścić za pomocą 70% EtOH.  
Należy unikać czyszczenia uszczelki za pomocą EtOH, ponieważ materiał stanie się podatny na uszkodzenia.
  - b. Usunąć odpady z systemu próżniowego.
  - c. Upewnić się, że system próżniowy ML STAR jest włączony.

## Procedura

- 1 Wybrać przycisk **OK**, aby rozpocząć ekstrakcję cfDNA.
- 2 Jeśli nie otwarto jeszcze **metody VeriSeq NIPT**:
  - a. Uruchomić oprogramowanie AppLauncher, a następnie wybrać opcję **VeriSeq NIPT Method** (Metoda VeriSeq NIPT).
  - b. Wprowadzić identyfikator partii i nazwę użytkownika, a następnie wybrać przycisk **OK**.
- 3 Załadować końcówki na nośniki końcówek zgodnie z poniższym opisem, a następnie wybrać przycisk **OK**.



### PRZESTROGA

Przed uruchomieniem metody dla partii 24, 48 i 96 próbek należy dodać pełny stojak 8-kanalowych końcówek.

Wielkość partii próbek	Typ nośnika	Ścieżka	Element	Pozycja
24	Końcówka	1–6	Końcówki 1000 µl	1
		7–12	Końcówki 300 µl	1
48	Końcówka	1–6	Końcówki 1000 µl	1, 2
		7–12	Końcówki 300 µl	1
96	Końcówka	1–6	Końcówki 1000 µl	1, 2, 3, 4
		7–12	Końcówki 300 µl	1

- 4 Załadować zliczone końcówki na nośniki końcówek w opisany poniżej sposób.

Wielkość partii próbek	Typ nośnika	Ścieżka	Element	Pozycja
24, 48, 96	Końcówka	49–54	Końcówki 1000 µl	1
			Końcówki 300 µl	2
			Końcówki 50 µl	3

- 5 Wprowadzić lokalizację pierwszej i ostatniej końcówki dla każdego stojaka na końcówki, a następnie wybrać przycisk **OK**.

- 6 Zeskanować kody kreskowe z zestawu do ekstrakcji.
- 7 Wprowadzić inicjały użytkownika lub osoby przygotowującej odczynnik, a następnie wybrać przycisk **OK**.
- 8 Zeskanować kody kreskowe z zestawu akcesoriów.
- 9 Wprowadzić inicjały użytkownika lub osoby przygotowującej odczynnik, a następnie wybrać przycisk **OK**.
- 10 Sprawdzić, czy kody kreskowe znajdują się na miejscu.
- 11 W razie potrzeby rozpieczętować płytkę z głębokimi dołkami na osocze końcowe.
- 12 Załadować płytki (kodem kreskowym skierowanym w prawo) do nośnika płytek w opisany poniżej sposób, a następnie wybrać przycisk **OK**.

Wielkość partii próbek	Typ nośnika	Ścieżka	Element	Pozycja
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Nowa płytka z wysoką ramką boczną, na osocze pośrednie, z kodem kreskowym	1
			Nowa płytka z wysoką ramką boczną, do elucji cfDNA, z kodem kreskowym	2
			Nowa płytka z głębokimi dołkami, do ekstrakcji pośredniej, z kodem kreskowym	4
			Płytkę z głębokimi dołkami, na osocze końcowe, z kodem kreskowym	5

- 13 Potwierdzić, że płytka do izolacji DNA jest oznaczona kodem kreskowym, a następnie wybrać przycisk **OK**.
- 14 W przypadku niepełnych partii płytek na niewypełnione dołki nałożyć przycięte uszczelnienie płytki (kolumny 4–12 w przypadku partii złożonej z 24 próbek i kolumny 7–12 w przypadku partii złożonej z 48 próbek).
- 15 Umieścić płytkę do izolacji DNA na kolektorze próżniowym, z kodem kreskowym skierowanym w prawo.
- 16 Przed umieszczeniem płytki do izolacji na kolektorze BVS wzrokowo sprawdzić dołki pod kątem jakichkolwiek przeszkód.  
Mogą one utrudniać przepływ odczynników w podciśnieniu.
- 17 Jeśli używane są partie z 24 lub 48 próbkami, zakryć nieużywane dołki i zamknąć je folią uszczelniającą. Zaznaczyć pole wyboru **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (Czy kolumny płytki do izolacji DNA są uszczelnione?), a następnie wybrać przycisk **OK**.

- 18 Załadować rynienki na odczynniki do nośnika odczynników w opisany poniżej sposób, a następnie wybrać przycisk **OK**.

Wielkość partii próbek	Typ nośnika	Ścieżka	Element	Pozycja
24, 48	Odczynnik	47	Bufor elucyjny 16 ml	1
			Proteinaza K 11 ml	2
96	Odczynnik	47	Bufor elucyjny 16 ml	1
			Proteinaza K 15 ml	2

- 19 Przenieść wskazane odczynniki do zbiorników z głębokimi dołkami, a następnie umieścić zbiorniki na odpowiednich nośnikach w opisany poniżej sposób.

- 20 Wybrać przycisk **OK**.

Wielkość partii próbek	Typ nośnika	Ścieżka	Element	Pozycja
24, 48	Głęboki dołek	39–44	Bufor płuczający II 125 ml	1
			Bufor płuczający I 125 ml	2
			100% EtOH 60 ml	3
			Bufor do lizy 100 ml	4
			Woda pozbawiona DNazy/RNazy 60 ml	5
96	Głęboki dołek	39–44	Bufor płuczający II 200 ml	1
			Bufor płuczający I 125 ml	2
			100% EtOH 100 ml	3
			Bufor do lizy 100 ml	4
			Woda pozbawiona DNazy/RNazy 100 ml	5

- 21 Odczekać na zakończenie automatycznego sprawdzania objętości odczynników.
- 22 Upewnić się, że układ na odpady w systemie próżniowym jest pusty (zalecane wypełnienie do połowy), a następnie wybrać przycisk **OK**.
- 23 Potwierdzić rozmieszczenie wszystkich nośników, materiałów eksploatacyjnych i odczynników, a następnie wybrać przycisk **OK** na ekranie Extraction Deck Verification (Sprawdzanie systemu ekstrakcyjnego).
- 24 Monitorować działanie platformy ML STAR w trakcie wykonywania kroków automatycznych.



### PRZESTROGA

Należy ręcznie unieważnić rozlane próbki, które nie zostały wykryte przez system, zanim dojdzie do skażenia sąsiednich dołków.

- 25 Po ostatnim etapie próżniowym usunąć płytkę do izolacji DNA i oczyścić dolną powierzchnię za pomocą 70% EtOH.
- 26 Szczelnie zabezpieczyć wszystkie odkryte dołki na płytce do izolacji DNA, a następnie umieścić tę płytkę do izolacji DNA na pustej płytce z głębokimi dołkami na osocze końcowe.
- 27 Wirować zespół płytka do izolacji DNA/płytkę na osocze końcowe z prędkością 5600 × g przez 10 minut z włączoną funkcją hamulca.
- 28 Wybrać przycisk **OK**.
- 29 Podczas wirowania płytki do izolacji DNA należy zakończyć oczyszczanie próżniowe:
  - a. Usunąć kolektor próżniowy, a następnie wybrać przycisk **OK**.
  - b. Odczekać na zakończenie automatycznego usuwania odpadów.
  - c. Oczyścić kolektor próżniowy i wnętrze układu próżniowego za pomocą 70% EtOH, a następnie ponownie zainstalować kolektor próżniowy.
  - d. Zaznaczyć pole wyboru **Manifold is on Vacuum** (Kolektor znajduje się w układzie próżniowym), aby zainicjować transfer płytki do elucji do kolektora próżniowego, a następnie wybrać przycisk **OK**.
- 30 Po odwirowaniu rozpieczętować dołki zawierające próbki na płytce do izolacji DNA.
- 31 Umieścić płytkę do izolacji DNA na wierzchu tej płytki do elucji cfDNA, która znajduje się w kolektorze próżniowym.
- 32 Załadować płytkę do izolacji DNA z kodem kreskowym po prawej stronie, a następnie wybrać przycisk **OK**.
- 33 Monitorować działanie platformy ML STAR w trakcie wykonywania kroków automatycznych.
- 34 Po zakończeniu inkubacji zaznaczyć pole wyboru **Plates are assembled as indicated** (Płytki załadowano zgodnie ze wskazówkami). Potwierdzić, że zespół płytka do izolacji DNA/płytkę do elucji cfDNA znajduje się na podstawce (jeśli jest to konieczne zgodnie z ustawieniami wirówki).
- 35 Szczelnie zabezpieczyć odsłonięte dołki na płytce do izolacji DNA.
- 36 Wirować z prędkością 5600 × g przez 2 minuty z włączoną funkcją hamulca, a następnie wybrać przycisk **OK**.
- 37 Wzrokowo sprawdzić, czy każdy dołek na płytce do elucji cfDNA zawiera jednakową objętość. Oczekiwana objętość wynosi około 55 µl.
- 38 Szczelnie zabezpieczyć i zachować płytkę do elucji cfDNA do przygotowania biblioteki.
- 39 Po wyświetleniu komunikatu przez oprogramowanie Workflow Manager należy upewnić się, że nic nie zakłóca działania platformy załadunkowej ML STAR, aby umożliwić jej rozładunek nośników.
- 40 Wybrać opcję **Unload** (Rozładuj), aby rozładować platformę.
- 41 Rozładować wszystkie nośniki i wyczyścić platformę ML STAR, a następnie wybrać przycisk **OK**.
- 42 Wprowadzić komentarz dotyczący konkretnych dołków, a następnie wybrać przycisk **OK**.
- 43 Wykonać jeden z następujących kroków:
  - Aby kontynuować przygotowywanie bibliotek, wybrać opcję **Yes** (Tak).
  - Aby zatrzymać, wybrać opcję **Exit** (Wyjdź).

### **PUNKT BEZPIECZNEGO PRZERWANIA OZNACZEŃ**

W przypadku przerwania procedury płytkę do elucji cfDNA należy szczelnie zamknąć i przechowywać w temperaturze od -25°C do -15°C nie dłużej niż przez 7 dni.

# Przygotowywanie bibliotek

## Przygotowanie

- 1 Obejrzyć zestaw do przygotowania biblioteki i zestaw akcesoriów; upewnić się, że nie minął termin ważności.
- 2 Przygotować wymienione poniżej odczynniki. Oznaczyć rynienki i zbiorniki z głębokimi dołkami nazwami odczynników.

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje
Mieszanka do tworzenia ogona poli-A	Od -25°C do -15°C	Rozmrażać w temperaturze pokojowej. Wymieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.
Płytki do elucji cfDNA	Od -25°C do -15°C	Jeśli płytka była wcześniej przechowywana, potwierdzić, że nie była przechowywana dłużej niż przez 7 dni, i rozmrozić do temperatury pokojowej. Wymieszać mieszadłem wirowym z prędkością 1500 obr./min przez 1 minutę. Wirować z prędkością 1000 × g przez 20 sekund.
Mieszanka do naprawy końców	Od -25°C do -15°C	Rozmrażać w temperaturze pokojowej. Wymieszać mieszadłem wirowym.
Bufor hybrydizacyjny	Od -25°C do -15°C	Rozmrażać w temperaturze pokojowej. Wymieszać mieszadłem wirowym. <b>Po użyciu odstawić do przechowywania.</b>
Mieszanka zawierająca ligazę	Od -25°C do -15°C	Rozmrażać w temperaturze pokojowej. Wymieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.
Płytki z adapterami DNA NIPT	Od -25°C do -15°C	Rozmrażać w temperaturze pokojowej. Wymieszać mieszadłem wirowym. Wirować z prędkością 1000 × g przez 20 sekund.
Bufor do ponownego zawieszania (RSB)	Od 2°C do 8°C	Wymieszać mieszadłem wirowym. <b>Po użyciu odstawić do przechowywania.</b>
Kulki do oczyszczania próbek	Od 2°C do 8°C	Odstawić na 30 minut w celu doprowadzenia do temperatury pokojowej. Przed każdym użyciem energicznie wymieszać mieszadłem wirowym. Wymieszać mieszadłem wirowym lub poprzez odwracanie do momentu, kiedy wszystkie kulki znajdują się w zawieszaniu i mieszanka będzie jednorodna.



**PRZESTROGA**

Podczas odpiętywania płytki z adapterami NIPT DNA zachować maksymalną ostrożność, aby uniknąć przenoszenia zawartości dołków w postaci aerozoli do innych dołków, ponieważ może to spowodować niepoprawne wyniki.

- 3 Jeśli płytka do elucji cfDNA była przechowywana zamrożona, należy ją przygotować w sposób opisany poniżej.
  - a. Rozmrażać w temperaturze pokojowej.
  - b. Wymieszać mieszadłem wirowym z prędkością 1500 obr./min przez 1 minutę.
  - c. Wirować z prędkością 1000 × g przez 20 sekund.
- 4 Oznaczyć jedną nową płytkę z wysoką ramką boczną jako „biblioteki” i przykleić kod kreskowy.
- 5 Przygotować 80% EtOH z EtOH absolutnego. Połączyć 40 ml 100% EtOH i 10 ml wody pozbawionej DNazy/RNazy. Odwrócić, aby wymieszać.
- 6 Upewnić się, że kontrola termiczna platformy ML STAR jest włączona.

**Rozcieńczanie enzymów**

- 1 Połączyć mieszaninę do tworzenia ogona poli-A i bufor do ponownego zawieszania (RSB) w zakręcaniej probówce. Wymieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.

Wielkość partii próbek	Mieszanina do tworzenia ogona poli-A (µl)	Bufor do ponownego zawieszania (RSB) (µl)
24, 48	900	1200
96	1800	2400

- 2 Połączyć mieszaninę zawierającą ligazę i bufor do ponownego zawieszania (RSB) w zakręcaniej probówce. Wymieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.

Wielkość partii próbek	Mieszanina zawierająca ligazę (µl)	Bufor do ponownego zawieszania (RSB) (µl)
24, 48	230	1713
96	440	3278

**Procedura**

- 1 Wybrać przycisk **OK**, aby rozpocząć przygotowanie biblioteki. Jeśli nie otwarto jeszcze **metody VeriSeq NIPT**:
  - a. Uruchomić oprogramowanie AppLauncher i wybrać opcję **VeriSeq NIPT Method** (Metoda VeriSeq NIPT).
  - b. Wprowadzić identyfikator partii i nazwę użytkownika, a następnie wybrać przycisk **OK**.

- 2 Potwierdzić, że poniższe materiały eksploatacyjne zostały przygotowane zgodnie ze wskazówkami na ekranie Reagent Preparation (Przygotowanie odczynników):
  - Mieszanina do tworzenia ogona poli-A, mieszanina zawierająca ligazę oraz 80% EtOH.
  - Kulki do oczyszczania próbki, mieszanina do naprawy końców oraz płytki z adapterami DNA NIPT.
- 3 Zaznaczyć pola wyboru i wybrać przycisk **OK**.
- 4 Zeskanować kody kreskowe zestawu do przygotowania biblioteki.
- 5 Wprowadzić inicjały użytkownika lub osoby przygotowującej odczynnik, a następnie wybrać przycisk **OK**.
- 6 Zeskanować kody kreskowe z zestawu akcesoriów.
- 7 Wprowadzić inicjały użytkownika lub osoby przygotowującej odczynnik, a następnie wybrać przycisk **OK**.
- 8 Załadować końcówki do nośnika końcówek w opisany poniżej sposób, a następnie wybrać przycisk **OK** dla każdego nośnika.

Wielkość partii próbek	Typ nośnika	Ścieżka	Element	Pozycja
24	Końcówka	1–6	Końcówki 50 µl	1
		7–12	Końcówki 300 µl	1, 2
48	Końcówka	1–6	Końcówki 50 µl	1, 2
		7–12	Końcówki 300 µl	1, 2, 3, 4
96	Końcówka	1–6	Końcówki 50 µl	1, 2, 3, 4
		7–12	Końcówki 300 µl	1, 2, 3, 4, 5

- 9 Jeśli zatrzymano protokół po procedurze ekstrakcji cfDNA, zliczone końcówki należy załadować do nośników końcówek w opisany poniżej sposób.

Wielkość partii próbek	Typ nośnika	Ścieżka	Element	Pozycja
24, 48, 96	Końcówka	49–54	Końcówki 1000 µl	1
			Końcówki 300 µl	2
			Końcówki 50 µl	3

- 10 Wprowadzić lokalizację pierwszej końcówki dla każdego stojaka na końcówki, a następnie wybrać przycisk **OK**.

- 11 Potwierdzić, że kody kreskowe są zamocowane, i załadować płytki (kodem kreskowym skierowanym w prawo) do nośnika płytek w opisany poniżej sposób, a następnie wybrać przycisk **OK**.

Wielkość partii próbek	Typ nośnika	Ścieżka	Element	Pozycja
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Płytki do elucji cfDNA, z kodem kreskowym	1
			Płytki z adapterami DNA NIPT, z kodem kreskowym	2
			Nowa płytka 96-dołkowa z wysoką ramką boczną, biblioteki, z kodem kreskowym	3
			Nowe płytki 96-dołkowe z wysoką ramką boczną	4, 5

- 12 Załadować nośnik głębokich dołków w opisany poniżej sposób, a następnie wybrać przycisk **OK**.

Wielkość partii próbek	Typ nośnika	Ścieżka	Element	Pozycja
24, 48, 96	Głęboki dołek	39–44	50 ml 80% EtOH w zbiorniku z głębokimi dołkami	1
			Nowe płytki 96-dołkowe z wysoką ramką boczną	2, 3, 4, 5

- 13 Załadować rynienki na odczynniki do nośnika odczynników w opisany poniżej sposób, a następnie wybrać przycisk **OK**.

Wielkość partii próbek	Typ nośnika	Ścieżka	Element	Pozycja
24, 48, 96	Odczynnik	47	Mieszanina do naprawy końców, 2,5 ml	1
			Przygotowana mieszanina do tworzenia ogona poli-A (objętość całkowita)	2
			Przygotowana mieszanina zawierająca ligazę (objętość całkowita)	3
			Kulki do oczyszczania próbki, 10 ml	4
			Bufor hybrydyzacyjny, 12 ml	5

- 14 Zachować pozostałą ilość bufora hybrydyzacyjnego 12 ml (HT1) w zbiorniku na potrzeby tworzenia puli.

- 15 Należy upewnić się, że nośniki, szkło laboratoryjne i odczynniki są załadowane zgodnie ze wskazaniem, a następnie wybrać przycisk **OK** na ekranie Library Deck Verification (Sprawdzanie systemu biblioteki).
- 16 Odczekać na zakończenie automatycznego sprawdzania objętości odczynników.
- 17 Monitorować działanie platformy ML STAR w trakcie wykonywania kroków automatycznych.
- 18 Po wyświetleniu komunikatu przez oprogramowanie Workflow Manager należy upewnić się, że nic nie zakłóca działania platformy załadunkowej ML STAR, aby umożliwić jej rozładunek nośników.
- 19 Wybrać opcję **Unload** (Rozładuj), aby rozładować platformę.
- 20 Sprawdzić, czy każdy dołek na płytce bibliotek zawiera jednakową objętość.



### PRZESTROGA

Jeśli objętości w dołkach są niejednakowe, automatyczna kontrola jakości próbek może zakończyć się niepowodzeniem.

- 21 W przypadku przechowywania płytkę bibliotek należy szczelnie zamknąć i zachować.
- 22 Rozładować nośniki, wyczyścić system, a następnie wybrać przycisk **OK**.
- 23 Wprowadzić komentarz dotyczący konkretnych dołków, a następnie wybrać przycisk **OK**.
- 24 Wykonać jeden z następujących kroków:
  - Aby kontynuować kwantyfikację bibliotek, wybrać opcję **Yes** (Tak).
  - Aby zatrzymać, należy wybrać opcję **Exit** (Wyjdz).

### PUNKT BEZPIECZNEGO PRZERWANIA OZNACZEŃ

W przypadku przerwania procedury płytkę bibliotek należy szczelnie zamknąć przed przechowywaniem. Płytkę bibliotek zachowuje stabilność do 7 dni od daty przygotowania w temperaturze od -25°C do -15°C.

## Kwantyfikacja bibliotek

### Przygotowanie

- 1 Przygotować następujące odczynniki:

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje
Odczynnik do kwantyfikacji DNA	Od 2°C do 8°C	Chronić przed światłem. Rozmrażać w temperaturze pokojowej przez 30–150 minut. (Zaleca się usunięcie odczynnika na początku procedury przygotowania bibliotek). Wymieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.
Standard kwantyfikacji DNA	Od 2°C do 8°C	Wymieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje
Bufor do ponownego zawieszania (RSB)	Od 2°C do 8°C	Wymieszać mieszadłem wirowym.

- 2 Jeśli płytką bibliotek była przechowywana zamrożona, należy ją przygotować w sposób opisany poniżej.
  - a. Potwierdzić, że płytką nie była przechowywana dłużej niż przez 7 dni, i rozmrozić do temperatury pokojowej.
  - b. Wymieszać mieszadłem wirowym.
  - c. Wirować z prędkością 1000 × g przez 1 minutę.
- 3 Włączyć fluorometr na 10 minut przed użyciem.
- 4 Nałożyć kod kreskowy na nową płytkę 384-dołkową.
- 5 Nałożyć kod kreskowy na nową płytkę z wysoką ramką boczną.

## Procedura

- 1 Wybrać przycisk **OK**, aby rozpocząć kwantyfikację.
- 2 Jeśli nie otwarto jeszcze metody VeriSeq NIPT:
  - a. Uruchomić oprogramowanie AppLauncher i wybrać opcję **VeriSeq NIPT Method** (Metoda VeriSeq NIPT).
  - b. Wprowadzić identyfikator partii i nazwę użytkownika, a następnie wybrać przycisk **OK**.
- 3 Zeskanować kody kreskowe z zestawu akcesoriów.
- 4 Wprowadzić inicjały użytkownika lub osoby przygotowującej odczynnik, a następnie wybrać przycisk **OK**.
- 5 Załadować końcówki do nośnika końcówek w opisany poniżej sposób, a następnie wybrać przycisk **OK**.

Wielkość partii próbek	Typ nośnika	Ścieżka	Element	Pozycja
24, 48	Końcówka	1–6	Stojak na końcówki 300 µl	1
			Stojak na końcówki 50 µl	2
96	Końcówka	1–6	Stojak na końcówki 300 µl	1
			Stojak na końcówki 50 µl	2, 3

- 6 Sprawdzić, czy kody kreskowe znajdują się na miejscu.
- 7 W razie potrzeby rozpieczętować płytkę bibliotek.
- 8 Załadować płytki (kodem kreskowym skierowanym w prawo) do nośnika Multiflex w opisany poniżej sposób, a następnie wybrać przycisk **OK**.

Wielkość partii próbek	Typ nośnika	Ścieżka	Element	Pozycja
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Nowe płytki z wysoką ramką boczną, z kodem kreskowym	1
			Nowa płytka 384-dołkowa, z kodem kreskowym	2
			Płytki bibliotek, z kodem kreskowym	3
			Nowe płytki 96-dołkowe z wysoką ramką boczną	4, 5

- 9 Załadować próbki z odczynnikami bez zatyczek do nośnika próbek w opisany poniżej sposób, a następnie wybrać przycisk **OK**.

Wielkość partii próbek	Typ nośnika	Ścieżka	Element	Pozycja
24, 48, 96	Probówka	46	Standard kwantyfikacji DNA	1
			Odczynnik do kwantyfikacji DNA	2

- 10 Załadować rynienki na odczynniki do nośnika odczynników w opisany poniżej sposób, a następnie wybrać przycisk **OK**.

Wielkość partii próbek	Typ nośnika	Ścieżka	Element	Pozycja
24, 48, 96	Odczynnik	47	Nowa rynienka na odczynniki (pusta)	1
			Bufor do ponownego zawieszania (RSB), 16 ml	2

- 11 Jeśli zatrzymano protokół po procedurze przygotowania biblioteki, zliczone końcówki należy załadować do nośników końcówek w opisany poniżej sposób.

Wielkość partii próbek	Typ nośnika	Ścieżka	Element	Pozycja
24, 48, 96	Końcówka	49–54	Końcówki 1000 µl	1
			Końcówki 300 µl	2
			Końcówki 50 µl	3

- 12 Wprowadzić lokalizację pierwszej i ostatniej końcówki dla każdego stojaka na końcówki, a następnie wybrać przycisk **OK**.
- 13 Należy upewnić się, że nośniki, szkło laboratoryjne i odczynniki są załadowane zgodnie ze wskazaniem, a następnie wybrać przycisk **OK** na ekranie Quant Deck Verification (Sprawdzanie systemu kwantyfikacji).
- 14 Odczekać na zakończenie automatycznego sprawdzania objętości odczynników.
- 15 Monitorować działanie platformy ML STAR w trakcie wykonywania kroków automatycznych.
- 16 Po wyświetleniu komunikatu przez oprogramowanie Workflow Manager należy upewnić się, że nic nie zakłóca działania platformy załadunkowej ML STAR, aby umożliwić jej rozładunek nośników.
- 17 Wybrać opcję **Unload** (Rozładuj), aby rozładować platformę.
- 18 Rozładować płytkę bibliotek.
- Sprawdzić, czy każdy dołek na płytce zawiera jednakową objętość.
  - Szczelnie zamknąć płytkę bibliotek i przechowywać ją w temperaturze pokojowej do momentu zakończenia analizy danych fluorometrycznych.
- 19 Rozładować pozostałe płytki 96-dołkowe i sprawdzić, czy każdy dołek zawiera jednakową objętość. Duże błędy objętości mogą wskazywać na problem na etapach pipetowania.
- 20 Rozładować płytkę 384-dołkową i sprawdzić płyn w odpowiednich dołkach.
- 21 Zapieczętować płytkę folią.
- 22 Wirować z prędkością 1000 × g przez 20 sekund.
- 23 Inkubować w temperaturze pokojowej przez 10 minut, chroniąc przed światłem.
- 24 Rozładować wszystkie nośniki.
- 25 Wyczyścić platformę ML STAR, a następnie wybrać przycisk **OK**.



### PRZESTROGA

Do czasu uzyskania danych nie wyrzucać odczynników do kwantyfikacji. Odczynniki te będą potrzebne w razie konieczności wykonania ponownej kwantyfikacji.

- 26 Po inkubacji zdjąć foliowe uszczelnienie i załadować płytkę 384-dołkową do czytnika mikropłyttek. Upewnić się, że używana jest płytka z fioletowym adapterem (numer części: 0310-4336) firmy Molecular Devices albo płytka równoważna, o ile używany aparat jest z nią kompatybilny.
- Upewnić się, że A1 znajduje się w lewym górnym rogu podczas ładowania.

- 27 Dwukrotnie wybrać szablon VeriSeq NIPT, aby otworzyć go w oprogramowaniu SoftMax Pro.
- 28 Na karcie głównej wybrać opcję **New Experiment** (Nowy eksperyment).
- 29 Wybrać opcję **Read** (Odczyt).
- 30 Wyeksportować dane w formacie XML w opisany poniżej sposób.
  - a. Prawym klawiszem myszy wybrać opcję **Plate** (Płytki), a następnie wybrać polecenie **Rename** (Zmień nazwę).
  - b. Zeskanować kod kreskowy płytki do kwantyfikacji, a następnie wybrać przycisk **OK**.
  - c. W lewym górnym rogu ekranu wybrać ikonę płytki, a następnie wybrać z menu opcję **Export** (Eksport).
  - d. Zaznaczyć pole wyboru **Expt name** (Nazwa eksportu), ustawić opcję daty płytki na nieprzetworzoną, ustawić format wyjściowy na XML, a następnie wybrać przycisk **OK**.
  - e. Ustawić ścieżkę i nazwę pliku wyjściowego, a następnie wybrać opcję **Save** (Zapisz).Komputer Hamilton musi być w stanie uzyskać dostęp do lokalizacji pliku. Nie stosować spacji w nazwie pliku ani nazwie ścieżki.

## Analiza

- 1 W oprogramowaniu platformy ML STAR na ekranie Scanner Information (Informacje o skanerze) wprowadzić identyfikator fluorometru.
- 2 Wprowadzić komentarz dotyczący pracy fluorometru, a następnie wybrać przycisk **OK**.
- 3 Przejść do pliku \*.xml kwantyfikacji, który zawiera dane fluorometryczne, a następnie wybrać przycisk **OK**.
- 4 Sprawdzić wyniki analizy krzywych wzorcowych oraz stężenia próbki, a następnie wybrać przycisk **OK**.
- 5 W razie konieczności ponownego skanowania płytki wybrać opcję **Rescan** (Zeskanuj ponownie).  
Próbki są wrażliwe na światło i czas. W razie konieczności natychmiast wykonać ponowne skanowanie.
- 6 Wprowadzić komentarz dotyczący konkretnych dołków, a następnie wybrać przycisk **OK**.
- 7 Przejść do wyników i postępować w opisany poniżej sposób.
  - Jeśli wyniki są zgodne ze specyfikacją, należy przejść do sekcji [Pulowanie bibliotek na stronie 41](#).  
Specyfikacje znajdują się w tabeli zawierającej metryki i granice kontroli jakości oznaczenia ilościowego w *Przewodniku użytkownika oprogramowania VeriSeq NIPT Solution v2 (nr dokumentu: 1000000067940)*.
  - Jeśli wyniki są niezgodne ze specyfikacją, system przerywa metodę. Powtórzyć procedury kwantyfikacji, począwszy od [Przygotowanie na stronie 36](#).
- 8 Wykonać jeden z następujących kroków:
  - Aby przejść do [Pulowanie bibliotek na stronie 41](#), należy wybrać opcję **Yes** (Tak).
  - Aby zatrzymać, należy wybrać opcję **Exit** (Wyjdź).

## PUNKT BEZPIECZNEGO PRZERWANIA OZNACZEŃ

W przypadku przerwania procedury płytkę bibliotek należy szczelnie zamknąć przed przechowywaniem. Płytki bibliotek zachowuje stabilność do 7 dni łącznego przechowywania w temperaturze od -25°C do -15°C.



# Pulowanie bibliotek

## Przygotowanie

- 1 Przygotować następujące odczynniki:

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje
Bufor hybrydizacyjny	Od -25°C do -15°C	Rozmrażać w temperaturze pokojowej. Wymieszać mieszadłem wirowym. Po użyciu odstawić do przechowywania.

- 2 Jeśli płytkę bibliotek była przechowywana zamrożona, należy ją przygotować w sposób opisany poniżej.
  - a. Potwierdzić, że płytkę nie była przechowywana dłużej niż przez 7 dni, i rozmrozić do temperatury pokojowej.
  - b. Wymieszać mieszadłem wirowym z prędkością 1500 obr./min przez 1 minutę.
  - c. Wirować z prędkością 1000 × g przez 20 sekund.
  - d. Wymieszać poprzez pipetowanie.
- 3 Oznaczyć pustą probówkę puli jako „pula A”. Dla 96 próbek oznaczyć drugą pustą probówkę puli jako „pula B”.
- 4 Zapisać następujący program denaturacji na termocyklerze z podgrzewaną pokrywą.
  - a. Wybrać opcję podgrzewania pokrywy i nastawić ją na 102°C.
  - b. Ustawić objętość reakcji na 50 µl.
  - c. Ustawić maksymalną szybkość spadku/przyrostu (≥ 2°C na sekundę).
  - d. Inkubować w temperaturze 96°C przez 10 minut, a następnie w temperaturze 4°C przez 5 sekund.
  - e. Pozostawić w temperaturze 4°C.

## Procedura

- 1 Umieścić płytkę bibliotek we wstępnie zaprogramowanym termocyklerze i uruchomić program denaturacji. Nie wykonywać denaturacji płytki bibliotek, zanim kwantyfikacja nie przejdzie kontroli jakości. Należy pamiętać, że może wystąpić konieczność powtórzenia kwantyfikacji.
- 2 Odwirowywać płytkę bibliotek z prędkością 1000 × g przez 20 sekund.
- 3 Wybrać przycisk **OK**, aby rozpocząć pulowanie bibliotek.
- 4 Jeśli nie otwarto jeszcze metody VeriSeq NIPT:
  - a. Uruchomić oprogramowanie AppLauncher i wybrać opcję **VeriSeq NIPT Method** (Metoda VeriSeq NIPT).
  - b. Wprowadzić identyfikator partii i nazwę użytkownika, a następnie wybrać przycisk **OK**.
- 5 Wybrać stężenie puli, a następnie wybrać przycisk **OK**. Docelowy zakres gęstości klastra wynosi 220–260 K/mm<sup>2</sup>.

**UWAGA** W przypadku serii 24 próbek może wystąpić konieczność zwiększenia stężeń i/lub objętości pulowania celem utrzymania podobnych gęstości klastra, jak uzyskiwane w przypadku serii 48/96 próbek.

- 6 Jeśli oprogramowanie Workflow Manager wyświetli monit, należy wykonać jedną z poniższych czynności:
- Aby załadować arkusz próbki, należy wybrać arkusz próbki powiązany z partią, a następnie wybrać opcję **Load** (Załaduj).
  - Aby użyć domyślnych wartości systemu dla pozostałych typów próbek, raportowania płci lub typu badania przesiewowego, należy wybrać opcję **Use Default** (Użyj domyślnych) dla każdego ustawienia. Informacje na temat tworzenia arkusza próbki można znaleźć w *Przewodniku użytkownika oprogramowania VeriSeq NIPT Solution v2* (nr dokumentu: 1000000067940).
- 7 Wybrać opcję **Start**, aby rozpocząć odmierzenie czasu denaturacji płytki.
- 8 Załadować końcówki do nośnika końcówek w opisany poniżej sposób.

Wielkość partii próbek	Typ nośnika	Ścieżka	Element	Pozycja
24, 48, 96	Końcówka	7–12	Końcówki filtrujące 50 µl	1

- 9 Załadować zdenaturowaną płytkę bibliotek (kodem kreskowym skierowanym w prawo) do nośnika Multiflex w opisany poniżej sposób, a następnie wybrać przycisk **OK**.

Wielkość partii próbek	Typ nośnika	Ścieżka	Element	Pozycja
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Zdenaturowana płytka bibliotek (oznaczona kodem kreskowym)	1

- 10 Załadować próbki puli do nośnika probówek w opisany poniżej sposób, a następnie wybrać przycisk **OK**.

Wielkość partii próbek	Typ nośnika	Ścieżka	Element	Pozycja
24, 48	Probówka	46	Nowa probówka 2 ml, pula A	1
96	Probówka	46	Nowa probówka 2 ml, pula A	1
			Nowa probówka 2 ml, pula B	2

- 11 Załadować rynienki na odczynniki do nośnika odczynników w opisany poniżej sposób, a następnie wybrać przycisk **OK**.

Wielkość partii próbek	Typ nośnika	Ścieżka	Element	Pozycja
24, 48, 96	Odczynnik	47	Bufor hybrydyzacyjny, 3 ml	1

- 12 Załadować końcówki do nośnika końcówek w opisany poniżej sposób.

Wielkość partii próbek	Typ nośnika	Ścieżka	Element	Pozycja
24, 48, 96	Końcówka	49–54	Końcówki filtrujące 1000 µl	1
			Końcówki filtrujące 300 µl	2
			Końcówki filtrujące 50 µl	3

- 13 Wprowadzić lokalizację pierwszej i ostatniej końcówki dla każdego stojaka na końcówki, a następnie wybrać przycisk **OK**.
- 14 Upewnić się, że nośniki, szkło laboratoryjne i odczynniki są załadowane zgodnie z instrukcjami.
- 15 Na ekranie Pooling Deck Verification (Sprawdzanie systemu do tworzenia puli) wybrać przycisk **OK**.
- 16 Monitorować działanie platformy ML STAR w trakcie wykonywania kroków automatycznych.
- 17 Wprowadzić komentarz dotyczący konkretnych dołków, a następnie wybrać przycisk **OK**.
- 18 Po wyświetleniu komunikatu przez oprogramowanie Workflow Manager należy upewnić się, że nic nie zakłóca działania platformy załadunkowej ML STAR, aby umożliwić jej rozładunek nośników.
- 19 Wybrać opcję **Unload** (Rozładuj), aby rozładować platformę.
- 20 Rozładować nośnik próbek.
- 21 Każdą próbkę puli należy zamknąć, wymieszać mieszadłem wirowym, a następnie szybko odwirować.
- 22 Wybrać przycisk **OK**.
- 23 Sekwencjonowanie bibliotek należy wykonać jak najszybciej po pulowaniu. Zamknąć szczelnie płytkę bibliotek i przechowywać w temperaturze od -25°C do -15°C nie dłużej niż przez 7 dni, aby umożliwić ponowne pulowanie.

#### PUNKT BEZPIECZNEGO PRZERWANIA OZNACZEŃ

W przypadku przerwania procedury próbki puli należy zamknąć i przechowywać w temperaturze od -25°C do -15°C nie dłużej niż przez 7 dni.

## Przygotowanie puli bibliotek do sekwencjonowania

### Przygotowanie

- 1 Przygotować następujące odczynniki:

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje
Próbki puli	Od -25°C do -15°C	Jeśli były wcześniej przechowywane, rozmrozić do temperatury pokojowej. Krótco wymieszać mieszadłem wirowym. Krótco wirować.

- 2 Przygotować system sekwencjonowania nowej generacji, wypełniając poniższe pola w module Local Run Manager VeriSeq NIPT Module:
  - a. Run Name (Nazwa przebiegu)
  - b. [Opcjonalnie] Run Description (Opis przebiegu)
  - c. Pool Barcode (Kod kreskowy puli)



### PRZESTROGA

Kod kreskowy puli wprowadzony w module Local Run Manager musi być zgodny z kodem kreskowym puli wprowadzonym w oprogramowaniu Workflow Manager. Nieprawidłowe konfiguracje przebiegu są odrzucane przez oprogramowanie analityczne i wymagają ponownego sekwencjonowania.

Więcej informacji na temat korzystania z modułu Local Run Manager VeriSeq NIPT Module można znaleźć w *Przewodniku użytkownika oprogramowania VeriSeq NIPT Solution v2 (nr dokumentu: 1000000067940)*.

## Procedura

- 1 Połączyć następujące objętości w kasecie odczynników, a następnie wykonać pipetowanie w celu wymieszania.
  - Bufor hybrydyzacyjny (900 µl)
  - 450 µl puli A (450 µl)
- 2 Przejsz do sekwencjonowania zgodnie z instrukcją obsługi aparatu do sekwencjonowania nowej generacji. W przypadku aparatu NextSeq 550Dx zapoznać się z *Instrukcją obsługi aparatu NextSeq 550Dx (dokument nr 1000000009513)* (albo zapoznać się z odpowiednią ulotką dołączoną do opakowania zgodnie z wykazem na stronie działu pomocy firmy Illumina pod adresem [www.support.illumina.com](http://www.support.illumina.com)).
- 3 Gdy pojawi się monit, sprawdzić, czy konfiguracja przebiegu jest poprawna.
- 4 W razie konieczności należy powtórzyć tę procedurę dla puli B.
  - Aby osiągnąć docelowy zakres gęstości klastra, można przeprowadzić ponowne pulowanie płytki biblioteki za pomocą innego stężenia puli na platformie Hamilton. Ponowne pulowanie unieważnia oryginalną pulę.
  - Alternatywnie można zmodyfikować stosunek puli do HT1 (450 µl + 900 µl), aby osiągnąć docelowy zakres gęstości klastra.

## Sekwencjonowanie nowej generacji (Next Generation Sequencing)

Test VeriSeq NIPT Solution v2 może być stosowany z systemem sekwencjonowania nowej generacji o następującej specyfikacji:

- obsługa 2x36 odczytów w trybie sparowanych końców,

- zgodność z adapterami indeksowanymi w zestawie do przygotowania próbek VeriSeq NIPT Sample Prep Kit,
- dwukanałowa analiza biochemiczna,
- automatyczne generowanie plików BCL (\*.bcl) (nieprzetworzone dane z aparatu do sekwencjonowania),
- 400 milionów odczytów w trybie sparowanych końców na przebieg,
- zgodność z oprogramowaniem VeriSeq NIPT Assay Software v2.

Aparat NextSeq 550Dx jest zgodny z testem VeriSeq NIPT Solution v2.

## Analiza danych sekwencyjnych

Po zakończeniu sekwencjonowania dane z sekwencjonowania są automatycznie przesyłane do oprogramowania VeriSeq NIPT Assay Software v2 w celu analizy i wygenerowania raportu. Raport zawiera klasyfikację każdej próbki w partii, a także ocenę wszystkich parametrów kontroli jakości przebiegu. Proces analizy po ukończeniu sekwencjonowania do uzyskania ostatecznych wyników trwa mniej więcej 4 godziny w przypadku partii liczącej 48 próbek. Szczegółowe informacje na temat analizy danych i pliku wyników zawiera *Przewodnik użytkownika oprogramowania VeriSeq NIPT Solution v2 (nr dokumentu: 1000000067940)*.

## Interpretacja wyników

Algorytm testu VeriSeq NIPT Solution v2 jest oparty na zaawansowanym modelu statystycznym, który łączy kilka różnych typów informacji ze zbioru fragmentów bibliotek sekwencjonowanych w trybie sparowanych końców. Model ten służy do wykrywania regionów genomu, które są podreprezentowane lub nadreprezentowane w bibliotece każdej próbki. Co ważne, model ten rozpoznaje, czy stopień podreprezentacji lub nadreprezentacji jest ilościowo zgodny ze zdarzeniem aneuploidalnym w genomie płodu na poziomie frakcji płodowej oszacowanej w bibliotece.

W odniesieniu do wszystkich chromosomów dane sekwencjonowania sparowanych końców są dopasowywane do genomu referencyjnego (HG19). Unikalne, niepowtarzalne i dopasowane odczyty są zagregowane w silosach o rozmiarze 100 kb. Liczba silosów jest korygowana pod kątem obciążenia systematycznego GC (GC bias) i wcześniej ustalonej zawartości w genomie swoistym dla regionu. Przy użyciu takich znormalizowanych liczb silosów wyniki statystyczne są uzyskiwane dla każdego autosomu poprzez porównanie regionów pokrycia, których może dotyczyć aneuploidia, z pozostałymi autosomami. Logarytmiczny wskaźnik wiarygodności (LLR, log likelihood ratio) oblicza się dla każdej próbki, biorąc pod uwagę wyniki uzyskane na podstawie pokrycia genomu i szacunkową wartość frakcji płodowej. LLR zdefiniowano jako prawdopodobieństwo, że próbka wykaże daną cechę, biorąc pod uwagę obserwowane pokrycie i frakcję płodową, w porównaniu z prawdopodobieństwem, że próbka nie wykaże danej cechy przy takim samym obserwowanym pokryciu. Obliczenie tego wskaźnika uwzględnia również szacowaną niepewność dotyczącą frakcji płodowej. Do dalszych obliczeń używa się logarytmu naturalnego wskaźnika. Oprogramowanie Assay Software ocenia wartość LLR dla każdego chromosomu docelowego i każdej próbki w celu określenia statusu aneuploidii.

Podczas tworzenia partii należy zdefiniować typ próbki (ciąża pojedyncza lub bliźniacza), typ badania przesiewowego (podstawowe lub całego genomu) oraz raportowanie chromosomów płci (Yes [Tak], No [Nie] i SCA) dla każdej próbki. Wszystkie te opcje określają informacje raportowane w odniesieniu do każdej próbki.

Typ badania przesiewowego określa, które anomalie autosomalne są raportowane w odniesieniu do wszystkich typów próbek. W przypadku podstawowych badań przesiewowych zgłaszane są tylko zdarzenia trisomii całych chromosomów obejmujące chromosomy 13, 18 i 21. W przypadku badania przesiewowego obejmującego cały genom raportowane są całkowite lub częściowe delecje chromosomu lub duplikacje dowolnego chromosomu autosomalnego. Długość najmniejszej raportowanej częściowej delecji lub duplikacji chromosomu wynosi 7 Mb.

W przypadku próbek z ciąży pojedynczych można wyłączyć opcję raportowania chromosomów płci. Można również skonfigurować raportowanie aneuploidii chromosomów płci w połączeniu z raportowaniem płci dla próbek płodów euploidalnych lub bez takiego raportowania.

Jeśli wybrano opcję raportowania chromosomów płci, wynik dla próbek z ciąży bliźniaczych obejmuje wyłącznie określenie obecności lub braku chromosomu Y w bibliotece. W przypadku próbek z ciąży bliźniaczych nie można określić aneuploidii chromosomów płci.

**UWAGA** Jeśli w przypadku wszystkich próbek z partii zostanie zgłoszona taka sama płeć, użytkownik zostanie o tym powiadomiony za pomocą powiadomienia e-mail/WebUI o błędzie, które będzie zawierało ostrzeżenie o domieszce do próbki/zanieczyszczeniu próbki. Partia zostanie unieważniona i nie zostanie wygenerowany żaden raport. (Dotyczy oprogramowania serwera VeriSeq NIPT Solution v2 w wersji 2.2 lub nowszej).

Wynik ANOMALY DETECTED (Wykryto anomalię) wskazuje, że próbka uzyskała dodatni wynik w badaniu przesiewowym w kierunku co najmniej jednej anomalii, stosownie do wybranego typu badania przesiewowego i opcji raportowania chromosomów płci. W przypadku wykrycia anomalii raport zawiera opis anomalii w notacji cytogenetycznej.

Oprogramowanie VeriSeq NIPT Assay Software v2 wykorzystuje statystyki generowane podczas sekwencjonowania do oszacowania frakcji płodowej (FFE, fetal fraction estimation) dla każdej próbki. FFE stanowi szacunkowy składnik cfDNA płodu, który jest wykrywany w oznaczeniu i raportowany jako zaokrąglony procent dla każdej próbki. Średnie odchylenie standardowe tego oszacowania dla wszystkich próbek wynosi 1,3%. FFE nie można stosować jako wyodrębnionego wskaźnika do wykluczania próbek z raportowania wyników.

Aby rozpoznać reprezentację chromosomów, oprogramowanie analityczne VeriSeq NIPT Assay v2 wykorzystuje zindywidualizowany test pewności aneuploidii płodu (iFACT, individualized Fetal Aneuploidy Confidence Test), dynamiczną metrykę prognozy, która wskazuje, czy system wygenerował wystarczające pokrycie sekwencjonowania, biorąc pod uwagę oszacowanie frakcji płodowej dla każdej próbki. Ujemne rozpoznania są raportowane tylko wtedy, jeśli próbka osiąga próg iFACT. Jeżeli próbka nie osiągnie tego progu, ocena kontroli jakości wyświetli komunikat FAILED iFACT (Niepowodzenie testu iFACT), a system nie wygeneruje wyniku.

W uzupełnieniu do testu iFACT oprogramowanie VeriSeq NIPT Assay Software v2 ocenia kilka innych wskaźników kontroli jakości w trakcie analizy. Dodatkowe wskaźniki obejmują ocenę jednorodności pokrycia na referencyjnych regionach genomowych i rozkład długości fragmentów cfDNA. Ocena kontroli jakości wyświetla

flagę kontroli jakości lub błąd kontroli jakości w odniesieniu do metryk poza dopuszczalnym zakresem. W przypadku niepowodzenia kontroli jakości system nie generuje wyniku dla próbki. Jeśli próbka nie przejdzie kontroli jakości, próbkę można ponownie poddać analizie, pod warunkiem, że w próbce do pobierania krwi znajduje się wystarczająca objętość osocza.

Test VeriSeq NIPT Solution v2 generuje dane, które można wykorzystać do sporządzenia raportu końcowego. Nie generuje raportu końcowego dla pacjenta. Za układ i treść raportu końcowego, który ma być dostarczony do lekarza, odpowiada klient. Firma Illumina nie ponosi odpowiedzialności za poprawność sformułowań zawartych w raporcie końcowym przeznaczonym dla klientów.



## PRZESTROGA

Sprawdzić szacunkową wartość frakcji płodowej we wszystkich próbkach. Jeśli szacunkowe wartości frakcji płodowej we wszystkich próbkach w przebiegu są zbliżone, mogło dojść do amalgamacji próbek, która może mieć wpływ na wyniki. Należy skontaktować się z serwisem technicznym firmy Illumina, aby uzyskać pomoc w rozwiązaniu tego problemu.

## Charakterystyka działania

Poniższe dane przedstawione w częściach dotyczących skuteczności klinicznej i analitycznej zostały wygenerowane przy użyciu protokołów i materiałów przedstawionych w instrukcji użycia, zaczynając od osocza. Wszystkie dane dotyczące sekwencjonowania w tej części zostały wygenerowane z użyciem systemu sekwencjonowania NextSeq 500/550 lub systemu sekwencjonowania NextSeq 550Dx o następującej konfiguracji:

	NextSeq 500/550	NextSeq 550Dx
Oprogramowanie aparatu	Oprogramowanie NextSeq Control Software 4.0	Oprogramowanie NextSeq Operating Software 1.3
Wersja zestawu odczynników	Zestaw odczynników NextSeq 500/550 High Output v2.5 (75 cycle) Reagent Kit	Zestaw odczynników NextSeq 550Dx High Output v2.5 (75 cycle) Reagent Kit
Metoda sekwencjonowania	Sekwencjonowanie 2x36 sparowanych końców w trybie wysokiej wydajności	Sekwencjonowanie 2x36 sparowanych końców w trybie wysokiej wydajności

## Badanie kliniczne

Dokładność kliniczną testu VeriSeq NIPT Solution v2 potwierdzono na podstawie oznaczeń wykonanych z użyciem próbek osocza kobiet w ciąży pojedynczej i bliźniaczej. W badaniu wykorzystano zanonimizowane próbki osocza wyizolowanego z próbek obwodowej krwi pełnej, zgromadzonego w banku próbek biologicznych. Procedura kwalifikacji do badania obejmowała ponad 45 000 próbek. Próbki te uprzednio poddano prenatalnym badaniom przesiewowym w kierunku aneuploidii chromosomów płodowych oraz częściowych delecji i duplikacji o wielkości co najmniej 7 Mb. Do badania kwalifikowały się wszystkie próbki z ciąży, w których wykryto aberracje, oraz podzbiór kolejnych próbek z ciąży prawidłowych, pod warunkiem

dostępności wyników klinicznych i spełnienia kryteriów kwalifikacji do badania. W zestawie do analizy znajdowało się łącznie 2335 próbek. 2328 próbek z tego zestawu pochodziło z ciąż pojedynczych, a siedem z ciąż bliźniaczych.

Dwadzieścia osiem (1,2%; 28/2335) z tych próbek nie przeszło kontroli jakości (QC) oznaczenia w pierwszym przejściu w ramach analizy danych zakończonego sekwencjonowania:

- Stwierdzono 27 przypadków niepowodzenia iFACT (jeden przypadek X0, 26 bez stwierdzonych aberracji).
- Wystąpił jeden błąd w postaci przekroczenia oczekiwanego zakresu danych.

## **Charakterystyka demograficzna i charakterystyka ciąży**

Podsumowanie dotyczące wieku matki, wieku ciążowego i trymestru ciąży w odniesieniu do próbek uwzględnionych w badaniu przesiewowym całego genomu, w tym próbek z rozpoznanymi mozaicyzmami, zawiera [Tabela 7](#). Większość (98%) testowanych próbek reprezentuje pierwszy trymestr ciąży.

Nie wykazano żadnych statystycznie istotnych różnic w danych demograficznych między kohortą podstawowego badania przesiewowego i kohortą badania przesiewowego całego genomu. Charakterystyka demograficzna i charakterystyka ciąży były zbliżone, niezależnie od tego, czy uwzględniono rozpoznane mozaicyzmy czy je wykluczono.



Tabela 7 Charakterystyka demograficzna i charakterystyka ciąży

Zbiorcze dane statystyczne	Badanie przesiewowe całego genomu (z uwzględnieniem rozpoznanych mozaicyzmów)
Liczba próbek	2307*
<b>Wiek matki — w latach</b>	
Średnia	35,08
Odchylenie standardowe	4,04
Mediana	34,95
25. percentyl, 75. percentyl	32,31; 37,79
Minimum; maksimum	20,22; 53,02
<b>Wiek ciążowy w momencie pobrania krwi (w tygodniach)</b>	
Średnia	10,93
Odchylenie standardowe	1,20
Mediana	10,57
25. percentyl, 75. percentyl	10,29; 11,14
Minimum; maksimum	10,00; 27,86
<b>Trymestr ciąży — n (%)</b>	
< Pierwszy (< 14 tygodni)	2252 (98%)
Drugi	54 (2%)
Trzeci (≥ 27 tygodni)	1 (0%)

\* Przedstawione próbki końcowe obejmowały 7 par bliźniąt.

## Wyniki kliniczne

Wyniki testu VeriSeq NIPT Solution v2 porównano z wynikami referencyjnymi uzyskiwanymi dla standardu klinicznego. W odniesieniu do wszystkich próbek włączonych do badania dostępne były uzyskane dla standardu klinicznego (potwierdzonych danych klinicznych) wyniki referencyjne dotyczące statusu aneuploidii chromosomów u płodu oraz częściowych delecji i duplikacji o wielkości co najmniej 7 Mb. Wynik referencyjny dla standardu klinicznego do próbek uwzględnionych w tym badaniu uzyskano na podstawie wyników analizy chromosomów lub badania fizykalnego noworodka z ujemnym wynikiem badania przesiewowego NIPT metodą

NGS. Klasyfikację danych referencyjnych dla standardów klinicznych przeprowadził przeszkolony personel badawczy zgodnie z dokumentem dotyczącym zasad kodowania informacji medycznych przekazany przez sponsora.

Metody analizy chromosomów obejmowały kariotypowanie, fluorescencyjną hybrydyzację in situ (FISH, fluorescence in situ hybridization) lub porównawczą hybrydyzację genomową z wykorzystaniem mikromacierzy chromosomalnych (CMA, chromosome microarray). Analizę chromosomów przeprowadzono na próbkach krwi obwodowej lub śliny noworodka lub niemowlęcia, próbkach produktów zapłodnienia (POC, products of conception), amniocytach, kosmkach kosmówki, tkankach łożyska lub krwi pępowinowej pobranej po urodzeniu.

Mozaicyzm zdefiniowano jako obecność u osobnika dwóch lub więcej linii komórkowych o różnym składzie chromosomowym. Linie komórkowe pochodzą z tej samej zygoty. Rodzaj i poziom mozaicyzmu różni się i zależy od czasu wystąpienia zdarzeń mozaicyzmu w trakcie embriogenezy i rozwoju płodu. W rozpoznaniach prenatalnych występują różne rodzaje mozaicyzmu w zależności od występowania nieprawidłowych i prawidłowych linii komórkowych w cytotrofoblastach, mezenchymie lub płodzie<sup>10</sup>. Mozaicyzm można zaobserwować w przypadku każdej anomalii chromosomalnej, jednak częstość występowania mozaicyzmu w rzadkich trisomiach jest wyższa niż w trisomiach chromosomów 21, 18 i 13 (T21, T18 i T13)<sup>11</sup>. W ramach walidacji wyników testu przypadki mozaicyzmu uwzględniono w analizie całego genomu, ponieważ celem badań przesiewowych całego genomu wykonywanych przy użyciu tego testu jest wykrycie rzadkich aneuploidii autosomalnych (RAA, rare autosomal aneuploidy).

## Wyniki podstawowych badań przesiewowych

W podstawowych badaniach przesiewowych uwzględniono następujące anomalie: T21, T18 i T13. Do analizy włączono 2243 próbki z ciąży pojedynczych i bliźniaczych. We wszystkich siedmiu ciążach bliźniaczych prawidłowo wykryto status T21 i nie przedstawiono ich w poniższej tabeli.

Tabela 8 Czulość i swoistość testu VeriSeq NIPT Solution v2 w wykrywaniu trisomii 21, 18 i 13 w podstawowych badaniach przesiewowych ciąży pojedynczych (z wyłączeniem rozpoznanych mozaicyzmów)

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

W analizie wyników uzyskanych dla testu w ramach podstawowych badań przesiewowych (patrz [Tabela 8](#)) nie uwzględniono podzbioru 64 próbek z RAA, autosomalnymi częściowymi delecjami lub duplikacjami albo rozpoznany mozaicyzmem. Wyłączone 64 próbki obejmowały osiem mozaicyzmów T21 i trzy mozaicyzmy T18. W pięciu z tych 11 próbek stwierdzono anomalię wykrytą przez oprogramowanie VeriSeq NIPT Assay Software v2.

## Wyniki badań przesiewowych całego genomu

Anomalie uwzględnione w badaniu przesiewowym całego genomu obejmują trisomie, monosomie oraz częściowe delecje lub duplikacje o wielkości co najmniej 7 Mb. Do badania przesiewowego całego genomu włączono 36 próbek z rozpoznanym mozaicyzmem. Przebadano łącznie 2307 próbek z ciąż pojedynczych i bliźniaczych. We wszystkich siedmiu ciążach bliźniaczych prawidłowo wykryto status anomalii chromosomu 21 i nie przedstawiono ich w poniższej tabeli.

### Wyniki badania przesiewowego całego genomu — wykrywanie dowolnej anomalii

Tabela 9 Czulość i swoistość testu VeriSeq NIPT Solution v2 w wykrywaniu dowolnych anomalii w badaniu przesiewowym całego genomu (w tym rozpoznanych mozaicyzmów)

	Czulość	Swoistość
Szacunkowy % (n/N)	95,5% (318/333)	99,34% (1954/1967)
Dwustronny 95% CI	92,7%; 97,3%	98,87%; 99,61%

### Wyniki badania przesiewowego całego genomu — wykrywanie rzadkiej aneuploidii autosomalnej

Tabela 10 Czulość i swoistość testu VeriSeq NIPT Solution v2 w wykrywaniu rzadkiej aneuploidii autosomalnej (RAA, Rare Autosomal Aneuploidy) w badaniu przesiewowym całego genomu (w tym rozpoznanych mozaicyzmów)

	Czulość	Swoistość
Szacunkowy % (n/N)	96,4% (27/28)	99,80% (2001/2005)
Dwustronny 95% CI	82,3%; 99,4%	99,49%; 99,92%

### Wyniki badania przesiewowego całego genomu — wykrywanie częściowych delecji i duplikacji

Tabela 11 Czulość i swoistość testu VeriSeq NIPT Solution v2 w wykrywaniu częściowych delecji i duplikacji o wielkości co najmniej 7 Mb w badaniu przesiewowym całego genomu (w tym rozpoznanych mozaicyzmów)

	Czulość	Swoistość
Szacunkowy % (n/N)	74,1% (20/27)	99,80% (2000/2004)
Dwustronny 95% CI	55,3%; 86,8%	99,49%; 99,92%

## Różnice w wynikach podstawowych badań przesiewowych i badań przesiewowych obejmujących cały genom

Metodologia oznaczeń często występujących trisomii i aneuploidii chromosomów płci jest taka sama zarówno w podstawowych badaniach przesiewowych, jak i w badaniach przesiewowych obejmujących cały genom. W podstawowym badaniu przesiewowym stosuje się algorytm uwzględniający wyłącznie T21, T18 i T13. Jednak metodologia badania przesiewowego całego genomu wykracza poza ten zakres, gdyż ocenia się w nim wszystkie trisomie i RAA, a także częściowe duplikacje i delecje.

Istnieją dwie różnice w przedstawionej ocenie wyników uzyskanych dla testu w ramach podstawowych badań przesiewowych i badań przesiewowych obejmujących cały genom. Po pierwsze, w ocenie wyników uzyskanych dla testu w ramach badania przesiewowego obejmującego cały genom uwzględniono próbki z rozpoznanym mozaicyzmem, zarówno często występujących trisomii, jak i RAA oraz częściowych delecji i duplikacji. Po drugie, badanie przesiewowe całego genomu może preferencyjnie raportować wykrycie częściowej duplikacji lub delecji zamiast pełnej trisomii. Obecność pełnej trisomii, w uzupełnieniu częściowej duplikacji lub delecji, można stwierdzić, odwołując się do wartości LLR przedstawionej w raporcie uzupełniającym.

### Uwzględnianie mozaicyzmu w badaniu przesiewowym całego genomu

Mozaicyzm wskazano jako ograniczenie tego oznaczenia. W przypadku występowania mozaicyzmu sygnał płodowy wskazujący na występowanie anomalii jest osłabiony i dlatego może być trudniejszy do wykrycia przy zachowaniu ogólnej swoistości oznaczenia. Mozaicyzm jest bardziej istotny w badaniach o szerszym spektrum, dlatego próbki z mozaicyzmem zostały uwzględnione w badaniach przesiewowych całego genomu.

Mozaicyzm wykryto w 36 spośród 64 próbek uwzględnionych w badaniu przesiewowym obejmującym cały genom, ale nie w podstawowym badaniu przesiewowym. W badaniu użyto referencyjnego standardu klinicznego. Spośród tych 36 próbek 23 rozpoznania odpowiadały referencyjnemu standardowi klinicznemu.

### Wykrywanie delecji lub duplikacji częściowych a wykrywanie aneuploidii całego chromosomu

W opcjach menu testu VeriSeq NIPT Solution v2 uwzględniono zarówno podstawowe badania przesiewowe, jak i badania przesiewowe całego genomu. Wynik ANOMALY DETECTED (Wykryto anomalię) w podstawowym badaniu przesiewowym jest raportowany tylko w przypadku wykrycia pełnej aneuploidii chromosomów 21, 18 lub 13 i jeśli spełnione są wszystkie wskaźniki kontroli jakości. W badaniu przesiewowym całego genomu test wykrywa aneuploidie dotyczące wszystkich autosomów oraz zdarzenia częściowej delecji i duplikacji o wielkości co najmniej 7 Mb.

W ramach badania przesiewowego całego genomu, w przypadkach, gdy zdarzenie dotyczące całego chromosomu, a także zdarzenie CNV w tym samym chromosomie, przekracza próg LLR, system w pierwszej kolejności raportuje zdarzenia częściowej delecji lub duplikacji całego chromosomu, jeśli częściowa delecja lub duplikacja pokrywa nie więcej niż 75% chromosomu, którego dotyczyło zdarzenie. Jeśli wykryty region częściowej delecji i duplikacji stanowi więcej niż 75% chromosomu, zdarzenie jest klasyfikowane jako pełna

trisomia lub monosomia całego chromosomu, o ile jednocześnie przekroczony jest próg LLR całego chromosomu. Z tego względu stosunkowo duże delecje i duplikacje, które stanowią nie więcej niż 75% chromosomu, mogą zasadniczo wskazywać na aneuploidię całego chromosomu.

Wartość LLR klasyfikacji całego chromosomu we wszystkich próbkach jest dostępna w raporcie uzupełniającym. Wartość LLR należy w pierwszej kolejności (tj. przed interpretacją wyniku) porównać z określoną wartością odcięcia (patrz [Rysunek 2](#)). Na przykład rozpoznanie CNV, w którym wartość LLR na poziomie chromosomu przekracza wartość odcięcia, stanowi dodatkowe wskazanie uzasadniające interpretację wyniku jako aneuploidii całego chromosomu — przykład przedstawia [Tabela 12](#).

W badaniu klinicznym uwzględniono dwie próbki z ciąż pojedynczych ze względnie dużymi duplikacjami (jedna na chromosomie 21 i jedna na chromosomie 18), które stanowiły mniej niż 75% względnej wielkości chromosomu (patrz [Tabela 12](#)). Oba zdarzenia zostały zgłoszone jako częściowe duplikacje, a nie pełna trisomia tego chromosomu. Wartości LLR dla tych zdarzeń przekraczały wartość graniczną i wskazywały tym samym na pełną trisomię. Po rozpoznaniu częściowej duplikacji lub pełnej trisomii w badaniu NIPT oferuje się pacjentce możliwość potwierdzenia wyniku metodami diagnostyki prenatalnej.

Tabela 12 Przykłady zdarzeń w postaci dużych duplikacji wykrytych w badaniu przesiewowym całego genomu

	<b>Potwierdzone dane kliniczne</b>	<b>Wynik badania całego genomu w systemie</b>	<b>Wielkość anomalii (Mb)</b>	<b>% chromosomu</b>	<b>Wartość LLR</b>
Próbka 1	Trisomia 21 w ciąży pojedynczej	Częściowa duplikacja na chromosomie 21	22,50	48,9	19,43
Próbka 2	Trisomia 18 w ciąży pojedynczej	Częściowa duplikacja na chromosomie 18	47,00	60,2	12,99

Dodatkowe informacje na temat wskaźników kontroli jakości używanych do raportowania wyników aneuploidii można znaleźć w *Przewodniku użytkownika oprogramowania VeriSeq NIPT Solution v2* (nr dokumentu: 1000000067940).

## Chromosomy płci

Wyniki oznaczenia chromosomów płci w teście VeriSeq NIPT Solution v2 porównano z referencyjnym standardem klinicznym i przedstawiono w poniższej tabeli. Procentową zgodność z każdym wynikiem uzyskanym dla referencyjnego standardu klinicznego obliczono w odniesieniu do każdego chromosomu płci. Procentową zgodność obliczono jako liczbę próbek, w których rozpoznanie chromosomu płci w teście VeriSeq NIPT Solution v2 odpowiadało klasyfikacji według referencyjnego standardu klinicznego, podzieloną przez łączną liczbę próbek z taką samą klasyfikacją zgodną z referencyjnym standardem klinicznym.

Tabela 13 Procentowa zgodność klasyfikacji płci płodu\*

Klasyfikacja płci płodu	Karyotyp	Fenotyp wg badania fizykalnego noworodka		Wyniki cytogenetyczne							
		Kobieta	Mężczyzna	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY	Inne**	Brak
Nie wykryto anomalii	XX	997	0	21	0	2	0	0	0	0	0
Nie wykryto anomalii	XY	0	966	0	15	0	0	0	0	0	1
Wykryto anomalię	XO	0	0	0	0	19	0	0	1	0	0
Wykryto anomalię	XXX	0	0	0	0	0	17	0	0	1	0
Wykryto anomalię	XXY	0	0	0	0	0	0	23	0	1	0
Wykryto anomalię	XYY	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0
Łącznie		997	966	21	15	21	17	23	12	2	1
Procentowa zgodność		100	100	100	100	90,5	100	100	91,7	Nie dotyczy	Nie dotyczy

\* Pięć ciąży bliźniaczych zostało prawidłowo zaklasyfikowanych jako zawierające chromosom Y. Dwie ciąży zostały poprawnie zaklasyfikowane jako pozbawione chromosomu Y.

\*\* Inne wyniki cytogenetyczne to XXXXX i XXYY.

## Wartość predykcyjna dodatnia i wartość predykcyjna ujemna testu VeriSeq NIPT Solution v2

Wartość predykcyjna dodatnia (PPV, positive predictive value) i wartość predykcyjna ujemna (NPV, negative predictive value) testu wskazują, czy informacje uzyskane w oznaczeniu mogą stanowić podstawę decyzji klinicznych w oparciu o czułość i swoistość testu oraz wyjściową wartość prawdopodobieństwa, że płód jest dotknięty trisomią (częstość występowania). Wartości PPV i NPV zależą od częstości występowania tych aneuploidii, która może się różnić w populacjach badanych. W związku z tym wartości PPV i NPV obliczono dla zakresu prawdopodobnych częstości występowania, w oparciu o czułość i swoistość podstawowego badania przesiewowego (bez rozpoznanych mozaicyzmów) w ramach klinicznego badania dokładności diagnostycznej. [Tabela 17](#) dotyczy badania przesiewowego całego genomu (z uwzględnieniem rozpoznanych mozaicyzmów).

Tabela 14 Częstość występowania trisomii 21 oraz wartości PPV i NPV w podstawowym badaniu przesiewowym (z wyłączeniem rozpoznanych mozaicyzmów)

Częstość występowania (%)	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

Tabela 15 Częstość występowania trisomii 18 oraz wartości PPV i NPV w podstawowym badaniu przesiewowym (z wyłączeniem rozpoznanych mozaicyzmów)

Częstość występowania (%)	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

Tabela 16 Częstość występowania trisomii 13 oraz wartości PPV i NPV w podstawowym badaniu przesiewowym (z wyłączeniem rozpoznanych mozaicyzmów)

Częstość występowania (%)	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

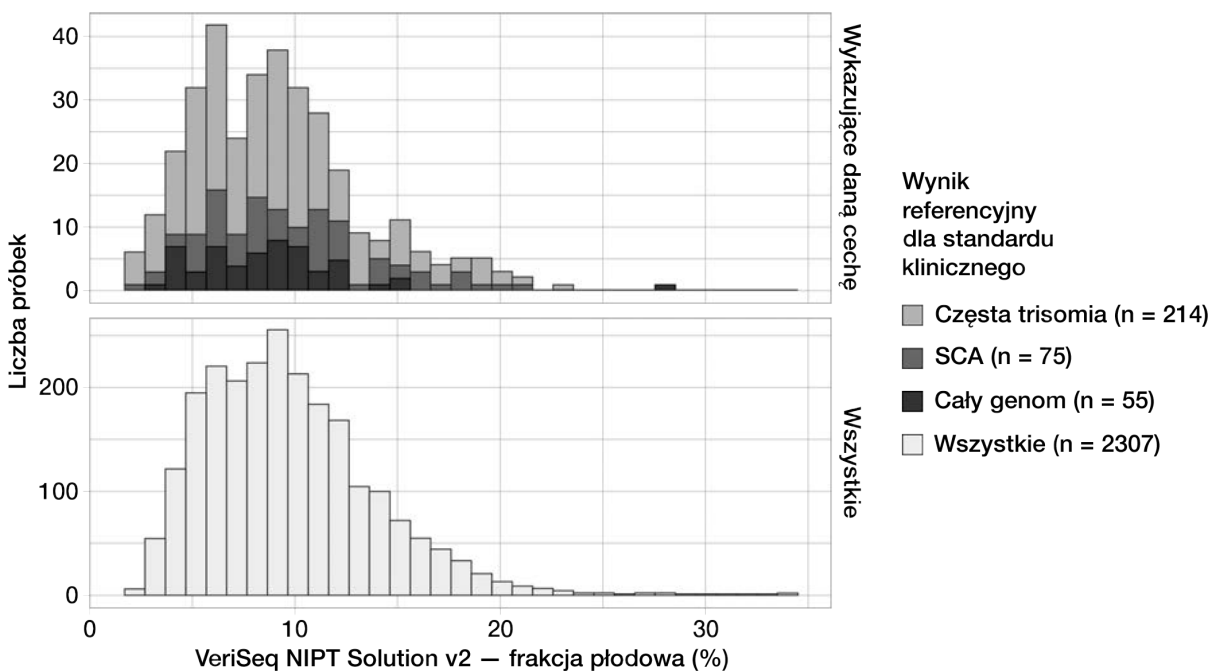
Tabela 17 Częstość występowania dowolnych anomalii oraz wartości PPV i NPV w badaniu przesiewowym całego genomu (z uwzględnieniem rozpoznanych mozaicyzmów)

Częstość występowania (%)	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

## Rozkład frakcji płodowej

Szacunkowy rozkład frakcji płodowej (FF, fetal fraction) w teście VeriSeq NIPT Solution v2 uzyskany w badaniach przesiewowych całego genomu z uwzględnieniem mozaicyzmu (według kategorii wyniku referencyjnego standardu klinicznego) przedstawia [Rysunek 1](#).

Rysunek 1 Rozkład frakcji płodowej



5 próbek wykazało anomalie w wielu kategoriach.  
 Często trisomia obejmuje próbki z trisomią 21, 18 i/lub 13.  
 Cały genom obejmuje próbki z RAA lub częściowymi delecjami i/lub duplikacjami.



Szacunkowe wartości FF mieściły się w zakresie od 2% do 34%, przy czym mediana wynosiła 9%, a przedział międzykwartylowy (IQ, interquartile) od 6% do 12%. Mediana szacunkowej wartości FF dla często występujących trisomii i zdarzeń wykrytych w badaniu przesiewowym całego genomu wynosi 8%, a dla SCA — 9%. We wszystkich wynikach oznaczeń uzyskano spójny zakres szacunkowej wartości FF. Nie wykazano żadnej istotnej zmiany w rozkładzie FF w odniesieniu do częstych trisomii, SCA, zdarzeń wykrytych w badaniu przesiewowym całego genomu ani wszystkich próbek uwzględnionych w analizie całego genomu.

## Wyniki testu w ciążach bliźniaczych

### Oszacowanie wykrywalności trisomii 13, 18 i 21 oraz chromosomu Y w ciążach bliźniaczych

Ze względu na niską częstość występowania trisomii 21, 18 i 13 w ciążach bliźniaczych, dostępna była jedynie niewielka liczba próbek z ciąż bliźniaczych z rozpoznaniem tych aberracji, których można było użyć w badaniu. Aby oszacować wyniki testu VeriSeq NIPT Solution v2 w ciążach bliźniaczych, do symulacji populacji ciąż bliźniaczych wykorzystano modele *in silico* oparte na obserwacjach z próbek klinicznych. Symulacja odzwierciedlała populację docelową. Rozkład frakcji płodowej określono na podstawie około 4500 próbek z ciąż bliźniaczych i porównano z rozkładem z około 120 000 próbek z ciąż pojedynczych. Rozkład frakcji płodowej w zależności od statusu aneuploidii określono na podstawie domniemanych rozpoznań z ciąż pojedynczych (1044 trisomii 21, 307 trisomii 18 i 192 trisomii 13). Połączenie tych dwóch rozkładów umożliwiło oszacowanie wykrywalności aneuploidii w ciążach bliźniaczych. Przeprowadzono symulację obejmującą zestawy bliźniąt dwuzygotycznych i monozygotycznych. W celu oszacowania czułości testu przyjęto średnią ważoną odzwierciedlającą częstość ich występowania w populacji docelowej (w stosunku 2:1 dla odpowiednio bliźniąt dwuzygotycznych i monozygotycznych). Przeprowadzono symulację w odniesieniu do zestawów bliźniąt bez aberracji, aby uzyskać dane na temat swoistości testu.

Frakcję każdej symulowanej próbki z trisomią (tj. frakcję z aberracją) obliczono w odmienny sposób dla każdej kategorii próbek:

- W przypadku bliźniąt monozygotycznych przyjęto, że frakcja z aberracją w każdej próbce wynosi 1,0, ponieważ w tym przypadku trisomia dotyczy obu bliźniąt.
- W przypadku bliźniąt dwuzygotycznych przyjęto, że aberracja dotyczy tylko jednego bliźniaka (występowanie aberracji u obu bliźniąt dwuzygotycznych jest niezwykle rzadkie). Wartości frakcji z aberracją symulowano przy użyciu znanego rozkładu wskaźników frakcji płodowej, określonych na podstawie próbek klinicznych bliźniąt różnej płci. Przyjęto zachowawcze podejście, zakładając, że u bliźniaka z aberracją zawsze występowała niższa frakcja płodowa niż u drugiego bliźniaka. Zastosowano współczynnik korygujący dla frakcji płodowych, które były średnio niższe w ciążach z trisomią 13 i 18.
- W przypadku bliźniąt bez aberracji przyjęto, że frakcja z aberracją w każdej próbce wynosi zero.

W przypadku bliźniąt dotkniętych trisomią 18 lub 13 obniżono frakcję płodową w próbce do poziomu frakcji z aberracją. Redukcja frakcji płodowej była proporcjonalna do średniej redukcji frakcji płodowej wyliczonej z danych klinicznych dotyczących trisomii 18 lub 13 w ciążach pojedynczych w porównaniu z płodami euploidalnymi z ciąż pojedynczych.

Następnie wynik oznaczenia aneuploidii wyliczono przy użyciu standardowego algorytmu VeriSeq NIPT Solution v2 przy uwzględnieniu zarówno całkowitej frakcji płodowej, jak i frakcji z aberracją w każdej symulowanej próbce. Czulość testu wyliczono, określając, jak często wyniki aneuploidii dla symulowanych bliźniąt z aberracją przekraczały odnośną wartość graniczną dla aneuploidii. Z kolei swoistość testu wyliczono, określając, jak często wyniki aneuploidii dla symulowanych zdrowych bliźniąt były poniżej wartości granicznej dla aneuploidii (Tabela 18). 95% przedziały ufności oszacowano na podstawie liczby rzeczywistych klinicznych próbek bliźniąt w pierwotnym zbiorze danych, u których wykryto lub wykluczono odnośną trisomię.

Przeprowadzono symulację obejmującą zestawy bliźniąt XY/XY i XX/XY, aby oszacować czulość wykrywania chromosomu Y w próbkach z ciąży bliźniaczych. Przyjęto średnią ważoną odzwierciedlającą częstość występowania w populacji docelowej (1 XY/XY: 1 XX/XY). Przeprowadzono symulację obejmującą zestaw bliźniąt XX/XX, aby oszacować swoistość wykrywania chromosomu Y w ciąży bliźniaczej. Symulację wartości całkowitej frakcji płodowej przeprowadzono na podstawie znanego rozkładu frakcji płodowej w klinicznych próbkach z ciąży bliźniaczych.

Wyniki oznaczeń chromosomu Y w odniesieniu do bliźniąt XY/XY i XX/XY zostały oszacowane na podstawie znanej zależności między frakcją płodową a wynikami oznaczenia chromosomu Y w klinicznych próbkach uzyskanych od płodów męskich z ciąży pojedynczych. Wartości frakcji płodowej z docelową cechą (tj. mężczyzn) w odniesieniu do bliźniąt XX/XY symulowano przy użyciu znanego rozkładu wskaźników frakcji płodowej między bliźniętami z tej samej ciąży, określonych na podstawie klinicznych próbek uzyskanych od bliźniąt różnej płci. Przyjęto zachowawcze podejście, w którym frakcja z docelową cechą została wybrana tak, aby odpowiadała niższej wartości frakcji jednego z dwóch bliźniąt. Wynik oznaczenia chromosomu Y pomnożono przez frakcję z docelową cechą dla każdej symulowanej próbki XX/XY.

Wyniki oznaczeń chromosomu Y u bliźniąt XX/XX pochodzą z próbkowania wyników uzyskanych w klinicznych próbkach pobranych od płodów żeńskich z ciąży pojedynczych. Wynik oznaczenia chromosomu Y i ogólną frakcję płodową wykorzystano następnie do sklasyfikowania każdej próbki symulowanej jako posiadającej chromosom Y lub pozbawionej chromosomu Y przy użyciu standardowego algorytmu VeriSeq NIPT Solution v2.

Czulość testu wyliczono, określając, jak często symulowane bliźnięta XY/XY lub XX/XY były prawidłowo sklasyfikowane jako posiadające chromosom Y. Swoistość testu wyliczono, określając, jak często symulowane bliźnięta XX/XX były prawidłowo sklasyfikowane jako pozbawione chromosomu Y. 95% przedziały ufności oszacowano na podstawie liczby rzeczywistych klinicznych próbek uzyskanych z ciąży bliźniaczych w pierwotnym zestawie danych, które zostały sklasyfikowane jako posiadające chromosom Y lub go pozbawione.

Tabela 18 Szacunkowe wyniki oznaczeń trisomii 21, 18 i 13 w symulowanej populacji ciąży bliźniaczych

	<b>Trisomia 21</b>	<b>Trisomia 18</b>	<b>Trisomia 13</b>	<b>Obecność chromosomu Y</b>
Czulość	96,4%	95,7%	93,6%	> 99,9%
Dwustronny 95% CI	(86,4%; 98,9%)	(68,3%; 99,4%)	(64,1%; 98,9%)	(99,9%; > 99,9%)
Swoistość	99,9%	> 99,9%	> 99,9%	> 99,9%

	Trisomia 21	Trisomia 18	Trisomia 13	Obecność chromosomu Y
Dwustronny 95% CI	(99,8%; > 99,9%)	(99,9%; > 99,9%)	(99,9%; > 99,9%)	(99,7%; > 99,9%)

**Tabela 18** przedstawia oszacowanie punktowe i szacunkowe 95% przedziały ufności w odniesieniu do czułości i swoistości testu VeriSeq NIPT Solution v2 pod względem wykrywania trisomii 21, 18 i 13 oraz obecności chromosomu Y w symulowanej populacji ciąży bliźniaczych zgodnej z populacją docelową. Przedziały ufności oszacowano na podstawie liczby klinicznych próbek bliźniąt, które przeszły kontrolę jakości, sklasyfikowanych jako próbki z obecnością lub brakiem odnośnej trisomii. W obliczeniu czułości testu przyjęto, że dwie trzecie ciąży bliźniaczych z dodatnim statusem trisomii to ciążę dwuzygotyczne z jednym bliźniakiem, u którego występuje trisomia, podczas gdy jedna trzecia ciąży bliźniaczych z dodatnim statusem trisomii to ciążę monozygotyczne, w których trisomia występuje u obu bliźniąt.

Szacunkowe dane, które przedstawia **Tabela 18**, dotyczą wyłącznie ciąży bliźniaczych. Dane dotyczące ciąży mnogich wyższego rzędu (trojaczków lub większej liczby płodów) były niewystarczające do opracowania odpowiednich modeli statystycznych, umożliwiających oszacowanie dokładności wykrywania aneuploidii ze względu na jeszcze niższą częstość występowania tego typu ciąży.

## Wydajność analityczna

### Precyzja

Przeprowadzono ponowną analizę danych, aby ocenić i wyznaczyć precyzję testu. Dane analizowano za pomocą oprogramowania analitycznego VeriSeq NIPT Solution v2, użytego w dwóch poprzednich badaniach z użyciem rozwiązania VeriSeq NIPT Solution:

- Badaniu odtwarzalności w różnych laboratoriach, które obejmowało trzy przebiegi przeprowadzone przez trzech operatorów w trzech laboratoriach przy użyciu jednej partii odczynnika (w sumie dziewięć przebiegów).
- Badaniu wewnątrzlaboratoryjnej precyzji oznaczeń, które obejmowało 12 przebiegów przeprowadzonych w jednym laboratorium przy użyciu dwóch stacji ML STAR, dwóch systemów do obsługi aparatów do sekwencjonowania i trzech partii odczynników do sekwencjonowania.

Celem badania precyzji było ilościowe określenie precyzji oznaczenia ukierunkowanego na wykrycie trisomii 21 (T21) i chromosomu Y oraz oszacowanie zmienności między różnymi aparatami, zestawami do przygotowywania bibliotek i partiami odczynników do sekwencjonowania. Odtwarzalność w odniesieniu do warunków nieopisanych powyżej nie była oceniana w ramach tych badań.

Pulę T21 zawierającą 5% frakcji płodowej utworzono przez połączenie cfDNA wyizolowanego z osocza matczyńskiego pochodzącego od kobiet w ciąży (z płodem dotkniętym T21) i cfDNA wyizolowanego z osocza kobiet niebędących w ciąży. Utworzono również pulę cfDNA matczyno-męskiego (płód XY) zawierającą 10% frakcji płodowej. Panel próbek do każdego badania i w każdym przebiegu obejmował 4 powtórzenia dla puli próbek z rozpoznaniem T21 zawierającej 5% frakcji płodowej i 20 powtórzeń dla puli cfDNA matczyno-męskiego zawierającej 10% frakcji płodowej. Testowanie prowadzono przez 10 dni. Łącznie wykonano 21 przebiegów w obu badaniach.

Do oceny wybrano obecność T21 i chromosomu Y ze względu na reprezentatywność tych stanów klinicznych i złożoność wykrywania anomalii. Rozmiar chromosomu 21, najmniejszego ludzkiego autosomu, ma bezpośredni wpływ na czułość wykrywania T21, szczególnie przy niskich wartościach frakcji płodowej, takich jak te stosowane w tym badaniu. Chromosom Y obecny w osoczu matki jest pochodzenia wyłącznie płodowego i dlatego łatwiej go wykryć w oznaczeniu.

Zaobserwowane średnie i odchylenia standardowe w odniesieniu do logarytmicznego wskaźnika wiarygodności (LLR, log-likelihood ratio) dla chromosomu 21 i znormalizowanych wartości chromosomalnych (NCV, normalized chromosomal value) dla chromosomu Y wskazują, że największym źródłem zmienności było odchylenie standardowe (SD, standard deviation) powtórzeń. Różnice między laboratoriami, aparatami i seriami odczytników były źródłem nieznacznej zmienności, o czym świadczy różnica między całkowitym SD a SD powtórzeń — dane przedstawia [Tabela 19](#) i [Tabela 20](#).

Tabela 19 Podsumowanie wartości odchylenia standardowego (SD) w sekwencjonowaniu wykonywanym w różnych laboratoriach (odtworzalność)

Odpowiedź	N	Średnia	SD powtórzeń	Całkowite SD (odtworzalność)*
Wartość LLR dla chromosomu 21	36	34,43	11,36	11,36
Wartość NCV dla chromosomu Y	180	190,56	7,96	10,20

\* Całkowite SD uwzględnia zmienność w odniesieniu do laboratorium, operatora, przebiegu, dnia i powtórzenia.

Tabela 20 Podsumowanie wewnątrzlaboratoryjnej precyzji w sekwencjonowaniu

Odpowiedź	N	Średnia	SD powtórzeń	Całkowite SD wewnątrzlaboratoryjne*
Wartość LLR dla chromosomu 21	48	36,01	9,07	10,25
Wartość NCV dla chromosomu Y	240	198,68	7,63	7,82

\* Całkowite SD wewnątrzlaboratoryjne uwzględnia zmienność w odniesieniu do aparatu do sekwencjonowania, partii odczytnika, operatora, przebiegu, dnia i powtórzenia.

Przeprowadzono dodatkowe badanie w celu porównania precyzji sekwencjonowania z użyciem testu VeriSeq NIPT Solution v2 (całkowite odchylenie standardowe) z komorą przepływową w wersji 2.0 i 2.5. Badanie obejmowało dwa typy komór przepływowych (wersje 2.0 i 2.5), trzy serie zestawów do sekwencjonowania, cztery aparaty i dwa przebiegi sekwencjonowania w każdej kombinacji, co daje łącznie 48 przebiegów wykonanych w jednym laboratorium. Z przygotowanych ręcznie płytek cfDNA przygotowano jedną pulę do sekwencjonowania. Panel próbek obejmował 4 powtórzenia w puli próbek z rozpoznaniem T21, która zawierała 5% frakcji płodowej, oraz 20 powtórzeń w puli próbek z cfDNA matczyno-męskim (płód XY), która zawierała

10% frakcji płodowej. Wyniki badania przedstawia [Tabela 21](#). Nie wykazano żadnej różnicy w precyzji sekwencjonowania przy użyciu komory przepływowej w wersji 2.0 w porównaniu z komorą przepływową w wersji 2.5.

Tabela 21 Podsumowanie precyzji sekwencjonowania przy użyciu komory przepływowej w wersji 2.0 w porównaniu z komorą przepływową w wersji 2.5

Odpowiedź	Liczba obserwacji wykonanych przy użyciu danej wersji komory	Całkowite SD* — komora przepływowa w wersji 2.0	Całkowite SD* — komora przepływowa w wersji 2.5	Wynik statystyczny**
Wartość LLR dla chromosomu 21	96	9,56	8,44	Statystycznie równoważne (wartość-p = 0,25)
Wartość NCV dla chromosomu Y	480	7,74	7,38	Statystycznie równoważne (wartość-p = 0,38)

\* Całkowite SD uwzględnia zmienność w odniesieniu do aparatu do sekwencjonowania, partii odczynnika, przebiegu, dnia i powtórzenia.

\*\* W oparciu o test Fischera równości wariancji (odchylenia standardowe do kwadratu).

## Zanieczyszczenie krzyżowe

Zanieczyszczenie krzyżowe zostało ocenione w ramach procedury przygotowania próbki do testu VeriSeq NIPT Solution. Pule osocza pochodzące od kobiet niebędących w ciąży (XX) i dorosłych mężczyzn (XY) testowano w układzie szachownicy w 4 płytkach po 96 dołków każda. W badaniu użyto  $n = 48$  próbek płci żeńskiej i męskiej na płytkę, czyli w sumie 192 próbki żeńskie i 192 próbki męskie. W żadnej próbce żeńskiej nie wykryto obecności chromosomu Y, a uzyskany wynik był statystycznie wyższy niż oszacowana wartość ogólna, co wskazuje na brak zanieczyszczenia krzyżowego z próbek męskich znajdujących się na tej samej płytce. Nie zaobserwowano wykrywalnego zanieczyszczenia krzyżowego w teście VeriSeq NIPT Solution.

## Substancje potencjalnie zakłócające

Wpływ substancji potencjalnie zakłócających na wyniki testu VeriSeq NIPT Solution oceniono na podstawie wyników oznaczeń uzyskanych w obecności odnośnych substancji.

Do puli osocza matczynego pobranego od kobiety będącej w ciąży ze zdrowym płodem płci żeńskiej (płód XX) dodawano albuminę, bilirubinę, hemoglobinę i trójglicerydy (endogenne). Wykonano testy dla każdej badanej substancji w dwóch stężeniach ( $n = 16$  dla każdej substancji). Nie zaobserwowano żadnych zakłóceń w wykonywanych oznaczeniach.

Tabela 22 Substancje potencjalnie zakłócające (endogenne)

Substancja testowana	Niskie stężenie testowe (mg/ml)	Wysokie stężenie testowe (mg/ml)
Albumina	35	50
Bilirubina	0,01	0,15
Hemoglobina	100	200
Trójglicerydy	1,5	5

Na wyniki testu może również wpływać występujące w osoczu matczyne genomowe DNA (gDNA), które może zostać wyizolowane z próbki wraz z cfDNA płodu. Do cfDNA wyizolowanego z osocza matczynego pobranego od kobiety będącej w ciąży ze zdrowym płodem płci żeńskiej (płód XX) dodano 1,6; 3,3 i 4,9 ng genomowego DNA na próbkę (odpowiednio 1, 2 i 3 odchylenia standardowe powyżej średniego oczekiwanego stężenia gDNA po 7 dniach przechowywania próbki krwi pełnej<sup>12</sup>). Następnie próbki badano przy użyciu testu VeriSeq NIPT Solution (n = 16 dla każdego stężenia). Nie zaobserwowano żadnych zakłóceń w wynikach oznaczenia w obecności gDNA o podwyższonym stężeniu.

Dwadzieścia substancji potencjalnie zakłócających pochodzących z leków powszechnie stosowanych lub przepisywanych w czasie ciąży (egzogennych) przebadano zgodnie z dokumentem EP7-A2 Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline-Second Edition (Wytyczne badania zakłóceń w biochemii klinicznej, wydanie drugie). 20 substancji potencjalnie zakłócających połączono w cztery pule, dodano do osocza matczynego pobranego od kobiety będącej w ciąży ze zdrowym płodem płci żeńskiej (płód XX) i wykonano test VeriSeq NIPT Solution (N = 16 dla każdej puli). Nie zaobserwowano żadnych zakłóceń w wynikach oznaczeń w obecności tych substancji egzogennych.

Tabela 23 Substancje potencjalnie zakłócające (egzogenne)

Pula 1	Pula 2	Pula 3	Pula 4
Acetaminofen	Difenhydramina	Albuterol	Cetyryzyna
Acetylocysteina	Erytromycyna	Bupropion	Dekstrometorfan
Bisoprolol	Gwajafenezyna	Kofeina	Kwas l-askorbinowy
Citalopram	Heparyna	Sertralina	Metoprolol
Desloratadyna	Lidokaina	Fluorek sodu	Nadolol

## Granica wykrywalności

Granice wykrywalności (LOD, Limit of Detection) zdefiniowano jako poziom frakcji płodowej, który odpowiada 95% prawdopodobieństwu wykrycia danej aberracji, np. T21. Przeprowadzono badania i analizy statystyczne, aby ocenić granicę wykrywalności różnych powszechnych aberracji przy pomocy testu VeriSeq NIPT Solution v2.

Prawdopodobieństwo wykrycia danej aberracji w próbce poddanej analizie przy użyciu testu VeriSeq NIPT Solution v2 zasadniczo zależy od trzech czynników:

- frakcji płodowej,

- głębokości sekwencjonowania,
- wielkości i złożoności docelowego regionu genomu.

Przy założeniu stałej głębokości sekwencjonowania daną aberrację łatwiej wykryć w próbce zawierającej wyższy odsetek frakcji płodowej niż w próbce z niższym odsetkiem frakcji płodowej. I odwrotnie, zakładając, że frakcja płodowa jest stała, dana aberracja jest łatwiejsza do wykrycia w próbce charakteryzującej się większą głębokością sekwencjonowania niż w próbce o mniejszej głębokości sekwencjonowania. Z kolei aberracje zlokalizowane w mniejszych lub bardziej złożonych regionach genomowych są trudniejsze do wykrycia niż aberracje umiejscowione w większych lub mniej złożonych regionach genomowych, przy założeniu stałej frakcji płodowej i głębokości sekwencjonowania.

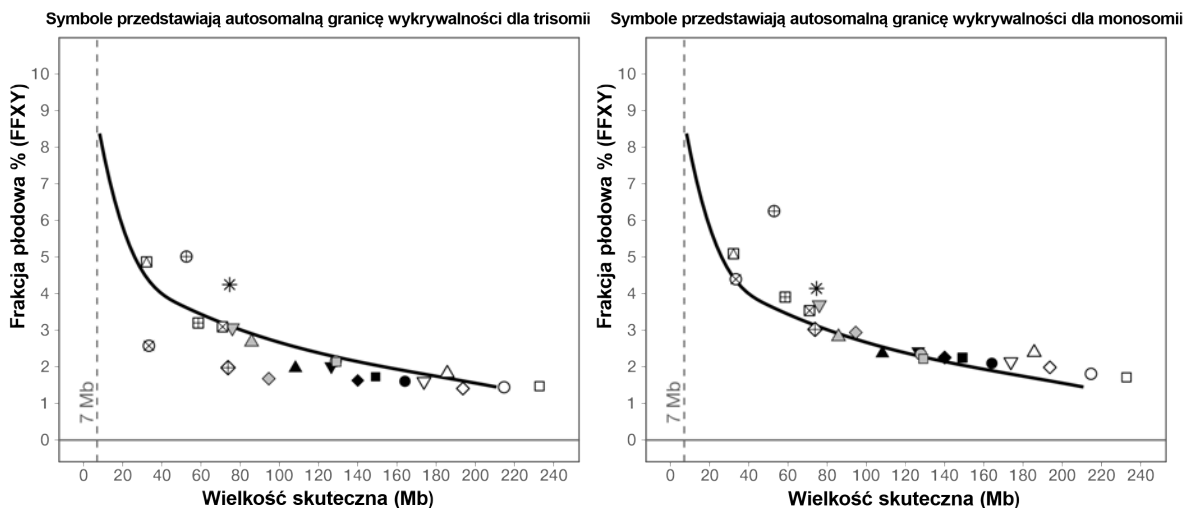
Aby określić wartość LOD dla wykrywania T21, przeanalizowano próbki będące mieszaninami puli próbek z T21 i puli próbek, w których nie stwierdzono aberracji. Zastosowano serię miareczkowania, aby zmieszać te dwa rodzaje analitu i uzyskać zestaw siedmiu poziomów frakcji płodowej (0, 2, 3, 4, 5, 6 i 10%). Każdy poziom był reprezentowany przez łącznie 10 powtórzeń.

Dane z tego badania zostały uzupełnione danymi uzyskanymi z rozcieńczenia *in silico*, aby zwiększyć rozdzielczość zakresu frakcji płodowej do analizy LOD. Efekty eksperymentalnego rozcieńczenia i miareczkowania symulowano przez kontrolowane łączenie danych sekwencjonowania. Dane z miareczkowania *in silico* obejmowały zestaw 14 poziomów frakcji płodowej (1,25; 1,50; 1,75; 2,00; 2,25; 2,50; 2,75; 3,00; 3,25; 3,50; 3,75; 4,00; 4,25 i 4,50%). Na każdym poziomie wykonano 32 powtórzenia. Uzyskane dane poddano analizie probitowej w celu określenia wartości LOD dla T21.

Niezależnie od tego opracowano też model statystyczny wykorzystujący dane dotyczące frakcji płodowej, głębokości sekwencjonowania i rozmiaru/złożoności genomu, aby przewidzieć prawdopodobieństwo wykrycia jakiegokolwiek aberracji w dowolnej próbce. Model ten został utworzony na podstawie danych odpowiadających zestawowi 1405 próbek XY. Wartość LOD dla T21 według tego modelu była zgodna z szacunkami opartymi na opisanej powyżej analizie probitowej. Ten sam model statystyczny zastosowano do oszacowania wartości LOD dla aneuploidii na wszystkich autosomach oraz dla częściowych delecji i duplikacji.

**Rysunek 2** przedstawia 95% prawdopodobieństwo wykrycia aberracji w regionach średniej wielkości oraz autosomalne granice wykrywalności w odniesieniu do wszystkich trisomii i wszystkich monosomii. Wartość odcięcia LLR dla CNV: 15,1.

Rysunek 2 95% prawdopodobieństwo wykrycia aberracji w teście VeriSeq NIPT Solution v2 w regionach o średniej wielkości



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

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



# Rozwiązywanie problemów

## Test VeriSeq NIPT Solution v2 — rozwiązywanie problemów

Tryb błędu	Możliwy efekt	Interpretacja	Zalecane działanie	Uwagi
Niewystarczająca ilość osocza wejściowego	Błąd kontroli jakości próbki	Niewystarczająca objętość osocza.	Ponownie pobrać próbkę.	Na podstawie wizualnej kontroli objętości osocza.
Błąd próbówki z krwią	Krew nie jest rozdzielona na warstwy.	Próbka nie została odwirowana.	Sprawdzić, czy wirówka została uruchomiona, a próbówka została odwirowana z odpowiednią prędkością obrotową. Ponownie pobrać próbkę.	
		Niewłaściwe przechowywanie lub transport próbki (hemoliza próbki).	Ponownie pobrać próbkę.	Zamrożone próbki nie będą ulegać rozdzielaniu. Niewłaściwe warunki transportu lub przechowywania mogą prowadzić do hemolizy próbek.

Tryb błędu	Możliwy efekt	Interpretacja	Zalecane działanie	Uwagi
Brak przepływu / zbyt wolny przepływ.	Zanieczyszczenie osocza	Pojedyncze próbki mogą zatkać płytkę do izolacji, jeśli próbka osocza jest w znaczącym stopniu zanieczyszczona.	Sprawdzić próbkę. Jeśli osocze pozostałe w probówce ma barwę czerwoną lub mleczną, należy anulować analizę próbki i poprosić o ponowne pobranie. Jeśli próbka wygląda prawidłowo, należy powtórzyć oznaczenie próbki.	
	Przelanie próbki.	Niedokładna kontrola wzrokowa każdej probówki pod kątem prawidłowości próbki.	Unieważnić oznaczenie wszystkich próbek w pobliskich dołkach, do których przelała się próbka.	Może to oznaczać, że przed przetwarzaniem próbki były niewłaściwie transportowane lub przechowywane. Wykluczyć nieodpowiednie próbki z oznaczeń.
	Awaria sprzętu	Niewystarczające trawienie materiału podczas ekstrakcji.	Powtórzyć oznaczenie próbki. Jeśli problem występuje nadal podczas oznaczeń innych próbek w danym dołku, należy skontaktować się z działem pomocy technicznej firmy Illumina.	

Tryb błędu	Możliwy efekt	Interpretacja	Zalecane działanie	Uwagi
Niepowodzenie kontroli jakości (QC) w analizie pojedynczej próbki	Niepowodzenie kontroli jakości (QC) sekwencjonowania	Możliwe przyczyny są następujące: <ul style="list-style-type: none"><li>Niewystarczająca ilość wejściowego materiału genetycznego</li><li>Błędne przeniesienie podczas przygotowania próbki</li><li>Błąd odczynnika do sekwencjonowania</li></ul>	Sprawdzić adnotację próbki. Sprawdzić podobieństwo wyników z poprzednich próbek w danym położeniu płytki. Powtórzyć oznaczenie próbki.	Wskazuje na niewystarczającą ilość wprowadzonej próbki lub błędne przeniesienie do stacji ML STAR. Niewystarczająca ilość materiału genetycznego może wynikać z niewystarczającej ilości pozakomórkowego DNA w osoczu lub komórkowego DNA, co powoduje nadmierne rozcieńczenie próbki do sekwencjonowania.
	Niska wartość frakcji płodowej (FF) lub miejsc niewykluczonych (NES)	Brak wystarczających danych, aby sporządzić dokładny raport.	Powtórzyć oznaczenie osocza.	

Tryb błędu	Możliwy efekt	Interpretacja	Zalecane działanie	Uwagi
Błąd kontroli jakości kwantyfikacji	Nieudany przebieg kwantyfikacji. Mediana partii poniżej wartości minimalnej.	Niewystarczająca wydajność procesu.	Powtórzyć kwantyfikację. Jeśli ponowna kwantyfikacja nie przebiegnie pomyślnie, należy skontaktować się z działem pomocy technicznej firmy Illumina.	Niezaliczone metryki krzywej wzorcowej oznaczają problemy z przygotowaniem próbki (tj. użycie etanolu klasy nieprzeznaczonej do zastosowań medycznych) lub problemy z procesem kwantyfikacji.
	Nieudany przebieg kwantyfikacji	Błąd krzywej wzorcowej.	Powtórzyć kwantyfikację. Jeśli ponowna kwantyfikacja nie przebiegnie pomyślnie, należy skontaktować się z działem pomocy technicznej firmy Illumina.	
Niepowodzenie tworzenia puli	Niepowodzenie tworzenia puli próbek	Błąd wyliczenia prawidłowych objętości puli w analizie puli.	Ponownie ocenić docelowe stężenie puli. Powtórzyć analizę puli.	

## VeriSeq NIPT Microlab STAR — rozwiązywanie problemów

Etap procesu	Kod błędu	Okno dialogowe błędu	Opis	Rozwiązanie po stronie użytkownika
Tworzenie partii	EM0044	Wprowadzony identyfikator partii zawiera niedozwolone znaki.	Test VeriSeq NIPT Solution v2 obsługuje tylko cyfry, litery, podkreślenia i myślniki we wszystkich polach danych.	Zmienić nazwę partii tak, aby nie zawierała żadnych znaków specjalnych.
Tworzenie partii	EM0051	Długość identyfikatora partii przekracza 36 znaków.	Test VeriSeq NIPT Solution v2 ogranicza długość nazw partii do 36 znaków.	Zmienić nazwę partii tak, aby miała długość maksymalnie 36 znaków.
Tworzenie partii	EM0076	Nie można nawiązać połączenia z serwerem lokalnym VeriSeq Onsite Server v2.	Serwer lokalny VeriSeq Onsite Server v2 nie odpowiada na zapytania o dane z oprogramowania Workflow Manager.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Upewnić się, że platforma ML STAR jest połączona z siecią.</li> <li>2. Upewnić się, że serwer lokalny VeriSeq Onsite Server v2 jest włączony.</li> <li>3. Sprawdzić, czy platforma ML STAR może połączyć się z serwerem lokalnym VeriSeq Onsite Server v2 (przez polecenie ping).</li> <li>4. Jeśli wykonanie poprzednich kroków nie spowoduje rozwiązania tego problemu, należy się skontaktować z działem pomocy technicznej firmy Illumina.</li> </ol>
Tworzenie partii	EM0118	Przetwarzanie tej partii nie powiodło się i nie może być kontynuowane.	Przetwarzanie danej partii nie powiodło się i nie może być kontynuowane.	Zapis dotyczący partii na serwerze lokalnym VeriSeq Onsite Server v2 wskazuje, że przetwarzanie wybranej partii nie powiodło się. Dalsze przetwarzanie jest niedozwolone. Należy utworzyć inną partię z żądanymi próbkami.

Etap procesu	Kod błędu	Okno dialogowe błędu	Opis	Rozwiązanie po stronie użytkownika
Tworzenie partii	Nie dotyczy	Przetwarzanie tej partii się zakończyło. Wykonać ponowne tworzenie puli?	Wskazaną partię przetworzono przez tworzenie puli. Jedynym dozwolonym przetwarzaniem jest ponowne tworzenie puli.	Przeprowadzić ponowne tworzenie puli w następujący sposób. <ul style="list-style-type: none"> <li>• Wybrać opcję <b>Re-Pool</b> (Ponowne tworzenie puli).</li> <li>• Przerwać metodę i przed ponownym tworzeniem puli upewnić się, że nazwa puli jest poprawna.</li> </ul>
Izolacja osocza	WP0087	Załadowano zduplikowane kody kreskowe próbek.	Do systemu załadowano próbki oznaczone identycznymi kodami kreskowymi.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Postępować zgodnie z monitami oprogramowania Workflow Manager, aby zidentyfikować, które próbki są duplikatami.</li> <li>2. Usunąć duplikaty, ponownie poddać je etykietowaniu lub wymieć je.</li> <li>3. Ponownie załadować próbki.</li> </ol>
Izolacja osocza	EP0102	Próbki wymienione w arkuszu próbek nie zostały załadowane.	Próbki znajdujące się w arkuszu próbek nie zostały ujęte wśród załadowanych kodów kreskowych.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Postępować zgodnie z monitami oprogramowania Workflow Manager, aby zidentyfikować brakujące próbki.</li> <li>2. Wykonać jedną z następujących czynności:               <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dodać brakujące próbki do partii i ponownie załadować próbki.</li> <li>• Przerwać metodę, wprowadzić odpowiednie zmiany do arkusza próbek w zależności od potrzeb. Rozpocząć ponownie.</li> </ul> </li> </ol>
Ładowanie płytki	Nie dotyczy	Błąd maski kodu kreskowego Venus	Oprogramowanie Workflow Manager wymusza prawidłowe powiązanie płytka-partia za pomocą masek kodu kreskowego Venus.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Sprawdzić położenie płytki, aby upewnić się, że jej układ jest prawidłowy.</li> <li>2. Upewnić się, że załadowana płytka jest właściwą płytką dla wskazanej partii.</li> </ol>

<b>Etap procesu</b>	<b>Kod błędu</b>	<b>Okno dialogowe błędu</b>	<b>Opis</b>	<b>Rozwiązanie po stronie użytkownika</b>
Ekstrakcja cfDNA	WE0150	Ciśnienie w komorze próżniowej jest za niskie.	Oprogramowanie Workflow Manager nie będzie kontynuować pracy, jeśli wykryte spoczynkowe podciśnienie w linii podciśnienia wynosi < 400 torów.	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Sprawdzić linię podciśnienia pod kątem zagięć lub innych blokad.</li><li>2. Otworzyć klipsy zwalniające na linii odpadów, umożliwić obniżenie ciśnienia, a następnie całkowicie zamknąć klipsy zwalniające na linii.</li><li>3. Upewnić się, że kontroler próżni i pompa są włączone.</li><li>4. Sprawdzić próżniową butelkę na odpady. Jeśli butelka na odpady jest zapełniona odpadami więcej niż w połowie, opróżnić ją.</li><li>5. Jeśli problem się utrzymuje, należy skontaktować się z działem pomocy technicznej firmy Illumina.</li></ol>
Ekstrakcja cfDNA	WE0153	Ciśnienie w komorze próżniowej jest za wysokie.	Jeśli zmierzone podciśnienie jest zbyt wysokie przed rozpoczęciem kontroli ciśnienia, może to oznaczać, że system działa nieprawidłowo.	Należy się upewnić, że wszystkie złącza próżni i linii z tyłu kontrolera są szczelne.

Etap procesu	Kod błędu	Okno dialogowe błędu	Opis	Rozwiązanie po stronie użytkownika
Ekstrakcja cfDNA	WE0996	Uszczelnienie próżniowe niemożliwe.	Przed kontynuacją należy wyeliminować błąd uszczelnienia.	<p>Przed wybraniem przycisku <b>OK</b> sprawdzić, czy nadal występuje błąd uszczelnienia.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Upewnić się, że płytka do izolacji jest wyrównana względem kolektora próżniowego. Mocno docisnąć płytkę do izolacji ręką w rękawiczce.</li> <li>2. Nasłuchiwać dźwięku oznaczającego narastanie podciśnienia i obserwować przepływ wody przez płytkę do izolacji.</li> <li>3. Otworzyć widok śledzenia w oprogramowaniu Workflow Manager. Gdy odczyt rzeczywistego ciśnienia osiągnie co najmniej 50 jednostek ciśnienia mniej niż odczyt ciśnienia otoczenia, wybrać przycisk <b>OK</b>, aby kontynuować ekstrakcję cfDNA.</li> <li>4. Jeśli wymagany odczyt ciśnienia nie zostanie osiągnięty w przydzielonym czasie, wybrać przycisk <b>OK</b>, aby kontynuować ładowanie pierwszego lizatu.</li> <li>5. Gdy zakończy się dozowanie lizatu na płytkę do izolacji, wstrzymać metodę. Ponownie osadzić i mocno nacisnąć w dół płytkę do izolacji.</li> <li>6. Jeśli lizat nie przepłynie przez płytkę, skontaktować się z działem pomocy technicznej firmy Illumina.</li> </ol>



Etap procesu	Kod błędu	Okno dialogowe błędu	Opis	Rozwiązanie po stronie użytkownika
Ekstrakcja cfDNA	WM0219	Jeśli włączone jest podciśnienie, należy ręcznie wyłączyć pompę.	Podciśnienie może pozostać włączone po przerwaniu metody podczas ekstrakcji.	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Na kontrolerze podciśnienia nacisnąć przycisk <b>Power</b> (Zasilanie), aby wyłączyć podciśnienie.</li><li>2. Poczekać 10 sekund, a następnie ponownie nacisnąć przycisk <b>Power</b> (Zasilanie), aby włączyć podciśnienie.</li></ol>
Ekstrakcja cfDNA	EE0477	Podczas przemieszczania płytki wystąpił błąd (błąd iSWAP).	Jeśli wystąpi błąd iSWAP (opuszczenie płytki, niepowodzenie podniesienia itd.), system wyświetli monit z prośbą do użytkownika o ręczne zakończenie przemieszczania płytki.	<p>Upewnić się, że płytkę można odzyskać (brak rozlanego materiału).</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Jeśli płytki nie można odzyskać, przerwać przebieg.</li><li>• Jeśli płytkę można odzyskać, postępować zgodnie z wyświetlanymi instrukcjami, aby ręcznie przenieść płytkę.</li></ul>
Ekstrakcja cfDNA	EE0519	Zeskanowany kod kreskowy nie pasuje do kodu kreskowego płytki do izolacji w rejestrze.	Załadowana płytka do izolacji jest niezgodna z kodem kreskowym wyjętej płytki.	Upewnić się, że ładowana płytka jest zgodna z zarejestrowanym kodem kreskowym (oczekiwany kod kreskowy można znaleźć w dzienniku śledzenia).

<b>Etap procesu</b>	<b>Kod błędu</b>	<b>Okno dialogowe błędu</b>	<b>Opis</b>	<b>Rozwiązanie po stronie użytkownika</b>
API	EA0372	Nie można nawiązać połączenia z serwerem danych.	Serwer lokalny VeriSeq Onsite Server v2 nie odpowiada na zapytania o dane z oprogramowania Workflow Manager.	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Upewnić się, że platforma ML STAR jest połączona z siecią.</li><li>2. Upewnić się, że serwer lokalny VeriSeq Onsite Server v2 jest włączony.</li><li>3. Sprawdzić, czy platforma ML STAR może połączyć się z serwerem lokalnym VeriSeq Onsite Server v2 (przez polecenie ping).</li></ol>
	EA0774	Błąd połączenia. Walidacja połączenia serwera API nie powiodła się.	Serwer lokalny VeriSeq Onsite Server v2 przestał odpowiadać na zapytania o dane z oprogramowania Workflow Manager.	<p>Upewnić się, że:</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Upewnić się, że platforma ML STAR jest połączona z siecią.</li><li>2. Sprawdzić, czy platforma ML STAR może połączyć się z serwerem lokalnym VeriSeq Onsite Server v2 (przez polecenie ping).</li><li>3. Upewnić się, że serwer lokalny VeriSeq Onsite Server v2 jest włączony.</li></ol>
	EA0780	403: nieprawidłowe żądanie Bieżąca transakcja jest nieprawidłowa.	Przesłane dane naruszają logikę procedur systemu.	Aby uzyskać więcej informacji, należy sprawdzić szczegóły błędu. Do częstych przyczyn należą: zbyt długie wpisy lub wpisy niezgodne z dopuszczalną listą znaków.

## Bibliografia

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

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

# Historia wersji

Dokument	Data	Opis zmiany
Dokument nr 1000000078751 wer. 09	Kwiecień 2024 r.	<p>Usunięto</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Nieaktualną część nr 20030577.</li> <li>• Wymaganie dotyczące maksymalnej pojemności probówki w przypadku wirowania probówki do pobierania krwi.</li> </ul> <p>Dodano</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Nową część nr 20101927 do serwera VeriSeq Onsite Server v2.</li> <li>• Jednostkę wymiaru dla probówek 10 ml do pobierania krwi.</li> <li>• Wyjaśnienie dotyczące zgodnych wersji oprogramowania SoftMax Pro.</li> <li>• Uwagę z wyjaśnieniem, że należy stosować wyłącznie zgodne akcesoria z tworzyw sztucznych, ponieważ tylko wówczas możliwe jest zamienne ich stosowanie zamiast akcesoriów z platformy VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Uwagę dotyczącą zanieczyszczenia próbki domieszką (do sekcji Interpretacja wyników).</li> <li>• Przestrożę, aby nie zamrażać próbki krwi pełnej zebranej do probówek Streck do pobierania krwi w celu oznaczenia pozakomórkowego DNA (probówek BCT).</li> <li>• Przestrożę, aby nie dopuszczać do narażenia próbek na zbyt wysokie temperatury.</li> <li>• Wyjaśnienie dotyczące ograniczeń testu i odtwarzalności w odniesieniu do warunków.</li> <li>• Wyjaśnienie dotyczące wartości odcięcia LLR dla CNV na rysunku 2 — w sekcji Granica wykrywalności.</li> </ul> <p>Zaktualizowano</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Informacje dotyczące zgodnej rygienki na odczynnik: rygienkę na odczynnik Roche zmieniono na rygienkę na odczynnik Illumina i dodano nowy numer części.</li> <li>• Numer katalogowy wyrobu Thermo Fisher Multifuge X4 Pro-MD zmieniono na 75016034.</li> <li>• Przestrożę dotyczącą tego, że niejednakowe objętości w dołkach mogą powodować, że próbki nie przejdą automatycznej kontroli jakości.</li> <li>• Odniesienie do ulotek dołączonych do opakowania aparatu.</li> </ul>

Dokument	Data	Opis zmiany
Dokument nr 1000000078751 wer. 08	Sierpień 2022 r.	Zaktualizowano numer części procedury. Usunięto instrukcję dotyczącą mieszania poprzez pipetowanie, jeśli płytki biblioteki była zamrożona.
Dokument nr 1000000078751 wer. 07	Maj 2022 r.	<p>Rozdzielono „Ograniczenia dotyczące procedury” do sekcji „Opracowanie raportu dotyczącego testu VeriSeq NIPT Solution v2” i uwzględniono w niej dwa pierwsze punktory. Pozostały tekst stanowi nowy nagłówek „Ograniczeń dotyczących oznaczenia”.</p> <p>Usunięto</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Słowo VeriSeq ze wszystkich etykiet odczynników.</li> <li>• Informację o umieszczaniu kodu kreskowego płytki na płytce z adapterami VeriSeq NIPT w sekcji dotyczącej przygotowywania bibliotek.</li> </ul> <p>Dodano</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Słowo „certyfikowana” (atestowana) do informacji o wodzie pozbawionej DNazy/RNazy.</li> <li>• Sformułowanie „Jeden z następujących czytników mikroplatek lub równoważny” oraz SpectraMax M2, M3, M4, M5 i uwagę.</li> <li>• Wyjaśnienie do sekcji VeriSeq NIPT Microlab STAR z informacją o tym, jak postępować w przypadku usuwania błędu.</li> <li>• Uwagę, aby wzrokowo sprawdzić dołki.</li> <li>• Instrukcje na temat partii 24 i 48 próbek w całych sekcjach dotyczących protokołu.</li> <li>• Kroki informujące o tym, kiedy należy używać płytki z fioletowym adapterem lub jej równoważnika.</li> <li>• Obszerne wyjaśnienie do sekcji „Charakterystyka demograficzna i charakterystyka ciąży” dotyczące uwzględnienia wyników z pierwszego trymestru ciąży.</li> <li>• Punktory do specyfikacji płytki z głębokimi dołkami, aby uwzględnić informację o tym, że jest odporna na moment obrotowy.</li> </ul> <p>Zaktualizowano</p>

Dokument	Data	Opis zmiany
		<ul style="list-style-type: none"><li>• Wyjaśnienie, aby nadawać partiom unikalne nazwy, które ułatwią ich rozpoznawanie, a także dodano przykład.</li><li>• Symbole oraz formatowanie Uwag, Przestróg i Ostrzeżeń.</li><li>• Punktory podrzędne w sekcji dotyczącej wyników testu.</li><li>• Zastąpiono tiocyjanian guanidyny chlorowodorkiem guanidyny.</li><li>• Zmieniono CVS na BVS (Basic Vacuum System)</li><li>• Wyjaśnienie dotyczące korzystania z badania przesiewowego całego genomu i wartości LLR.</li><li>• Specyfikacje: specyfikacje rynienki na odczynniki, płytek o głębokich dołkach, płytek z 384 dołkami oraz płytek z 96 dołkami.</li></ul>
Dokument nr 1000000078751 wer. 06	Sierpień 2021 r.	Zaktualizowano adres autoryzowanego przedstawiciela w UE.

Dokument	Data	Opis zmiany
Dokument nr 1000000078751 wer. 05	Grudzień 2020 r.	<p>Zaktualizowano części „Zasady procedury”, „Ostrzeżenia i środki ostrożności” oraz „Etykiety produktu” o dodatkowe wyjaśnienia w celu spełnienia wymagań prawnych.</p> <p>Drobne aktualizacje w treści protokołu w celu zapewnienia zgodności ze stylem i strukturą firmy Illumina.</p> <p>Zmieniono opis chromosomu 21 z „drugiego najmniejszego ludzkiego autosomu” na „najmniejszego ludzkiego autosomu” w części „Wydajność analityczna”.</p> <p>Dodano ostrzeżenia dotyczące niewłaściwego użycia zbiorników i zagrożenia związane z amalgamacją próbki w częściach „Izolacja preparatu osocza” oraz „Interpretacja wyników”.</p> <p>Dodano nowe numery katalogowe serwera i oprogramowania w związku z wydaniem nowego modelu serwera i aktualizacji numerów katalogowych oprogramowania.</p> <p>Dodano ostrzeżenia do informacji na temat protokołu i rozwiązywania problemów w celu rozwiązania problemu przepełnienia próbek i zapobiegania mu.</p> <p>Zaktualizowano składniki czynne we wzorcu do kwantyfikacji DNA w zestawie akcesoriów, aby zapewnić zgodność z kartą charakterystyki.</p> <p>Zaktualizowano konwencje nazewnictwa modułu Local Run Manager VeriSeq NIPT w celu zapewnienia zgodności z innymi dokumentami.</p> <p>Dodano historię zmian.</p>
Dokument nr 1000000078751 wer. 04	Październik 2020 r.	Drobne poprawki.
Dokument nr 1000000078751 wer. 03	Wrzesień 2020 r.	Zaktualizowano listę materiałów, aby przedstawić specyfikację szkła laboratoryjnego wraz ze znanymi zgodnymi opcjami.



Dokument	Data	Opis zmiany
Dokument nr 1000000078751 wer. 02	Luty 2020 r.	Zaktualizowano przedstawienie informacji o skuteczności klinicznej, aby lepiej przekazać różnice między testem podstawowym a testem przesiewowym całego genomu. Dodano nowe różnice w skuteczności w częściach dotyczących podstawowych testów przesiewowych i testów przesiewowych całego genomu. Usunięto sprzeczne informacje o opcjonalności raportu uzupełniającego z części „Zasady procedury”. Zaktualizowano konwencję nazewnictwa oprogramowania VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 w całym dokumencie w celu zapewnienia zgodności stylistycznej. Zaktualizowano etykiety adresowe firmy Illumina w Australii i Holandii, aby odzwierciedlić ostatnie zmiany.
Dokument nr 1000000078751 wer. 01	Sierpień 2019 r.	Usunięto powielony etap w części „Ekstrakcja cfDNA” spowodowany błędem oprogramowania publikującego.
Dokument nr 1000000078751 wer. 00	Maj 2019 r.	Pierwsze wydanie.

## Patenty i znaki towarowe

Niniejszy dokument oraz jego treść stanowią własność firmy Illumina, Inc. oraz jej podmiotów zależnych („Illumina”) i są przeznaczone wyłącznie do użytku zgodnego z umową przez klienta firmy w związku z użytkowaniem produktów opisanych w niniejszym dokumencie, z wyłączeniem innych celów. Niniejszy dokument oraz jego treść nie będą wykorzystywane ani rozpowszechniane do innych celów i/lub publikowane w inny sposób, ujawniane ani kopiowane bez pisemnej zgody firmy Illumina. Firma Illumina na podstawie niniejszego dokumentu nie przenosi żadnych licencji podlegających przepisom w zakresie patentów, znaków towarowych czy praw autorskich ani prawu powszechnemu lub prawom pokrewnym osób trzecich.

W celu zapewnienia właściwego i bezpiecznego użytkowania produktów opisanych w niniejszym dokumencie podane instrukcje powinny być ściśle przestrzegane przez wykwalifikowany i właściwie przeszkolony personel. Przed rozpoczęciem użytkowania tych produktów należy zapoznać się z całą treścią niniejszego dokumentu.

NIEZAPOZNANIE SIĘ LUB NIEDOKŁADNE PRZESTRZEGANIE WSZYSTKICH INSTRUKCJI PODANYCH W NINIEJSZYM DOKUMENCIE MOŻE SPOWODOWAĆ USZKODZENIE PRODUKTÓW LUB OBRAŻENIA CIAŁA UŻYTKOWNIKÓW LUB INNYCH OSÓB ORAZ USZKODZENIE INNEGO MIENIA, A TAKŻE SPOWODUJE UNIEWAŻNIENIE WSZELKICH GWARANCJI DOTYCZĄCYCH PRODUKTÓW.

FIRMA ILLUMINA NIE PONOSI ODPOWIEDZIALNOŚCI ZA NIEWŁAŚCIWE UŻYTKOWANIE PRODUKTÓW (W TYM ICH CZĘŚCI I OPROGRAMOWANIA) OPISANYCH W NINIEJSZYM DOKUMENCIE.

© 2023 Illumina, Inc. Wszelkie prawa zastrzeżone.

Wszystkie znaki towarowe są własnością firmy Illumina, Inc. lub ich odpowiednich właścicieli. Szczegółowe informacje na temat znaków towarowych można znaleźć pod adresem [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Informacje kontaktowe



Illumina, Inc.  
5200 Illumina Way  
San Diego, California 92122, USA  
+1 800 809 ILMN (4566)  
+1 858 202 4566 (poza Ameryką Północną)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com



**Sponsor australijski**  
Illumina Australia Pty Ltd  
Nursing Association Building  
Level 3, 535 Elizabeth Street  
Melbourne, VIC 3000  
Australia

## Oznaczenie produktu

Objaśnienia symboli zamieszczonych na opakowaniu i samym produkcie znajdują się w legendzie symboli dostępnej na stronie [support.illumina.com](http://support.illumina.com), na karcie *Documentation* (Dokumentacja) danego zestawu.

Po uruchomieniu europejskiej bazy danych o wyrobach medycznych (Eudamed) charakterystyka bezpieczeństwa i działania (SSP) tego wyrobu będzie dostępna na stronie <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>. Jest ona powiązana z kodem Basic UDI-DI (0081627002NIPTRP).