

Листок-вкладыш

ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ IN VITRO.

Целевое назначение

Раствор VeriSeq™ NIPT Solution v2 представляет собой диагностический тест *in vitro*, предназначенный для использования в качестве скринингового теста для выявления геномных генетических аномалий плода в образцах периферической цельной крови матери у беременных женщин на сроке беременности не менее 10 недель. VeriSeq NIPT Solution v2 использует полногеномное секвенирование для выявления частичных дупликаций и делеций для всех аутосом и статуса анеуплоидии для всех хромосом. Оба типа скрининга предполагают возможность запроса сообщения об анеуплоидии по половым хромосомам (SCA). Изделие нельзя использовать в качестве единственного основания для постановки диагноза или принятия других решений о ведении беременности.

VeriSeq NIPT Solution v2 включает: Диспетчер рабочих процессов VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 для VeriSeq NIPT Microlab STAR, Набор для подготовки образцов VeriSeq NIPT Sample Prep Kit и Сервер VeriSeq Onsite Server v2 с Программное обеспечение VeriSeq NIPT Assay Software v2. VeriSeq NIPT Solution v2 предназначен для использования с секвенатором следующего поколения.

Краткий обзор и объяснение анализа

Хромосомные аномалии плода, в частности анеуплоидия, которая представляет собой аномальным количеством хромосом, являются частой причиной репродуктивных нарушений, врожденных аномалий, задержки развития и умственных отклонений. Анеуплоидия поражает приблизительно 1 из 300 живорожденных детей, при этом гораздо более высокая частота связана с выкидышем и мертворождением.^{1,2}

До недавнего времени существовало два типа пренатальных тестов на эти заболевания: диагностическое обследование или скрининг. Диагностическое обследование включает инвазивные процедуры, такие как амниоцентез или биопсия ворсин хориона. Эти методы тестирования считаются золотым стандартом для выявления анеуплоидии плода. Тем не менее, они связаны с риском невынашивания в диапазоне от 0,11 % до 0,22 %.³ Традиционные анализы на множественные маркеры не имеют риска невынашивания, поскольку они неинвазивны, но они менее точны, чем диагностические тесты. Их частота обнаружения трисомии 21 варьируется в диапазоне 69-96 % в зависимости от конкретного скрининга, возраста матери и гестационного возраста при тестировании.⁴ Важно отметить, что они имеют частоту ложноположительных результатов приблизительно 5 %, что может привести к инвазивному диагностическому тестированию для подтверждения и, таким образом, к риску выкидыша, связанного с процедурой.⁴ Ультразвуковые обследования также могут выявлять хромосомные аномалии, но они делают это с еще меньшей уверенностью, чем эти другие методы.

Анеуплоидия плодов для хромосом 21, 18, 13, X и Y может быть обнаружена с высокой степенью точности с помощью неинвазивного пренатального тестирования (NIPT) с использованием полногеномного секвенирования бесклеточной ДНК (cfDNA), полученной из плазмы матери на 10 неделе беременности или позже. В недавнем мета-анализе нескольких клинических исследований сообщалось о таких взвешенных

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq NIPT Solution v2

объединенных показателях обнаружения и специфичностях трисомии 21 и трисомии 18 при одноплодной беременности: трисомия 21 – 99,7 % и 99,96 % и трисомия 18 – 97,9 % и 99,96 % соответственно.⁵ Одно исследование предполагает, что использование NIPT в качестве первичного скрининга при всех беременностях может привести к снижению количества подтверждающих инвазивных процедур на 89 %.⁶

Учитывая значительное снижение частоты ложноположительных результатов при использовании NIPT по сравнению с традиционным скринингом на множественные маркеры, многие профессиональные медицинские организации выпустили заключения, подтверждающие несколько показаний к применению NIPT.

В частности, рекомендуется Международное общество пренатальной диагностики, Американская коллегия акушеров и гинекологов (ACOG)/Общество по материнской медицине плода (SMFM), Американская коллегия медицинской генетики и геномики (ACMG) и Европейское общество генетики человека/Американское общество генетики человека, предлагающее НИПТ всем беременным женщинам.^{7,8,9} Рекомендуется предварительное консультирование, информированное согласие и диагностическое тестирование для подтверждения положительного результата скрининга cfDNA.⁴

VeriSeq NIPT Solution v2 является неинвазивным диагностическим тестом *in vitro* (IVD), в котором используется полногеномное секвенирование фрагментов cfDNA, полученных из образцов периферической цельной крови матери, взятых у беременных женщин на сроке беременности не менее 10 недель. Этот метод предполагает два варианта диагностики: базовый и геномный. Базовый скрининг предоставляет информацию о статусе анеуплоидии только для 21-й, 18-й, 13-й, X и Y-хромосом. Геномный скрининг предоставляет информацию о частичных делециях и дупликациях для всех аутомосом и статусе анеуплоидии для всех хромосом. Оба типа скрининга предоставляют возможность сообщения о анеуплоидии половых хромосом (SCA) с сообщением о половой принадлежности плода или без него. Опцию отчетности для SCA можно отключить. Если опция отчетности для SCA отключена, пол плода также не сообщается. Для получения дополнительной информации о вариантах сообщения о половой принадлежности см. *VeriSeq NIPT Solution v2 Software Guide (Руководство по программному обеспечению VeriSeq NIPT Solution v2)* (документ № 1000000067940).

Принципы проведения процедуры

VeriSeq NIPT Solution v2 представляет собой автоматизированное решение для лабораторного анализа NIPT, которое состоит из автоматизированной подготовки образцов и анализа данных секвенирования. Набор для подготовки образцов VeriSeq NIPT Sample Prep Kit являются специализированными реагентами для однократного применения, которые используются в сочетании с VeriSeq NIPT Microlab STAR для приготовления серий из 24, 48 или 96 образцов для секвенирования нового поколения. Данные полногеномного парноконцевого секвенирования анализируются с помощью специализированного программного обеспечения Программное обеспечение VeriSeq NIPT Assay Software v2, и создается отчет, который предоставляет качественные результаты.

Рабочий процесс состоит из следующих процедур: сбор образцов, выделение плазмы, экстракция cfDNA, подготовка библиотеки, количественное определение библиотеки, объединение библиотеки, секвенирование и анализ, которые более подробно описаны:

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq ^{illumina} NIPT Solution v2

- **Сбор образцов** – 7-10 мл периферической цельной крови матери берут в бесклеточную пробирку для сбора крови (BCT) для ДНК Streck, которая предотвращает лизис клеток и геномное загрязнение и стабилизирует цельную кровь.
- **Выделение плазмы** – в течение 5 дней после взятия образца плазма выделяется из периферической цельной крови матери с использованием стандартных методов центрифугирования. VeriSeq NIPT Microlab STAR аспирирует и распределяет плазму в 96-луночный планшет с глубокими лунками для последующей обработки. В случае необходимости повторного анализа образцы для последующей обработки могут быть закупорены и храниться при температуре 4 °С в течение дополнительных 5 дней (в общей сложности до 10 дней после взятия крови).



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Превышение вышеупомянутого времени хранения может отрицательно повлиять на частоту отказов отдельных образцов.

- **Экстракция cfDNA** – очистка cfDNA из плазмы достигается путем адсорбции на связывающем планшете, промывания связывающего планшета для удаления загрязняющих веществ и элюирования.
- **Подготовка библиотеки** – очищенные фрагменты cfDNA подвергаются процессу репарации концов для преобразования 5'- и 3'-выступов в ровные концы. Затем к 3'-концам добавляют дезоксиаденозиновый нуклеотид для создания одного выступа основания. Затем индексированные адаптеры, содержащие одноосновной 3'-дезокситимидиновый выступ, лигируют на обработанные фрагменты cfDNA. Перевязанную ДНК очищают с помощью твердофазных гранул для обратной иммобилизации. Каждый образец в наборе из 24, 48 или 96 получает уникальный индексированный адаптер. Адаптеры служат двум целям:



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Будьте предельно осторожны, чтобы избежать перекрестного загрязнения индексов, что может привести к неправильным результатам.

- Индексы позволяют идентифицировать образец при последующем секвенировании.
- Индексные адаптеры содержат последовательности, которые обеспечивают захват библиотеки на твердой поверхности проточной ячейки секвенирования для создания кластера и последующего секвенирования.
- **Количественное определение** – продукт библиотеки количественно определяют с помощью флуоресцентного красителя с концентрацией, определяемой путем сравнения со стандартной кривой ДНК.
- **Объединение и секвенирование библиотек** – библиотеки образцов объединяют в пулы из 24 или 48 образцов в скорректированных количествах для минимизации вариативности охвата. Затем каждый пул секвенируется с помощью система секвенирования нового поколения.
- VeriSeq NIPT Solution v2 не включает оборудование и расходные материалы для секвенирования.
- Анализ – для каждого образца анализ состоит из следующего:

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq ^{illumina} NIPT Solution v2

- Идентификация фрагментов библиотеки по индексной последовательности и выравнивание прочтений парного конца с референсным геномом человека.
- Оценка фетальной фракции библиотеки путем объединения информации о распределении как длин, так и геномных координат фрагментов библиотеки.
- После учета известных систематических ошибок статистическая модель обнаруживает области генома, которые недостаточно или чрезмерно представлены в библиотеке, в соответствии с аномалией при расчетном уровне фетальной фракции.
- Отчет NIPT содержит сводные результаты для выбранного меню теста, в котором перечислены АНОМАЛЬНО ОБНАРУЖЕНЫ или АНОМАЛИИ НЕ ОБНАРУЖЕНЫ, а также оценка фетальной фракции для образцов, прошедших контроль качества.
- Дополнительный отчет содержит количественные показатели, которые характеризуют каждую обнаруженную аномалию.

Ограничения процедуры

Ограничения анализа

- Доказательства, подтверждающие чувствительность и специфичность теста, охватывают одноплодную и двуплодную беременность. Эти инструкции по применению не предоставляют данных о чувствительности или специфичности для трехкомпонентных беременностей или беременностей более высокого порядка.
- VeriSeq NIPT Solution v2 не предназначен для обнаружения полиплоидии, такой как триплоидия.
- VeriSeq NIPT Solution v2 не предназначен для обнаружения сбалансированных хромосомных перестроек.
- Для анализа требуются образцы периферической цельной крови беременных женщин на сроке беременности не менее 10 недель.
- Для базовых скринингов тест VeriSeq NIPT Solution v2 выявляет специфические хромосомные аномалии. Результаты, сообщаемые как АНОМАЛИИ НЕ ОБНАРУЖЕНЫ, не исключают возможности хромосомных аномалий тестируемых хромосом. Отрицательный результат не исключает возможности наличия у беременности других хромосомных аномалий, генетических состояний или врожденных пороков (например, дефекта открытой нервной трубки).
- Для геномного скрининга большие делеции и дупликации, которые составляют менее 75 % размера хромосомы, могут указывать на анеуплоидию всей хромосомы.
- Для геномного скрининга некоторые области исключаются из анализа. Список таких исключенных регионов доступен на веб-сайте поддержки Illumina. Обнаружение геномных аномалий выполняется только на неисключенных участках.
- Информация о поле плода доступна не во всех регионах в связи с местными нормативными требованиями, регулирующими информацию о поле.

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq NIPT Solution v2

- На основании литературных данных результаты бесклеточного скрининга на ДНК могут быть искажены определенными материнскими и фетальными факторами. Некоторые из них перечислены ниже, но не ограничиваются следующим:
 - Недавнее переливание крови матери
 - Предшествующая трансплантация органа матери/трансплантация стволовых клеток
 - Аутоиммунное заболевание матери
 - Новообразования у матери (доброкачественные и злокачественные)
 - Мозаицизм матери
 - Варианты количества копий матери
 - Фетоплацентарный мозаицизм / ограниченный плацентарный мозаицизм
 - Смерть плода / исчезновение близнеца

Отчет VeriSeq NIPT Solution v2

- VeriSeq NIPT Solution v2 является скрининговым тестом и не должен рассматриваться отдельно от других клинических результатов и результатов анализов. Выводы о состоянии плода и решениях о ведении беременности не должны основываться только на результатах скрининга НИПТ.⁷
- VeriSeq NIPT Solution v2 выдает отчеты по следующим пунктам:
 - Базовый скрининг определяет избыточное представительство хромосом 13, 18 и 21.
 - Геномный скрининг выявляет недостаточное и избыточное представительство всех аутосом, включая частичные делеции и дупликации размером не менее 7 Mb.
 - При одноплодной беременности, если в настройках отчета о половой принадлежности выбрано значение Yes (Да) или SCA, выявляются следующие аномалии половых хромосом: XO, XXX, XXY и XYY.
 - При одноплодной беременности, если в настройках отчета о половой принадлежности выбрано значение Yes (Да), указывается пол плода.
 - Наличие Y-хромосомы при двуплодной беременности.

Компоненты изделия

В состав VeriSeq NIPT Solution v2 входят следующие компоненты для подготовки образца:

- Набор для подготовки образцов VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (24 образца) (номер по каталогу 20025895)
- Набор для подготовки образцов VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (48 образцов) (номер по каталогу 15066801)
- Набор для подготовки образцов VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (96 образцов) (номер по каталогу 15066802)

VeriSeq NIPT Solution v2 состоит из следующих программных компонентов:

- Программное обеспечение VeriSeq NIPT Assay Software v2 (номер по каталогу 20047024), предварительно установленная на Сервер VeriSeq Onsite Server v2.

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq ^{illumina} NIPT Solution v2

- Сервер VeriSeq Onsite Server v2 (номер по каталогу 20028403, 20047000, 20101927) или существующий сервер VeriSeq Onsite Server (номер по каталогу 15076164 или No 20016240), обновленный до версии 2.
- Диспетчер рабочих процессов VeriSeq NIPT Workflow Manager v2, (номер по каталогу 20044988), предварительно установленная на VeriSeq NIPT Microlab STAR.
 - VeriSeq NIPT Microlab STAR (номер по каталогу Hamilton Company Reno: 95475-01 (115 B) и 95475-02 (230 B), Hamilton Company Bonaduz: 806288).
- Local Run Manager модуль VeriSeq NIPT (номер по каталогу 20044989)

Реагенты

Поставляемые реагенты

Illumina содержит следующие реагенты: Набор для подготовки образцов VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (24 образца) (номер по каталогу 20025895), Набор для подготовки образцов VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (48 образцов) (номер по каталогу 15066801) и Набор для подготовки образцов VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (96 образцов) (номер по каталогу 15066802). Набор для подготовки образцов VeriSeq NIPT Sample Prep Kit сконфигурированы для использования с VeriSeq NIPT Microlab STAR (ML STAR) (номер по каталогу 95475-01, 95475-02 или 806288), предоставляемой компанией Hamilton.

Набор для подготовки образцов VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, Блок для извлечения

Таблица: 1 VeriSeq NIPT Блок для извлечения (24) и (48), арт. No 20025869 и 15066803

Название реагента на этикетке	Количество контейнеров в наборе	Активные ингредиенты	Хранение
Lysis Buffer (Буфер для лизиса)	1	Гуанидина гидрохлорид в буферном водном растворе	от 15 °C до 30 °C
Промывочный буфер I	1	Гуанидина гидрохлорид и 2-пропанол в буферном водном растворе	от 15 °C до 30 °C
Буфер для промывки II	1	Соли, содержащие буферный водный раствор	от 15 °C до 30 °C
Elution Buffer	1	Забуференный водный раствор	от 15 °C до 30 °C
Буфер для протеиназы	1	Глицерин в буферном водном растворе	от 15 °C до 30 °C
Протеиназа К	3	Лиофилизированная протеиназа К	от 15 °C до 30 °C

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq NIPT Solution v2 illumina®

Таблица: 2 VeriSeq NIPT Блок для извлечения (96), арт. No 15066807

Название реагента на этикетке	Количество контейнеров в наборе	Активные ингредиенты	Хранение
Lysis Buffer (Буфер для лизиса)	1	Гуанидина гидрохлорид в буферном водном растворе	от 15 °С до 30 °С
Промывочный буфер I	1	Гуанидина гидрохлорид и 2-пропанол в буферном водном растворе	от 15 °С до 30 °С
Буфер для промывки II	2	Соли, содержащие буферный водный раствор	от 15 °С до 30 °С
Elution Buffer	1	Забуференный водный раствор	от 15 °С до 30 °С
Буфер для протеиназы	1	Глицерин в буферном водном растворе	от 15 °С до 30 °С
Протеиназа К	4	Лиофилизированная протеиназа К	от 15 °С до 30 °С

Набор для подготовки образцов VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, Блок подготовки библиотеки

Таблица: 3 VeriSeq NIPT Library Prep Box (24) и (48), номер по каталогу 20026030 и 15066809

Название реагента на этикетке	Количество контейнеров в наборе	Активные ингредиенты	Хранение
End Repair Mix (Смесь для восстановления концов)	1	DNA polymerase и dNTP в буферном водном растворе	от -25°С до -15°С
A-Tailing Mix	1	DNA polymerase и dATP в буферном водном растворе	от -25°С до -15°С
Ligation Mix	1	ДНК-лигаза в буферном водном растворе	от -25°С до -15°С
Гибридизационный буфер	1	Забуференный водный раствор	от -25°С до -15°С
Планшет с адаптером ДНК NIPT	1	Олигонуклеотиды в буферном водном растворе	от -25°С до -15°С

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq NIPT Solution v2 illumina®

Таблица: 4 VeriSeq NIPT Library Prep Box (96), номер по каталогу 15066810

Название реагента на этикетке	Количество контейнеров в наборе	Активные ингредиенты	Хранение
End Repair Mix (Смесь для восстановления концов)	1	DNA polymerase и dNTP в буферном водном растворе	от -25°C до -15°C
A-Tailing Mix	2	DNA polymerase и dATP в буферном водном растворе	от -25°C до -15°C
Ligation Mix	2	ДНК-лигаза в буферном водном растворе	от -25°C до -15°C
Гибридизационный буфер	1	Забуференный водный раствор	от -25°C до -15°C
Планшет с адаптером ДНК NIPT	1	Олигонуклеотиды в буферном водном растворе	от -25°C до -15°C

Набор для подготовки образцов VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, комплект принадлежностей

Таблица: 5 VeriSeq NIPT комплект принадлежностей, арт. No 15066811

Название реагента на этикетке	Количество контейнеров в наборе	Активные ингредиенты	Хранение
Планшет для связывания ДНК	1	Микропланшет из пропилена с модифицированной силиконовой мембраной	от 2 °C до 8 °C
Resuspension Buffer	1	Забуференный водный раствор	от 2 °C до 8 °C
Sample purification beads	1	Твердофазные парамагнитные гранулы в буферном водном растворе	от 2 °C до 8 °C
Реагент для количественного определения ДНК	1	Краситель для интеркаляции ДНК в ДМСО	от 2 °C до 8 °C
Стандарт для количественного определения ДНК	1	Стандарт дсДНК, неспецифическая ДНК и азид натрия в буферном водном растворе	от 2 °C до 8 °C

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq NIPT Solution v2

Набор для подготовки образцов VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, пробирки и этикетки рабочего процесса

Таблица: 6 Пробирки и этикетки рабочего процесса, номер по каталогу 15071543

Название элемента на этикетке	Количество элементов в наборе	Хранение
Этикетка (LBL) – штрих-код планшета	9	от 15 °C до 30 °C
Этикетка (LBL) – штрих-код планшета с глубокими лунками	12	от 15 °C до 30 °C
Пробирка (TB) – пустая пробирка для объединения	5	от 15 °C до 30 °C

Реагенты, не входящие в комплект поставки

Необходимые реагенты, не входят в комплект поставки

- Реагенты для секвенирования и расходные материалы, необходимые для системы секвенирования нового поколения (NGS)
- Сертифицированная вода, не содержащая ДНКазу/РНКазу – класс чистоты для молекулярной биологии
- Ethanol, 100 % (200 proof) – класс чистоты для молекулярной биологии

ПРИМЕЧАНИЕ Этанол, не соответствующий классу чистоты для молекулярной биологии, может негативно повлиять на эффективность анализа.

Реагенты необязательны, не входят в комплект поставки

- Фосфатно-солевой буфер Дульбекко (ФСБД) для контроля без шаблона (NTC)

Хранение и обращение

1. Комнатной температурой считается температура от 15 °C до 30 °C.
2. Все реагенты предназначены только для одноразового использования. После подготовки реагентов к использованию их следует использовать немедленно.
3. Если какая-либо упаковка или содержимое компонентов VeriSeq NIPT Solution повреждены или повреждены, обратитесь в службу поддержки клиентов Illumina.

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq NIPT Solution v2

4. Реагенты стабильны при хранении в соответствии с указаниями до истечения срока годности, указанного на этикетках набора. Условия хранения см. в столбце «Хранение» в таблицах в разделе [Reagents](#) (Реагенты). Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.
5. Изменения во внешнем виде предоставленных реагентов могут указывать на ухудшение качества материалов. Реагенты запрещается использовать, если наблюдаются изменения во внешнем виде (например, явное изменение цвета реагента или помутнение, характерное для микробного загрязнения).
6. При работе с Sample purification beads соблюдайте следующие рекомендации:
 - Никогда не замораживайте гранулы.
 - Перед использованием дайте гранулам нагреться до комнатной температуры.
 - Непосредственно перед использованием встряхните гранулы на вихревой мешалке до получения однородной суспензии и однородного цвета.
7. Lysis Buffer, промывочный буфер I, промывочный буфер II, Elution Buffer и протеиназный буфер могут образовывать видимые осадки или кристаллы. Перед использованием энергично встряхните на вихревой мешалке, а затем осмотрите, чтобы убедиться в отсутствии осадка.
8. Никогда не замораживайте цельную кровь после взятия образца.
9. Секвенируйте библиотеки как можно скорее после объединения. Объединенные библиотеки стабильны до семи дней при температуре от -25 °C до -15 °C. При хранении в течение этого периода времени в этих условиях дополнительная денатурация не требуется.

Оборудование и материалы

Необходимое оборудование и материалы (в комплект не входят)

Необходимое оборудование, не входит в комплект поставки

Оборудование	Поставщик
Система секвенирования нового поколения (NGS) со следующими возможностями: <ul style="list-style-type: none">• 2 x 36 п. о., парное секвенирование• Совместимость с Набор для подготовки образцов VeriSeq NIPT Sample Prep Kit двойными адаптерами индекса• Автоматическое создание файлов распознавания оснований (BCL)• Химический метод с двумя метками• 400 миллионов парноконцевых прочтений на запуск• Совместимость с Программное обеспечение VeriSeq NIPT Assay Software v2 или системой секвенирования NextSeq 550Dx .	Поставщик оборудования или Illumina, номер по каталогу 20005715
Морозильная камера, от -25 до -15 °C	Поставщик общелабораторного оборудования
Микроцентрифуга	Поставщик общелабораторного оборудования
Помощь в пипетировании	Поставщик общелабораторного оборудования
Холодильник, от 2 до 8 °C	Поставщик общелабораторного оборудования
Одноканальные пипетки объемом 20 мкл	Поставщик общелабораторного оборудования
Одноканальные пипетки объемом 200 мкл	Поставщик общелабораторного оборудования
Одноканальные пипетки объемом 1000 мкл	Поставщик общелабораторного оборудования
Мешалка вихревая	Поставщик общелабораторного оборудования
Центрифуга и ротор в сборе для пробирок для взятия крови	

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq NIPT Solution v2

Оборудование	Поставщик
<p>Эквивалент:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Охлаждаемая центрифуга с ускорением 1600 × g без тормозов • Ротор качающегося ковша с ковшами • Вставки ковша с минимальной глубиной 76 мм • Вставьте адаптеры для поддержки пробирок для взятия крови 16 мм x 100 мм 	<p>Поставщик общелабораторного оборудования</p>
<p>Рекомендуется:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Центрифуга Allegra X12R, 1600 g • Ротор центрифуги Allegra GH-3.8 с лопатками • Крышки ковша центрифуги Allegra, комплект из двух штук • Узел адаптера центрифуги Allegra, 16 мм, комплект из четырех штук 	<p>Beckman Coulter, номер 392304 (120 В или 230 В)</p> <p>Beckman Coulter, номер по каталогу 369704</p> <p>Beckman Coulter, номер по каталогу 392805</p> <p>Beckman Coulter, номер по каталогу 359150</p>
<p>Центрифуга и ротор в сборе для микропланшетов</p>	
<p>Эквивалент:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Центрифуга с ускорением 5600 × g • Поворотный ротор планшета с держателями 96-луночного планшета, минимальная глубина 76,5 мм • Multifuge X4 Pro-MD 120 V TX-1000BT • Центрифуга Sorvall Legend XTR 	<p>Поставщик общелабораторного оборудования</p> <p>Thermo Fisher Scientific, номер по каталогу 75016034</p> <p>Thermo Fisher Scientific, номер по каталогу 75004521 (120 В) или номер по каталогу 75004520 (230 В)</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Ротор для микропланшетов HIGHPlate 6000 • Высокая пластина ротора 6000 	<p>Thermo Fisher Scientific, номер по каталогу 75003606</p> <p>Thermo Scientific VWR, номер по каталогу No 97040-244</p>
<p>Опорное основание для микропланшетов</p> <ul style="list-style-type: none"> • Рекомендуется: <ul style="list-style-type: none"> • 96-Well опорная база MicroAmp • Носитель 96-Well планшетов для ПЦР 	<p>Thermo Fisher Scientific, номер по каталогу 4379590</p> <p>Thermo Fisher Scientific, номер по каталогу AB-0563/1000</p>

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq NIPT Solution v2 illumina®

Оборудование	Поставщик
<p>Один из следующих считывателей микропланшетов или эквивалентный (флуорометр) с SoftMax Pro v6.2.2-7.1.2:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gemini XPS • SpectraMax M2, M3, M4 и M5. <ul style="list-style-type: none"> • Фиолетовый вкладыш необходим с устройством считывания микропланшетов для использования в рабочем процессе. 	<p>Молекулярные устройства, номер по каталогу XPS Молекулярные устройства, арт. No M2, M3, M4 и M5</p>
<p>Высокоскоростной USB-порт SpectraMax, последовательный адаптер</p>	<p>Молекулярные устройства, номер по каталогу 9000-0938</p>
<p>Тепловой циклер со следующими характеристиками:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Крышка с подогревом • Диапазон температур от 4 °C до 98 °C • Точность температуры ± 2 °C • Минимальная скорость линейного изменения 2 °C в секунду • Совместим с 96-луночным планшетом Twin.tec PCR с широкой юбкой 	<p>Поставщик общелабораторного оборудования</p>
<p>VeriSeq NIPT Microlab STAR</p>	<p>Hamilton, номер по каталогу 95475-01 (115 B), номер по каталогу 95475-02 (230 B) или номер по каталогу 806288 (для компании Hamilton Bonaduz)</p>
<p>Сервер VeriSeq Onsite Server v2 или обновленный сервер VeriSeq Onsite Server</p>	<p>Illumina, номер по каталогу 20028403 или 20047000 (v2) или 20101927 или 15076164 или 20016240 (обновление)</p>
<p>При использовании NextSeq 550Dx Sequencing System:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Набор реагентов NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5, 75 циклов 	<p>Illumina, номер по каталогу 20028870</p>

Необязательное оборудование, не входит в комплект поставки

Оборудование	Поставщик
<p>Система обрезки Pluggo</p>	<p>LGP Consulting, номер по каталогу 4600 4450</p>
<p>Планшет для валидации флуоресценции SpectraMax SpectraTest FL1</p>	<p>Молекулярные устройства, номер по каталогу 0200-5060</p>
<p>Револьвер/ротатор пробирок, пробирки 15 мл, 40 об/мин, 100-240 В</p>	<p>Thermo Scientific, номер по каталогу 88881001 (США) или номер по каталогу 88881002 (ЕС)</p>

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq NIPT Solution v2 illumina®

Необходимые материалы, в комплект не входят

Расходный материал	Поставщик
Нестерильные проводящие фильтровальные наконечники объемом 1000 мкл	Hamilton, номер по каталогу 235905
Нестерильные проводящие фильтровальные наконечники объемом 300 мкл	Hamilton, номер по каталогу 235903
Нестерильные проводящие фильтровальные наконечники объемом 50 мкл	Hamilton, номер по каталогу 235948
Резервуар с глубокими лунками со следующими характеристиками: <ul style="list-style-type: none">• Формат микропланшета SLAS 1-2004 с 96 лунками с пирамидальным или коническим дном и минимальным объемом 240 мкл.• Полипропилен, предпочтительно с низким связыванием ДНК для всех поверхностей, контактирующих с образцом.• Внутренние размеры (уровень жидкости) совместимы с автоматизированными этапами аспирации и дозирования VeriSeq NIPT Microlab STAR.• Размеры высоты совместимы с автоматическими перемещениями VeriSeq NIPT Microlab STAR.	Поставщик общелабораторного оборудования Совместимые резервуары: <ul style="list-style-type: none">• Corning Axugen, номер по каталогу RES-SW96-HP-SI• Agilent, номер по каталогу 201246-100
Емкость для реагентов со следующими спецификациями: <ul style="list-style-type: none">• Емкость, которая прочно, но без усилия устанавливается в держатель VeriSeq NIPT Microlab STAR, с коническим дном и минимальным объемом 20 мл.• Полипропилен, не содержащий РНКазу/ДНКазу.• Внутренние размеры резервуара обеспечивают уровень жидкости, совместимый с автоматизированными этапами аспирации и дозирования VeriSeq NIPT Microlab STAR при использовании объемов реагентов анализа.• Размеры высоты совместимы с автоматическими перемещениями VeriSeq NIPT Microlab STAR.	Совместимые ванны: <ul style="list-style-type: none">• Illumina Емкость для реагентов, номер по каталогу 20095418

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq NIPT Solution v2 illumina®

Расходный материал	Поставщик
<p>Планшеты с глубокими лунками со следующими спецификациями:</p> <ul style="list-style-type: none">• Формат микропластин SLAS 1-2004, 3-2004 и 4-2004, с 96 пирамидальными или коническими лунками и минимальным объемом 2 мл.• Полупрозрачный полипропилен, предпочитаемый материал с низким связыванием ДНК для всех поверхностей контакта с образцом.• Размеры лунки генерируют уровень жидкости, совместимый с автоматизированными этапами аспирации и дозирования VeriSeq NIPT Microlab STAR.• Юбка планшета, позволяющая размещать штрихкоды пластины в нужном положении с надежным прилеганием к плоской поверхности.• Устойчивая к крутящему моменту рама, способная выдерживать нагрузку не менее 5600 × g.• Размеры высоты планшета совместимы с автоматическими перемещениями VeriSeq NIPT Microlab STAR	<p>Поставщик общелабораторного оборудования</p> <p>Совместимые планшеты:</p> <ul style="list-style-type: none">• Eppendorf, номер по каталогу 0030505301• Eppendorf, номер по каталогу 30502302• USA Scientific, номер по каталогу 1896-2000
<p>384-луночная пластина со следующими спецификациями:</p> <ul style="list-style-type: none">• Микропластина с 384 лунками, оптимизированная для малых объемов, с минимальным объемом лунок 50 мкл.• Черный непрозрачный полистирол со светоблокирующими свойствами и низким связыванием ДНК для всех поверхностей, контактирующих с образцом.• Размеры лунок генерируют уровни жидкости, совместимые с автоматизированными этапами аспирации и дозирования VeriSeq NIPT Microlab STAR.• Размеры высоты пластины совместимы с автоматическими перемещениями VeriSeq NIPT Microlab STAR.• Юбка пластины, позволяющая размещать штрихкоды в нужном положении с надежным прилеганием к плоской поверхности.	<p>Поставщик общелабораторного оборудования</p> <p>Совместимые планшеты:</p> <ul style="list-style-type: none">• Corning, номер по каталогу 3820

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq NIPT Solution v2

Расходный материал	Поставщик
<p>96-луночная пластина со следующими спецификациями:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Микропланшет с устойчивой к крутящему моменту рамой, способный выдерживать минимум 5600 × g, и 96 полупрозрачными лунками с коническим дном, приподнятыми ободками и минимальным объемом 150 мкл. • Полипропилен, не содержащий РНКазу/ДНКазу с низким связыванием ДНК для всех поверхностей, контактирующих с образцом. • Размеры лунок генерируют уровни жидкости, совместимые с автоматизированными этапами аспирации и дозирования VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Размеры высоты пластины совместимы с автоматическими перемещениями VeriSeq NIPT Microlab STAR. <p>ПРИМЕЧАНИЕ: Совместимые пластиковые изделия с разными номерами по каталогу, например 96-луночные пластины разных производителей, могут быть несовместимы напрямую без специфической калибровки системы VeriSeq NIPT Microlab STAR персоналом Illumina. Для смены пластиковых расходных материалов обратитесь в службу поддержки Illumina.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Юбка пластины, позволяющая размещать штрихкоды в нужном положении с надежным прилеганием к плоской поверхности. • Совместим с термоциклерами для денатурации. 	<p>Поставщик общелабораторного оборудования</p> <p>Совместимые планшеты:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, номер по каталогу 0030129512 • Eppendorf, номер по каталогу 30129580 • Eppendorf, номер по каталогу 30129598 • Eppendorf, номер по каталогу 30129660 • Eppendorf, номер по каталогу 30129679 • Bio-Rad, номер по каталогу HSP9601
<p>Один из следующих герметизирующих материалов:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Фольга Microseal 'F' • Уплотнения из фольги 	<p>Bio-Rad, номер по каталогу MSF1001 Beckman Coulter, номер по каталогу 538619</p>
<p>Бесклеточная ДНК BCT CE</p>	<p>Streck, номер по каталогу 218997</p>
<p>Нажимные колпачки</p>	<p>Sarstedt, заказ номер 65.802</p>
<p>Пробирки на 2 мл с завинчивающейся крышкой</p>	<p>Поставщик общелабораторного оборудования</p>
<p>Наконечники фильтровальные 20 мкл для дозатора 20 мкл</p>	<p>Поставщик общелабораторного оборудования</p>

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq ^{illumina} NIPT Solution v2

Расходный материал	Поставщик
Наконечники фильтровальные 200 мкл для дозатора 200 мкл	Поставщик общелабораторного оборудования
Наконечники фильтровальные 1000 мкл для дозатора 1000 мкл	Поставщик общелабораторного оборудования
Эквивалент: <ul style="list-style-type: none">Быстродействующий дезинфицирующий спрей на спиртовой основеРаствор дезинфицирующего средства Рекомендуется: <ul style="list-style-type: none">Деионизированная вода и 70 % этанол	Поставщик общелабораторного оборудования

Необязательные материалы, не входят в комплект поставки

Расходный материал	Поставщик
Фосфатно-солевой буфер Дульбекко (ФСБД) для контроля без шаблона (NTC)	Поставщик общелабораторного оборудования
Пробирка с завинчивающейся крышкой, 10 мл (только для контрольных образцов)	Sarstedt, заказ No 60.551
Пробирка с завинчивающейся крышкой, 50 мл	Поставщик общелабораторного оборудования
Серологические пипетки объемом 25 мл	Поставщик общелабораторного оборудования
Серологические пипетки объемом 10 мл	Поставщик общелабораторного оборудования

Сбор, транспортировка и хранение образцов



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Обращайтесь со всеми образцами так, как если бы они были потенциально инфекционными агентами.

- Образцы цельной крови объемом 7-10 мл должны быть собраны в Streck Cell-Free DNA BCT. Не замораживать.
- Транспортировка цельной крови должна соответствовать всем применимым нормативным требованиям к транспортировке возбудителей заболевания. Рекомендуется ускоренная доставка/транспортировка.

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq ^{illumina} NIPT Solution v2

- Во время транспортировки храните при температуре от 4 °C до 30 °C. После получения образцов храните их при температуре от 2 °C до 8 °C до готовности к продолжению. Время между взятием крови и первоначальным выделением плазмы не должно превышать 5 дней.
- В случае необходимости повторного анализа образцы для последующей обработки могут быть укупорены и храниться при температуре 4 °C в течение дополнительных 5 дней (в общей сложности до 10 дней после взятия крови).



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Воздействие повышенных температур выше вышеупомянутых диапазонов может негативно влиять на частоту неудач для отдельных образцов и характеристики образцов.

Предупреждения и меры предосторожности

- Тест-комплект содержит протеиназу К. При вдыхании, проглатывании, попадании на кожу или в глаза существует опасность причинения вреда здоровью. Использовать в хорошо проветриваемом помещении, носить защитную одежду, избегать вдыхания пыли и удалять в отходы все контейнеры и неиспользованное содержимое в соответствии с применимыми государственными стандартами безопасности.
- Этот тест-набор содержит хлорид гуанидина. При их вдыхании, проглатывании, попадании на кожу или в глаза существует опасность причинения вреда здоровью. Использовать в хорошо проветриваемом помещении, носить защитную одежду и удалять в отходы все контейнеры и неиспользованное содержимое в соответствии с применимыми государственными стандартами безопасности.
- Этот тест-набор содержит 2-пропанол, легковоспламеняющееся химическое вещество. Хранить вдали от источников тепла и открытого огня. При их вдыхании, проглатывании, попадании на кожу или в глаза существует опасность причинения вреда здоровью. Использовать в хорошо проветриваемом помещении, носить защитную одежду и удалять в отходы все контейнеры и неиспользованное содержимое в соответствии с применимыми государственными стандартами безопасности.
- Этот тест-набор содержит диметилсульфоксид, агрессивную и горючую жидкость. При их вдыхании, проглатывании, попадании на кожу или в глаза существует опасность причинения вреда здоровью. Использовать в хорошо проветриваемом помещении, носить защитную одежду и удалять в отходы все контейнеры и неиспользованное содержимое в соответствии с применимыми государственными стандартами безопасности.
- Во избежание образования вредных газов не выбрасывайте отходы экстракции cfDNA (содержит гидрохлорид гуанидина) с отходами, содержащими отбеливатель (гипохлорит натрия).
- Обращайтесь со всеми образцами так, как будто они содержат потенциально инфекционные агенты.
- Соблюдайте обычные меры предосторожности при работе в лаборатории. Запрещается пипетировать ртом. Запрещается употреблять продукты питания и напитки или курить в обозначенных рабочих зонах. При работе с образцами и реагентами для анализа следует надевать одноразовые перчатки и лабораторный халат. После работы с образцами и реагентами для анализа следует тщательно вымыть руки.

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq NIPT Solution v2

- Не используйте какие-либо компоненты анализа после истечения срока годности, указанного на маркировке коробки тест-набора. Не используйте компоненты из разных партий тест-наборов. Партии тест-наборов идентифицируются на маркировке коробки тест-набора. Храните компоненты тест-набора при указанной температуре.
- Во избежание деградации образца или реагента перед началом протокола убедитесь, что все пары гипохлорита натрия полностью рассеяны.
- Несоблюдение описанных процедур может привести к получению ошибочных результатов или значительному снижению качества образцов.
- О любых серьезных инцидентах, связанных с этим изделием, следует немедленно сообщать Illumina и компетентным органам государства, в котором зарегистрированы пользователь и пациент.
- Информация о защите окружающей среды, охране здоровья и технике безопасности представлена в паспорте безопасности (SDS, Safety Data Sheet) по адресу support.illumina.com/sds.html.

Примечания к процедуре

Предотвращение контаминации

- Используйте свежие наконечники и свежую расходную лабораторную посуду.
- Используйте стойкие к аэрозолям наконечники для снижения риска переноса и перекрестного загрязнения между образцами.
- Из-за возможности загрязнения будьте предельно осторожны, чтобы содержимое лунки оставалось в лунке полностью. Не разбрызгивайте содержимое. Центрифугируйте после любого этапа встряхивания.
- При работе с кровью и производными крови соблюдайте применимые руководящие нормы надлежащей лабораторной практики и гигиены.
- Не используйте аэрозольные спреи для отбеливания при подготовке библиотеки. Следы загрязнения отбеливателем могут привести к сбою анализа.
- При разгерметизации планшетов располагайте планшет твердой плоской поверхности, крепко удерживая планшет. Медленно снимите материал для герметизации, следя за тем, чтобы он не соприкасался с открытыми лунками. Не прикасайтесь к открытым лункам и не воздействуйте на их содержимое. Перекрестное загрязнение между лунками может привести к неправильным результатам.

Чистка платформы VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Перед использованием осмотрите платформу на предмет чистоты. Не реже одного раза в неделю проводите еженедельное техническое обслуживание и следуйте этим инструкциям по очистке.

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq ^{illumina} NIPT Solution v2

- Удалить все выгружаемые держатели и очистите быстродействующим дезинфицирующим спреем на спиртовой основе, деионизированной водой и 70 % этанолом, оставьте их сушиться. Если они сильно загрязнены, замочите их после этого в растворе дезинфицирующего средства, промойте дезинфицирующим средством на спиртовой основе и оставьте насухо.
- Откройте переднюю крышку и протрите платформу тканью, пропитанной деионизированной водой и 70 % этанолом. В частности, необходимо проверить чистоту блоков микропрепаратов.
- Снимите коллектор базовой вакуумной системы (BVS) и очистите коллектор, прокладку и внутренние отделения BVS тканью. Избегайте очистки прокладки этанолом, так как это может привести к хрупкости материала.
- Опорожните отходы наконечника для CORE 96-head и независимого канала.
- Снимите планшета для извлечения наконечника независимого канала станции отходов наконечника и очистите ее: распылите деионизированную воду и 70 % этанол непосредственно на поверхность и протрите. Натяните новый пластиковый пакет на раму и снова прикрепите его. Установите чистый планшет для извлечения наконечника обратно на место.
- Распылите деионизированную воду и 70 % этанол непосредственно на поверхность контейнера для отходов CORE с 96 головками и желоб и протрите его.
 - Если отложения трудно удалить из отходов наконечников, протирайте их тканью, смоченной водой, не содержащей ДНКазу/RNase, до тех пор, пока отложения не будут удалены. Утилизируйте ткань надлежащим образом. Выполните стерилизацию дезинфицирующим средством на спиртовой основе.
- Смочите безворсовую ткань или ватный тампон 70 % этанолом. Проведите пальцем по окну лазерного сканера сканера штрих-кодов. Очистите каждую лунку адаптера для планшета CPAC той же тканью или тампоном. При использовании тряпки вдавите тряпку в каждую лунку адаптера, используя заднюю часть ручки, чтобы убедиться, что внутренняя часть лунки надлежащим образом очищена.
- Очистите независимые каналы:
 - На независимых каналах очистите гильзу для извлечения наконечника (внешнюю часть каналов для пипетирования) безворсовой тканью, смоченной в деионизированной воде и 70 % этаноле. (См. *Справочное руководство Hamilton Microlab STAR No 15070074*)
 - Очистите стопорный диск и уплотнительные кольца дозирующей головки (внешняя часть каналов дозирования) безворсовой тканью, смоченной в деионизированной воде и 70 % этаноле.
- Очистите 96 головок CORE:
 - Используя ту же безворсовую ткань, смоченную в деионизированной воде и 70 % этаноле, очистите корпус 96-головки и нижнюю часть стопорных дисков.
 - С помощью той же ткани или порванной полоски ткани, смоченной в деионизированной воде и 70 % этаноле, «протрите» ткань по бокам каналов пипеток 96-головки, чтобы очистить уплотнительные кольца. Повторите эту процедуру для каждого канала пипетки на 96 головках.
- Распылите на переднюю и боковую крышки деионизированную воду и 70 % этанол и вытрите насухо.
- Очистите защитную ленту Autoload тканью, смоченной в деионизированной воде и 70 % этаноле, и протрите без давления.

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq ^{illumina} NIPT Solution v2

- Когда платформа и компоненты полностью высохнут, замените держатели.

ПРИМЕЧАНИЕ Неправильная очистка и обслуживание ML STAR могут привести к перекрестному загрязнению и ухудшению рабочих характеристик анализа.

Контроль качества

Контрольный материал с известными эксплуатационными характеристиками может быть оценен для выявления различий в процедурах обработки и технических процедурах в лаборатории.

Выполнение контрольного образца или контроля без матрицы снижает общее количество неизвестных образцов матери, которые могут быть обработаны с каждым препаратом образца.

Не превышайте два образца NTC на партию из 24 или 48 образцов или четыре образца NTC на партию из 96 образцов.

Инструкции по применению

Советы и методы

Если в протоколе не установлена точка безопасной остановки, незамедлительно переходите к следующим этапам.

Нанесение штрих-кодов на планшеты

- Штрих-коды для полноразмерных планшетов начинаются с PL.
- Штрих-коды для планшетов с глубокими лунками начинаются с DW.
- Наносите штрих-коды на полноразмерные и глубоколуночные планшеты рядом с столбцом 12.
- Загружайте планшеты штрих-кодом вправо, чтобы обеспечить автоматическое сканирование.

Герметизация и разгерметизация планшета

- Будьте предельно осторожны, чтобы избежать перекрестного загрязнения – на нижней стороне материала для герметизации не должно быть видимой жидкости.
 - Убедитесь, что открытая нижняя сторона материала для герметизации не соприкасается с открытыми лунками.
 - Не прикасайтесь к открытым лункам.
- Всегда герметизируйте 96-луночный планшет перед выполнением следующих шагов в протоколе:
 - Этапы центрифугирования
 - Этапы термоциклирования
- Для герметизации планшета нанесите фольгу на планшет, а затем герметизируйте. Убедитесь, что давление приложено ко всему планшету, а пленка плотно прилегает к каждой отдельной лунке.

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq NIPT Solution v2

- Перед герметизацией планшета выполните следующие действия:
 - Кратковременно центрифугируйте 96-луночный планшет при 1000 × g в течение 20 секунд.
 - Поместите планшет на плоскую поверхность, а затем медленно снимите герметизирующую пленку.

VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Перед использованием выполните и задокументируйте необходимое техническое обслуживание в соответствии с инструкциями производителя.
- Наблюдайте за ML STAR во время автоматических шагов. Контролируйте программный интерфейс Диспетчер рабочих процессов VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 на наличие подсказок и инструкций оператора.
- Во время работы держите переднюю крышку на месте.
- Во время работы не размещайте на платформе никаких предметов.
- Если появляется кнопка **Exclude** (Исключить) во время обработки ошибки, ни при каких обстоятельствах не выбирайте эту опцию. Если метод не может продолжить выполнение после события обработки ошибки или имеет ограниченные возможности обработки ошибок, прервите запуск.
- Во время этапов вакуумирования планшета, если это запрашивается Диспетчер рабочих процессов VeriSeq NIPT Workflow Manager v2, вручную помогите создать герметизацию между планшетом и вакуумным коллектором.
- Дайте системе автоматически выбросить наконечники из адаптера. Не извлекайте наконечники вручную, если это не указано программным обеспечением.
- Удалите использованные реагенты и использованные расходные материалы в соответствии с запросом Workflow Manager.
- Ежедневно опорожняйте контейнеры для вакуумных отходов. Первый контейнер не должен заполняться более чем на ½. Переполнение емкостей вакуумных отходов может повредить вакуумный насос и снизить применяемый вакуум системы.
- Для 24, 48 и 96 партий образцов перед началом метода загрузите полный штатив с индивидуально подсчитанными 8-канальными наконечниками.

Обработка образцов

Процедура

1. Выполните следующие шаги для каждой аликвоты:
 - a. Центрифугируйте образцы со штрих-кодом при 1600 × g в течение 10 минут при температуре 4 °C с выключенным тормозом.
 - b. Извлеките пробирки с образцами, когда центрифуга полностью остановится.
Начните выделение плазмы в течение 15 минут после центрифугирования. Если прошло более 15 минут, центрифугируйте снова.
2. Осмотрите каждую пробирку на предмет пригодности образца, проверив следующие требования:

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq ^{illumina} NIPT Solution v2

- Объем образца соответствует ожидаемому.
- После центрифугирования видно четкое разделение между слоями эритроцитов и плазмы.
- Уровень в плазме крови не менее чем на 1,5 мл выше лейкоцитарной оболочки.
- Образец не сильно гемолизируется (т. е. плазма не имеет темно-красного цвета).
- Образец не является липемическим (т. е. плазма не мутная белая или молочно-непрозрачная).
- Образец не имеет свертков.



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Образцы, которые были неправильно сохранены или обработаны, могут стать непригодными. Если неподходящие образцы обрабатываются в ходе рабочего процесса, они могут засорить связывающий планшет во время экстракции и вызвать переливание образцов в соседние лунки.

3. Снимите крышку с пробирок и загрузите их в держатели пробирок. Загрузите все образцы и все контрольные образцы плазмы для серии.



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Если во время обработки ошибки отображается опция Exclude (Исключить), не выбирайте ее. Если метод не может продолжить работу после события обработки ошибок и у вас есть ограниченные возможности обработки ошибок, прервите запуск.

Выделение плазмы

Подготовка

1. Маркируйте 1 промежуточную плазму планшета с глубокими лунками и нанесите штрих-код.
2. Маркируйте 1 окончательную плазму планшета с глубокими лунками и нанесите штрих-код.
3. Для 24, 48 и 96 партий образцов перед началом метода загрузите полный штатив с индивидуально подсчитанными 8-канальными наконечниками.



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Убедитесь, что для промежуточных и окончательных плазменных планшетов используется правильный тип планшета. Использование резервуара с глубокими лунками вместо планшета с глубокими лунками приводит к амальгамации образца и может привести к неправильным результатам.

Процедура

1. Откройте AppLauncher и выберите VeriSeq NIPT Method (Метод).
2. Введите уникальный Batch ID (идентификатор серии) и имя пользователя, а затем нажмите ОК.

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq NIPT Solution v2

Batch ID (идентификатор серии) может содержать ≤ 26 символов. Вы можете использовать цифры, буквы, символы подчеркивания (_) или дефис (-). Например: 2025-10-16_Batch3.

В Batch ID (идентификатор серии) не учитывается регистр символов. Batch ID (идентификатор серии), чувствительные к регистру, не считаются уникальными.

Имена Batch ID (идентификатор серии) должны быть уникальными и различаться не только регистром. Например, названия серий Batch01 и Batch01 не являются уникальными. Это же правило применяется для присвоения имен идентификаторам образцов.

3. Выберите **New Batch** (Новая серия).
4. После инициации нажмите **OK**, чтобы начать выделение плазмы.
5. Выберите размер серии, а затем нажмите **OK**.
6. Выберите количество контролей без матрицы (NTC) и нажмите **OK**.
Слоты NTC всегда являются последними выбранными слотами. Например, если два NTC в 24 пробоотборном запуске, позиции 23 и 24 являются NTC.
7. Выполните один из следующих шагов:
 - Чтобы загрузить существующий протокол анализа, выберите протокол анализа, связанный с серией, а затем нажмите **OK**.
 - Чтобы продолжить, не выбирая протокол анализа, выберите **No Sample Sheet** (Нет протокола анализа).

Для получения информации о создании протокола анализа см. раздел *VeriSeq NIPT Solution v2 Software Guide (Руководство по программному обеспечению VeriSeq NIPT Solution v2)* (документ № 1000000067940).

ПРИМЕЧАНИЕ Для обеспечения надлежащего анализа данных для каждого образца необходимо точно регистрировать тип образца, одноплодная или двухплодная беременность. Если вы выбрали **No Sample Sheet** (Нет протокола анализа), убедитесь, что вы установили значения образцов по умолчанию в Workflow Manager Service Tools (Сервисных инструментах диспетчера рабочих процессов). Дополнительную информацию см. здесь: *VeriSeq NIPT Solution v2 Software Guide (Руководство по программному обеспечению VeriSeq NIPT Solution v2)* (документ № 1000000067940).

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq ^{illumina} NIPT Solution v2

8. Убедитесь, что все штрих-коды прикреплены, а затем загрузите образцы, наконечники и планшеты (штрих-кодом вправо) в держатель.
9. После каждого запроса на загрузку нажмите **ОК**.

Размер серии образцов	Держатель Тип	Отслеживание	Позиция	Положение сайта
24, 48, 96	Наконечник	7-12	Наконечники 1000 мкл	5
			Наконечники 1000 мкл (только партия 96)	4, 5
	Пробирка	15	Подготовленные пробирки для образцов крови 1-24 (для всех размеров партий)	1-24
	Пробирка	16	Подготовленные пробирки для образцов крови 25-48 (только для партий размером 48 и 96)	25-48
	Пробирка	17	Подготовленные пробирки с образцами крови 49-72 (только размер партии 96)	49-72
	Пробирка	18	Подготовленные пробирки с образцами крови 73-96 (только размер партии 96)	73-96
	Multiflex	19-24	Пустой планшет с глубокими лунками, окончательная плазма – штрих-код	4
	Multiflex	19-24	Пустой планшет с глубокими лунками, промежуточная плазма – штрих-код	5
	Реагент	47	[Необязательно]Фосфатно-солевой буфер Дульбекко (DPBS) для контроля без матрицы (NTC)	5

10. Убедитесь, что носители, лабораторная посуда и реагенты загружены правильно.
11. На экране Pre-Spin Deck Verification нажмите **ОК**.
12. Наблюдайте за выполнением ML STAR автоматических шагов.
13. При появлении запроса от менеджера рабочего процесса убедитесь, что на погрузочной платформе ML STAR нет препятствий ML STAR для выгрузки держателей.
14. Выберите **Unload (Выгрузить)**, чтобы выгрузить платформу.
15. Извлекают планшет с глубокими лунками промежуточной плазмы следующим образом.

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq ^{illumina} NIPT Solution v2

- a. Осмотрите планшет на предмет одинаковых объемов в каждой лунке (ошибки пипетирования отсутствуют). Ожидаемый объем составляет 1000 мкл.
 - b. Записывайте любые несоответствия после завершения процедуры выделения плазмы.
 - c. Герметизируйте планшет, сбалансируйте нагрузку и центрифугируйте при 5600 × g в течение 10 минут при выключенном или наименьшем значении параметра тормоза.
16. Выберите **Yes** (Да), чтобы перейти к окончательному приготовлению плазмы.
17. Снимите герметизацию планшета и установите планшет на держатель.

Размер серии образцов	Держатель Тип	Отслеживание	Позиция	Положение сайта
24, 48, 96	Multiflex	19-24	Планшет с глубокими лунками для промежуточной плазмы	5

18. Установите флажок **Промежуточный планшет с плазмой центрифугирован**, затем нажмите **ОК**.
19. Наблюдайте за выполнением ML STAR автоматических шагов.
20. По запросу менеджера рабочего процесса убедитесь, что на погрузочной платформе ML STAR нет препятствий ML STAR для выгрузки держателей.
21. Выберите **Unload (Выгрузить)**, чтобы выгрузить платформу.
22. По запросу менеджера рабочего процесса опорожните держатели и платформу.
23. Извлеките планшет с глубокими лунками для конечной плазмы.
24. Проверьте планшет на наличие следующих ошибок:

- Непостоянные объемы в каждой лунке. Ожидаемый объем составляет 900 мкл.
- Видимый клеточный осадок.
- Чрезмерный гемолиз.

Если вы заметили аномальный видимый клеточный осадок или чрезмерный гемолиз, по окончании метода выделения плазмы устраните недействительность пораженного образца или используйте диспетчер серий. Дополнительную информацию о Batch Manager см. в разделе *VeriSeq NIPT Solution v2 Software Guide (Руководство по программному обеспечению VeriSeq NIPT Solution v2) (документ № 1000000067940)*.

25. При появлении запроса от диспетчера рабочего процесса нажмите **ОК**.
26. Введите комментарии о затронутых лунках и нажмите **ОК**.
27. Выполните один из следующих шагов.
- Чтобы перейти к экстракции cfDNA, выберите **Yes** (Да).
 - Чтобы остановиться, выберите **Exit** (Выход).

ТОЧКА БЕЗОПАСНОЙ ОСТАНОВКИ

Если вы останавливаетесь, герметизируйте планшет с конечной плазмой и храните при температуре от 2 °C до 8 °C в течение не более 7 дней.

Экстрагируйте cfDNA

Подготовка

1. Осмотрите коробки с извлеченными компонентами и принадлежностями, чтобы убедиться, что срок годности наборов не истек.
2. Подготовьте следующие реагенты: Нанесите на резервуарные пробирки и резервуары с глубокими лунками название реагентов.

Реагент	Хранение	Инструкции
Планшет с глубокими лунками для конечной плазмы	от 2 °C до 8 °C	Если хранился ранее, дайте ему постоять 30 минут, чтобы довести его до комнатной температуры. Центрифугируйте 20 секунд при 1000 × g. Разгерметизируйте перед использованием планшет с глубокими лунками для конечной плазмы.

3. Медленно добавляйте 3,75 мл буфера для протеиназы в каждый флакон с реагентом, содержащим протеиназу К.
 - Подготовьте 3 флакона для 24 и 48 образцов.
 - Подготовьте 4 флакона для 96 образцов.

4. Закройте флаконы с протеиназой К и перемешайте на вихревой мешалке до ресуспендирования.



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Не загрязняйте резиновую пробку. Попадание других веществ на резиновую пробку может загрязнить будущие образцы.

5. Объедините приготовленную протеиназу К из всех флаконов в пробирку для реагентов и маркируйте ее как протеиназу К.
6. Добавьте 100 мл 100 % EtOH в каждый флакон с реагентом промывочного буфера II.
 - Подготовьте 1 флакон для 24 и 48 образцов.
 - Подготовьте 2 флакона для 96 образцов.
7. Переверните флаконы промывочного буфера II для перемешивания.
8. Отметьте ячейки в бутылках промывочного буфера II.
9. Маркируйте 1 новый промежуточный полноразмерный планшет и приклейте штрих-код планшета.
10. Маркируйте 1 новый полноразмерный планшет для элюирования cfDNA и приклейте штрих-код планшета.
11. Маркируйте 1 новый промежуточный планшет с глубокими лунками для экстракции и приклейте штрих-код планшета с глубокими лунками.
12. Нанесите штрих-код на планшет для связывания ДНК.
13. Нанесите фольгу для герметизации на неиспользованные лунки для 24 и 48 серий образцов.

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq ^{illumina} NIPT Solution v2

14. Приготовьте 70 % раствор для очистки EtOH (70 % EtOH, 30 % воды, не содержащей ДНКазу/РНКазу) для очистки вакуумной системы.
15. Подготовьте вакуумную систему следующим образом.
 - a. Снимите вакуумный коллектор и очистите его 70 % раствором EtOH.
Избегайте очистки прокладки с помощью EtOH, так как это может привести к хрупкости материала.
 - b. Опорожните бутылку вакуумных отходов.
 - c. Убедитесь, что вакуумная система ML STAR включена.

Процедура

1. Нажмите **ОК**, чтобы начать экстракцию cfDNA.
2. Если **метод VeriSeq NIPT** не открыт:
 - a. Откройте AppLauncher и выберите **VeriSeq NIPT Method** (Метод VeriSeq NIPT).
 - b. Введите идентификатор серии и имя пользователя, а затем нажмите **ОК**.
3. Загрузите наконечники на держатели наконечников следующим образом, а затем нажмите **ОК**.



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Перед началом метода для серий из 24, 48 и 96 образцов добавьте полный штатив с 8-канальными наконечниками.

Размер серии образцов	Держатель Тип	Отслеживание	Позиция	Положение сайта
24	Наконечник	1-6	Наконечники 1000 мкл	1
		7-12	Наконечники 300 мкл	1
48	Наконечник	1-6	Наконечники 1000 мкл	1, 2
		7-12	Наконечники 300 мкл	1
96	Наконечник	1-6	Наконечники 1000 мкл	1, 2, 3, 4
		7-12	Наконечники 300 мкл	1

4. Загрузите подсчитанные наконечники в держатели наконечников следующим образом.

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq ^{illumina} NIPT Solution v2

Размер серии образцов	Держатель Тип	Отслеживание	Позиция	Положение сайта
24, 48, 96	Наконечник	49-54	Наконечники 1000 мкл	1
			Наконечники 300 мкл	2
			Наконечники 50 мкл	3

- Введите расположение первого и последнего наконечников для каждого штатива наконечников, а затем нажмите **ОК**.
- Отсканируйте штрихкоды блока для извлечения.
- Введите имя пользователя или инициалы лица, готовившего реагенты, затем нажмите **ОК**.
- Сканируйте штрихкоды комплекта принадлежностей.
- Введите имя пользователя или инициалы лица, готовившего реагенты, затем нажмите **ОК**.
- Убедитесь, что штрих-коды прикреплены.
- При необходимости разгерметизируйте планшет с глубокими лунками для конечной плазмы.
- Загрузите планшеты (штрих-кодом вправо) в держатель планшета следующим образом, а затем нажмите **ОК**.

Размер серии образцов	Держатель Тип	Отслеживание	Позиция	Положение сайта
24, 48, 96	Multiflex	19-24	Новый полноразмерный планшет, промежуточный, со штрих-кодом	1
			Новый полноразмерный планшет, элюирование cfDNA, со штрих-кодом	2
			Новый планшет с глубокими лунками, промежуточный продукт экстракции, штрих-код	4
			Планшет с глубокими лунками для конечной плазмы, со штрих-кодом	5

- Убедитесь, что планшет для связывания ДНК имеет штрих-код, затем нажмите **ОК**.
- Для партий частичного планшета наносят обрезанную герметизирующую пленку планшета на неиспользованные лунки (столбцы 4-12 для партий из 24 образцов и колонки 7-12 для партий из 48 образцов).
- Загрузите планшет для связывания ДНК в вакуумный коллектор штрих-кодом вправо.
- Перед установкой связывающего планшета на коллектор BVS осмотрите лунки на предмет возможных препятствий.
Это может препятствовать потоку реагентов в вакууме.

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq ^{illumina} NIPT Solution v2

17. При использовании партий из 24 или 48 образцов закройте неиспользованные лунки и герметизируйте фольгой. Установите флажок **Are DNA Binding Plate Columns Sealed** (Герметизированы ли колонки планшета для связывания ДНК?), а затем нажмите ОК.

18. Загрузите пробирки с реагентами в держатель реагентов следующим образом, а затем нажмите ОК.

Размер серии образцов	Держатель Тип	Отслеживание	Позиция	Положение сайта
24, 48	Реагент	47	16 мл Elution Buffer	1
			11 мл протеиназы К	2
96	Реагент	47	16 мл Elution Buffer	1
			15 мл Протеиназа К	2

19. Перенесите указанные реагенты в резервуары с глубокими лунками, а затем загрузите резервуары в носители для глубоких лунок следующим образом.

20. Выберите ОК.

Размер серии образцов	Держатель Тип	Отслеживание	Позиция	Положение сайта
24, 48	Глубоколуночный	39-44	125 мл промывочного буфера II	1
			125 мл промывочного буфера I	2
			60 мл 100 % EtOH	3
			100 мл Lysis Buffer (Буфер для лизиса)	4
			60 мл воды, не содержащей ДНКазу/РНКазу	5
96	Глубоколуночный	39-44	200 мл промывочного буфера II	1
			125 мл промывочного буфера I	2
			100 мл 100 % EtOH	3
			100 мл Lysis Buffer (Буфер для лизиса)	4
			100 мл воды, не содержащей ДНКазу/РНКазу	5

21. Дождитесь завершения автоматической проверки объема реагента.

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq ^{illumina} NIPT Solution v2

22. Убедитесь, что контейнер для вакуумных отходов пуст (рекомендуется держать его наполовину полным), а затем нажмите **ОК**.
23. Подтвердите размещение всех держателей, лабораторной посуды и реагентов, а затем нажмите **ОК** на экране Extraction Deck Verification (Проверка платформы экстракции).
24. Наблюдайте за ML STAR во время автоматических шагов.



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Перед загрязнением близлежащих лунок необходимо вручную объявить недействительным переполнение образца, не обнаруженное системой.

25. После заключительного этапа вакуумирования извлеките планшет для связывания ДНК и очистите нижнюю поверхность 70 % EtOH.
26. Герметизируйте все непокрытые лунки на планшете для связывания ДНК и поместите планшет для связывания ДНК на пустой планшет с глубокими лунками для конечной плазмы.
27. Центрифугируйте планшет для связывания ДНК/планшет для конечной плазмы при 5600 × g в течение 10 минут с включенным тормозом.
28. Выберите **ОК**.
29. Во время центрифугирования планшета для связывания ДНК выполните очистку вакуумную систему:
 - a. Снимите вакуумный коллектор и нажмите **ОК**.
 - b. Дождитесь завершения автоматического удаления отходов.
 - c. Очистите вакуумный коллектор и внутреннюю часть вакуумной системы 70 % EtOH, а затем замените вакуумный коллектор.
 - d. Установите флажок **Manifold is on Vacuum** (Вакуумный коллектор включен), чтобы инициировать перемещение планшета для элюирования на вакуумном коллекторе, а затем выберите **ОК**.
30. После центрифугирования разгерметизируйте лунки, содержащие образцы, на планшете для связывания ДНК.
31. Поместите планшет для связывания ДНК поверх планшета для элюирования cfDNA, который находится на вакуумном коллекторе.
32. Загрузите планшет для связывания ДНК со штрих-кодом, направленным вправо, и нажмите **ОК**.
33. Наблюдайте за ML STAR во время автоматических шагов.
34. После этапа инкубации установите флажок **Plates are assembled as indicated** (Планшеты собраны, как указано). Убедитесь, что сборка планшета для связывания ДНК/элюирования cfDNA находится на опорной основе (если требуется центрифугой).
35. Герметизируйте непокрытые лунки на планшете для связывания ДНК.
36. Центрифугируйте при 5600 g в течение 2 минут при включенном тормозе, затем нажмите **ОК**.
37. Визуально осмотрите планшет для элюирования cfDNA на предмет согласованных объемов в каждой лунке.

Ожидаемый объем составляет приблизительно 55 мкл.
38. Герметизируйте и сохраните планшет для элюирования cfDNA для приготовления библиотеки.

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq ^{illumina} NIPT Solution v2

39. По запросу менеджера рабочего процесса убедитесь, что на погрузочной платформе ML STAR нет препятствий для выгрузки держателей.
40. Выберите **Unload (Выгрузить)**, чтобы выгрузить платформу.
41. Выгрузите все держатели и очистите платформу ML STAR, а затем нажмите **OK**.
42. Введите комментарии о затронутых лунках и нажмите **OK**.
43. Выполните один из следующих шагов:
 - Чтобы продолжить подготовку библиотек, выберите **Yes (Да)**.
 - Чтобы остановиться, выберите **Exit (Выход)**.

ТОЧКА БЕЗОПАСНОЙ ОСТАНОВКИ

При остановке герметизируйте планшет для элюирования cfDNA и храните при температуре от -25 °C до -15 °C в течение не более 7 дней.

Подготовка библиотек

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq ^{illumina} NIPT Solution v2

Подготовка

1. Осмотрите коробки комплектов для подготовки библиотеки и принадлежностей, чтобы убедиться, что срок годности наборов не истек.
2. Подготовьте следующие реагенты: Нанесите на резервуарные пробирки и резервуары с глубокими лунками название реагентов.

Реагент	Хранение	Инструкции
A-Tailing Mix	от -25 °C до -15 °C	Разморозьте при комнатной температуре. Быстро перемешайте на вихревой мешалке, а затем быстро отцентрифугируйте.
Планшет для элюирования cfDNA	от -25 °C до -15 °C	Если планшет хранился ранее, убедитесь, что он хранился не более 7 дней, и разморозьте его при комнатной температуре. Обработайте на вихревой мешалке при 1500 об/мин в течение 1 минуты. Центрифугируйте 20 секунд при 1000 × g.
End Repair Mix (Смесь для восстановления концов)	от -25 °C до -15 °C	Разморозьте при комнатной температуре. Перемешайте на вихревой мешалке.
Гибридизационный буфер	от -25 °C до -15 °C	Разморозьте при комнатной температуре. Перемешайте на вихревой мешалке. Верните на хранение после использования.
Ligation Mix	от -25 °C до -15 °C	Разморозьте при комнатной температуре. Быстро перемешайте на вихревой мешалке, а затем быстро отцентрифугируйте.
Планшет с адаптером ДНК NIPT	от -25 °C до -15 °C	Разморозьте при комнатной температуре. Перемешайте на вихревой мешалке. Центрифугируйте 20 секунд при 1000 × g.
Resuspension Buffer	от 2 °C до 8 °C	Перемешайте на вихревой мешалке. Верните на хранение после использования.
Sample purification beads	от 2 °C до 8 °C	Дайте отстояться 30 минут, чтобы довести его до комнатной температуры. Энергично встряхивайте перед каждым использованием. Перемешайте на вихревой мешалке или переворачивайте до тех пор, пока все гранулы не окажутся в суспензии и смесь не станет однородной.

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq ^{illumina} NIPT Solution v2



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

При распечатывании планшета адаптера ДНК NIPT будьте предельно осторожны, чтобы избежать перекрестного загрязнения аэрозоля между лунками, что может привести к неправильным результатам.

- Если планшет для элюирования cfDNA хранился в замороженном виде, приготовьте его следующим образом.
 - Разморозьте при комнатной температуре.
 - Обработайте на вихревой мешалке при 1500 об/мин в течение 1 минуты.
 - Центрифугируйте 20 секунд при 1000 × g.
- Маркируйте 1 новый полноразмерный планшет библиотек и приклейте штрих-код планшета.
- Подготовьте 80 % EtOH из абсолютного EtOH. Объедините 40 мл 100 % EtOH и 10 мл воды, не содержащей ДНКазу/RNase. Переверните колбу, чтобы перемешать содержимое.
- Убедитесь, что регулятор температуры ML STAR включен.

Разбавьте ферменты

- Смешайте A-Tailing Mix и Resuspension Buffer в пробирке с завинчивающейся крышкой. Быстро перемешайте на вихревой мешалке, а затем быстро отцентрифугируйте.

Размер серии образцов	A-Tailing Mix (мкл)	Resuspension Buffer (мкл)
24, 48	900	1200
96	1800	2400

- Смешайте Ligation Mix и Resuspension Buffer в пробирке с завинчивающейся крышкой. Быстро перемешайте на вихревой мешалке, а затем быстро отцентрифугируйте.

Размер серии образцов	Ligation Mix (мкл)	Resuspension Buffer (мкл)
24, 48	230	1713
96	440	3278

Процедура

- Нажмите **ОК**, чтобы начать подготовку библиотеки. Если метод **VeriSeq NIPT Method** еще не открыт:
 - Откройте AppLauncher и выберите **VeriSeq NIPT Method** (Метод VeriSeq NIPT).
 - Введите идентификатор серии и имя пользователя, а затем нажмите **ОК**.
- Убедитесь, что приготовлены следующие расходные материалы, как указано на экране Reagent Preparation (Подготовка реагентов):
 - A-Tailing Mix, Ligation Mix и 80 % EtOH
 - Sample Purification Beads, End Repair Mix и планшет с адаптером ДНК NIPT
- Установите флажки и нажмите **ОК**.

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq ^{illumina} NIPT Solution v2

4. Отсканируйте штрихкоды комплекта подготовки библиотеки.
5. Введите имя пользователя или инициалы лица, готовившего реагенты, затем нажмите **OK**.
6. Сканируйте штрихкоды комплекта принадлежностей.
7. Введите имя пользователя или инициалы лица, готовившего реагенты, затем нажмите **OK**.
8. Загрузите наконечники на держатели наконечников следующим образом, а затем нажмите **OK** для каждого держателя.

Размер серии образцов	Держатель Тип	Отслеживание	Позиция	Положение сайта
24	Наконечник	1-6	Наконечники 50 мкл	1
		7-12	Наконечники 300 мкл	1, 2
48	Наконечник	1-6	Наконечники 50 мкл	1, 2
		7-12	Наконечники 300 мкл	1, 2, 3, 4
96	Наконечник	1-6	Наконечники 50 мкл	1, 2, 3, 4
		7-12	Наконечники 300 мкл	1, 2, 3, 4, 5

9. Если протокол был остановлен после процедуры экстракции cfDNA, загрузите подсчитанные наконечники на носители наконечников следующим образом.

Размер серии образцов	Держатель Тип	Отслеживание	Позиция	Положение сайта
24, 48, 96	Наконечник	49-54	Наконечники 1000 мкл	1
			Наконечники 300 мкл	2
			Наконечники 50 мкл	3

10. Введите расположение первого наконечника для каждого штатива наконечников, а затем нажмите **OK**.

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq ^{illumina} NIPT Solution v2

11. Убедитесь, что штрих-коды прикреплены, и загрузите планшеты (штрих-код обращен вправо) на держатель планшета следующим образом, а затем нажмите **ОК**.

Размер серии образцов	Держатель Тип	Отслеживание	Позиция	Положение сайта
24, 48, 96	Multiflex	19-24	Планшет для элюирования cfDNA, со штрих-кодом	1
			Планшет с адаптером ДНК NIPT, со штрих-кодом	2
			Новый 96-луночный полноразмерный планшет, библиотеки, со штрих-кодом	3
			Новые полноразмерные 96-луночные планшеты	4, 5

12. Загрузите держатель для глубоких лунок следующим образом, а затем нажмите **ОК**.

Размер серии образцов	Держатель Тип	Отслеживание	Позиция	Положение сайта
24, 48, 96	Глубоколуночный	39-44	50 мл 80 % EtOH в глубоколуночном резервуаре	1
			Новые полноразмерные 96-луночные планшеты	2, 3, 4, 5

13. Загрузите пробирки с реагентами в держатель реагентов следующим образом, а затем нажмите **ОК**.

Размер серии образцов	Держатель Тип	Отслеживание	Позиция	Положение сайта
24, 48, 96	Реагент	47	2,5 мл End Repair Mix	1
			Приготовленная A-Tailing Mix (общий объем)	2
			Приготовленная Ligation Mix (общий объем)	3
			Sample purification beads, 10 мл	4
			Hybridization Buffer, 12 мл	5

14. Оставшуюся часть Hybridization Buffer (HT1) объемом 12 мл сохраняют в контейнере для объединения.

15. Убедитесь, что держатели, лабораторная посуда и реагенты загружены в соответствии с указаниями, а затем нажмите **ОК** на экране Library Deck Verification (Проверка платформы библиотек).

16. Дождитесь завершения автоматической проверки объема реагента.

17. Наблюдайте за ML STAR во время автоматических шагов.

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq ^{illumina} NIPT Solution v2

18. По запросу менеджера рабочего процесса убедитесь, что на погрузочной платформе ML STAR нет препятствий ML STAR для выгрузки держателей.
19. Выберите **Unload (Выгрузить)**, чтобы выгрузить платформу.
20. Осмотрите планшет с библиотеками на предмет одинаковых объемов в каждой лунке.



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Если объемы лунок различаются, образцы могут не пройти автоматизированный контроль качества.

21. При хранении герметизируйте и сохраните планшет библиотеки.
22. Выгрузите держатели, очистите платформу и нажмите **ОК**.
23. Введите комментарии о затронутых лунках и нажмите **ОК**.
24. Выполните один из следующих шагов:
 - Чтобы продолжить количественное определение библиотек, выберите **Yes (Да)**.
 - Чтобы остановиться, выберите **Exit (Выход)**.

ТОЧКА БЕЗОПАСНОЙ ОСТАНОВКИ

При остановке герметизируйте планшет библиотек перед хранением. Планшет библиотек стабилен в течение до 7 дней с даты приготовления при температуре от -25 °C до -15 °C.

Количественное определение библиотеки

Подготовка

1. Подготовьте следующие реагенты:

Реагент	Хранение	Инструкции
Реагент для количественного определения ДНК	от 2 °C до 8 °C	Хранить в защищенном от света месте. Размораживайте при комнатной температуре в течение 30-150 минут. (Рекомендуется удалить реагент в начале процедуры Подготовить библиотеки.) Быстро перемешайте на вихревой мешалке, а затем быстро отцентрифугируйте.
Стандарт для количественного определения ДНК	от 2 °C до 8 °C	Быстро перемешайте на вихревой мешалке, а затем быстро отцентрифугируйте.
Resuspension Buffer	от 2 °C до 8 °C	Перемешайте на вихревой мешалке.

2. Если планшет для с библиотеками хранился в замороженном виде, подготовьте его следующим образом.
 - a. Убедитесь, что планшет хранился не более 7 дней, и разморозьте его при комнатной температуре.
 - b. Перемешивание на вихревой мешалке

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq NIPT Solution v2 illumina®

- c. Центрифугируйте при 1000×g в течение максимум 1 минуты.
3. Включите флуориметр за 10 минут до использования.
4. Нанесите штрих-код на новый 384-луночный планшет.
5. Нанесите штрих-код на новый полноразмерный планшет.

Процедура

1. Нажмите **ОК**, чтобы начать количественное определение.
2. Если метод VeriSeq NIPT Method еще не открыт:
 - a. Откройте AppLauncher и выберите **VeriSeq NIPT Method** (Метод VeriSeq NIPT).
 - b. Введите идентификатор серии и имя пользователя, а затем нажмите **ОК**.
3. Сканируйте штрихкоды комплекта принадлежностей.
4. Введите имя пользователя или инициалы лица, готовившего реагенты, затем нажмите **ОК**.
5. Загрузите наконечники на держатели наконечников следующим образом, а затем нажмите **ОК**.

Размер серии образцов	Держатель Тип	Отслеживание	Позиция	Положение сайта
24, 48	Наконечник	1-6	Штатив для наконечников 300 мкл	1
			Штатив для наконечников 50 мкл	2
96	Наконечник	1-6	Штатив для наконечников 300 мкл	1
			Штатив для наконечников 50 мкл	2, 3

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq ^{illumina} NIPT Solution v2

6. Убедитесь, что штрих-коды прикреплены.
7. При необходимости разгерметизируйте планшет библиотек.
8. Загрузите планшеты (штрих-коды должен быть направлен вправо) в держатель Multiflex следующим образом, а затем нажмите **ОК**.

Размер серии образцов	Держатель Тип	Отслеживание	Позиция	Положение сайта
24, 48, 96	Multiflex	19-24	Новые полноразмерные планшеты со штрих-кодом	1
			Новый 384-луночный планшет со штрих-кодом	2
			Планшет с библиотеками, со штрих-кодом	3
			Новые полноразмерные 96-луночные планшеты	4, 5

9. Загрузите пробирки с реагентами без крышек в держатель пробирок следующим образом, а затем нажмите **ОК**.

Размер серии образцов	Держатель Тип	Отслеживание	Позиция	Положение сайта
24, 48, 96	Пробирка	46	Стандарт для количественного определения ДНК	1
			Реагент для количественного определения ДНК	2

10. Загрузите пробирки с реагентами в держатель реагентов следующим образом, а затем нажмите **ОК**.

Размер серии образцов	Держатель Тип	Отслеживание	Позиция	Положение сайта
24, 48, 96	Реагент	47	Новая пробирка для реагентов (пустая)	1
			16 мл Resuspension Buffer	2

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq ^{illumina} NIPT Solution v2

11. Если протокол был остановлен после процедуры подготовки библиотеки, загрузите подсчитанные наконечники в держатели наконечников следующим образом.

Размер серии образцов	Держатель Тип	Отслеживание	Позиция	Положение сайта
24, 48, 96	Наконечник	49-54	Наконечники 1000 мкл	1
			Наконечники 300 мкл	2
			Наконечники 50 мкл	3

12. Введите расположение первого и последнего наконечников для каждого штатива наконечников, а затем нажмите **ОК**.
13. Убедитесь, что держатели, лабораторная посуда и реагенты загружены в соответствии с указаниями, а затем нажмите **ОК** на экране Verification Quant Deck (Проверка платформы количественного анализа).
14. Дождитесь завершения автоматической проверки объема реагента.
15. Наблюдайте за ML STAR во время автоматических шагов.
16. По запросу менеджера рабочего процесса убедитесь, что на погрузочной платформе ML STAR нет препятствий ML STAR для выгрузки держателей.
17. Выберите **Unload** (Выгрузить), чтобы выгрузить платформу.
18. Выгрузите планшет с библиотеками.
- Осмотрите планшет на предмет одинаковых объемов в каждой лунке.
 - Герметизируйте планшет библиотеки и храните при комнатной температуре до завершения флуориметрического анализа данных.
19. Выгрузите оставшиеся 96-луночные планшеты и проверьте наличие одинаковых объемов в каждой лунке. Макроскопические ошибки в объеме могут указывать на проблему с этапами пипетирования.
20. Выгрузите 384-луночный планшет и проверьте наличие жидкости в соответствующих лунках.
21. Герметизируйте планшет фольгой.
22. Центрифугируйте 20 секунд при 1000 × g.
23. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 10 минут в защищенном от света месте.
24. Выгрузите все держатели.
25. Очистите платформу ML STAR и нажмите **ОК**.



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Не выбрасывайте реагенты для количественного определения до получения данных. Вам потребуются реагенты, если необходимо выполнить количественное определение.

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq ^{illumina} NIPT Solution v2

26. После инкубации снимите фольгу и загрузите 384-луночный планшет в считывающее устройство для микропланшетов. Обязательно используйте фиолетовый переходный планшет (номер по каталогу: 0310-4336), предоставленный компанией Molecular Devices, или эквивалентный, если это применимо к используемому прибору.
 - При загрузке убедитесь, что A1 находится в верхнем левом углу.
27. Дважды выберите шаблон VeriSeq NIPT, чтобы открыть его в SoftMax Pro.
28. Выберите **New Experiment** (Новый эксперимент) на вкладке Home (Главная страница).
29. Выберите **Read** (Прочтение).
30. Экспортируйте данные в формате XML следующим образом.
 - a. Правой кнопкой мыши выберите **Plate** (Планшет), а затем выберите **Rename** (Переименовать).
 - b. Отсканируйте штрих-код планшета для количественного определения и нажмите **OK**.
 - c. В верхнем левом углу экрана выберите значок планшета, а затем выберите **Export** (Экспорт) в меню.
 - d. Установите флажок **Expt name** (Экспортировать имя), установите параметр даты планшета в необработанное значение, установите формат вывода в XML и нажмите **OK**.
 - e. Задайте путь к файлу выходных данных и имя, а затем нажмите **Save** (Сохранить).
Компьютер Hamilton должен иметь доступ к расположению файла. Не используйте пробелы в имени файла или пути к файлу.

Анализ

1. На ML STAR, на экране Информация о сканере введите идентификатор флуориметра.
2. Введите комментарии о запуске флуориметра и нажмите **OK**.
3. Перейдите к файлу количественного определения *.xml, содержащему флуорометрические данные, и нажмите **OK**.
4. Просмотрите кривую стандартов и результаты анализа концентрации образца, а затем нажмите **OK**.
5. Если необходимо повторно отсканировать планшет, нажмите **Rescan** (Повторное сканирование).
Образцы чувствительны к времени и свету. При необходимости немедленно выполните повторное сканирование.
6. Введите комментарии о затронутых лунках и нажмите **OK**.
7. Оцените результаты и выполните следующие действия.
 - Если результаты соответствуют спецификации, перейдите к [Объединение библиотек на странице 43](#). Спецификации см. в таблице показателей контроля качества и границ количественного определения в *VeriSeq NIPT Solution v2 Software Guide (Руководство по программному обеспечению VeriSeq NIPT Solution v2)* (документ № 1000000067940).
 - Если результаты не соответствуют спецификации, система прерывает метод. Повторите процедуры количественного определения, начиная с [Подготовка на странице 38](#).
8. Выполните один из следующих шагов:
 - Чтобы перейти к [Объединение библиотек на странице 43](#), выберите Yes (Да).

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq NIPT Solution v2

- Чтобы остановиться, выберите Exit (Выход).

ТОЧКА БЕЗОПАСНОЙ ОСТАНОВКИ

При остановке герметизируйте планшет библиотек перед хранением. Планшет с библиотеками стабилен в течение до 7 дней суммарного времени хранения при температуре от -25 °C до -15 °C.

Объединение библиотек

Подготовка

1. Подготовьте следующие реагенты:

Реагент	Хранение	Инструкции
Гибридизационный буфер	от -25 °C до -15 °C	Разморозьте при комнатной температуре. Перемешайте на вихревой мешалке. Верните на хранение после использования.

2. Если планшет для с библиотеками хранился в замороженном виде, приготовьте его следующим образом.
 - a. Убедитесь, что планшет хранился не более 7 дней, и разморозьте его при комнатной температуре.
 - b. Обработайте на вихревой мешалке при 1500 об/мин в течение 1 минуты.
 - c. Центрифугируйте 20 секунд при 1000 × g.
 - d. Пипетируйте для перемешивания.
3. Пометьте пустую пробирку для пула А. Для 96 образцов пометьте вторую пустую пробирку для пула В.
4. Сохраните следующую программу денатурации на термоциклере с нагреваемой крышкой.
 - a. Выберите вариант с предварительно разогретой крышкой и установите температуру на 102 °C.
 - b. Установите объем реакции на 50 мкл.
 - c. Установите максимальную скорость линейного изменения (≥ 2 °C в секунду).
 - d. Инкубируйте при температуре 96 °C в течение 10 минут, а затем при температуре 4 °C в течение 5 секунд.
 - e. Выдержите при температуре 4 °C.

Процедура

1. Поместите планшет библиотек на предварительно запрограммированный термоциклер и запустите программу денатурации.

Не денатурируйте планшет библиотек до того, как количественный анализ пройдет контроль качества, так как возможно, потребуется выполнить повторный количественный анализ.
2. Кратковременно центрифугируйте планшет библиотек при 1000 × g в течение 20 секунд.
3. Нажмите **OK**, чтобы запустить объединение библиотек в пул.
4. Если метод VeriSeq NIPT не открыт:
 - a. Откройте AppLauncher и выберите **VeriSeq NIPT Method** (Метод VeriSeq NIPT).

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq NIPT Solution v2

b. Введите идентификатор серии и имя пользователя, а затем нажмите **ОК**.

5. Выберите концентрацию пула, а затем нажмите **ОК**.
Целевая плотность кластера составляет 220-260 К/мм².

ПРИМЕЧАНИЕ Возможно, потребуется увеличить концентрации и/или объемы пула для 24 серий образцов, чтобы поддерживать схожую плотность кластера, полученную для 48/96 серий образцов.

6. При появлении запроса от диспетчера рабочего процесса Workflow Manager выполните один из следующих шагов:
- Чтобы загрузить протокол анализа, выберите протокол анализа, связанный с серией, а затем выберите **Load** (Загрузить).
 - Чтобы использовать системные значения по умолчанию для оставшихся типов образцов, отчета о половой принадлежности или типа экрана, выберите **Use Default** (Использовать по умолчанию) для каждой настройки.
Для получения информации о создании протокола анализа см. *VeriSeq NIPT Solution v2 Software Guide (Руководство по программному обеспечению VeriSeq NIPT Solution v2)* (документ № 1000000067940).
7. Выберите **Start** (Пуск), чтобы начать отсчет времени для денатурирующего планшета.
8. Загрузите наконечники в держатели наконечников следующим образом.

Размер серии образцов	Держатель Тип	Отслеживание	Позиция	Положение сайта
24, 48, 96	Наконечник	7-12	Наконечники фильтровальные 50 мкл	1

9. Загрузите планшет денатурированной библиотеки (штрихкодом вправо) в держатель Multiflex следующим образом, затем нажмите **ОК**.

Размер серии образцов	Держатель Тип	Отслеживание	Позиция	Положение сайта
24, 48, 96	Multiflex	19-24	Планшет денатурированной библиотеки (со штрих-кодом)	1

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq ^{illumina} NIPT Solution v2

10. Загрузите пробирки для объединения в держатель пробирок следующим образом, затем нажмите **ОК**.

Размер серии образцов	Держатель Тип	Отслеживание	Позиция	Положение сайта
24, 48	Пробирка	46	Новая пробирка объемом 2 мл, пул А	1
96	Пробирка	46	Новая пробирка объемом 2 мл, пул А	1
			Новая пробирка объемом 2 мл, пул В	2

11. Загрузите пробирки с реагентами в держатель реагентов следующим образом, а затем нажмите **ОК**.

Размер серии образцов	Держатель Тип	Отслеживание	Позиция	Положение сайта
24, 48, 96	Реагент	47	Гибридизационный буфер, 3 мл	1

12. Загрузите наконечники в держатели наконечников следующим образом.

Размер серии образцов	Держатель Тип	Отслеживание	Позиция	Положение сайта
24, 48, 96	Наконечник	49-54	Наконечники фильтровальные 1000 мкл	1
			Наконечники фильтровальные 300 мкл	2
			Наконечники фильтровальные 50 мкл	3

13. Введите расположение первого и последнего наконечников для каждого штатива наконечников, а затем нажмите **ОК**.

14. Убедитесь, что носители, лабораторная посуда и реагенты загружены правильно.

15. На экране Pooling Deck Verification (Проверка платформы объединения) нажмите **ОК**.

16. Наблюдайте за ML STAR во время автоматических шагов.

17. Введите комментарии о затронутых лунках и нажмите **ОК**.

18. По запросу менеджера рабочего процесса убедитесь, что на погрузочной платформе ML STAR нет препятствий ML STAR для выгрузки держателей.

19. Выберите **Unload (Выгрузить)**, чтобы выгрузить платформу.

20. Выгрузите держатель пробирки.

21. Закройте каждую пробирку для объединения, перемешайте на вихревой мешалке, а затем ненадолго центрифугируйте.

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq NIPT Solution v2

22. Выберите **ОК**.
23. Секвенируйте библиотеки как можно скорее после объединения. Закройте планшет библиотеки и храните при температуре от -25 °C до -15 °C в течение 7 дней, чтобы обеспечить повторное объединение.

ТОЧКА БЕЗОПАСНОЙ ОСТАНОВКИ

Если вы останавливаетесь, закройте пробирки для сбора образцов крышками и храните при температуре от -25 °C до -15 °C в течение не более 7 дней.

Подготовка объединенных библиотек к секвенированию

Подготовка

1. Подготовьте следующие реагенты:

Реагент	Хранение	Инструкции
Пробирки для пула	от -25 °C до -15 °C	Если хранился ранее, разморозьте его при комнатной температуре. Кратковременно перемешайте на вихревой мешалке. Кратковременно центрифугируйте.

2. Подготовьте система секвенирования нового поколения, заполнив следующие поля в модуле Local Run Manager модуль VeriSeq NIPT :
 - a. Название запуска
 - b. [Необязательно] Описание запуска
 - c. Pool Barcode (Штрих-код пула)



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Штрих-код пула, введенный в Модуль Local Run Manager, должен совпадать со штрих-кодом пула, введенным в диспетчере рабочих процессов Workflow Manager. Программное обеспечение для анализа отклоняет запуски с неправильными настройками, необходимо повторить секвенирование.

Дополнительную информацию об использовании Local Run Manager модуль VeriSeq NIPT см. в *VeriSeq NIPT Solution v2 Software Guide (Руководство по программному обеспечению VeriSeq NIPT Solution v2)* (документ № 1000000067940).

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq NIPT Solution v2

Процедура

1. Смешайте следующие объемы с картриджем с реагентом, а затем пипетируйте для перемешивания.
 - Гибридизационный буфер (900 мкл)
 - 450 мкл пула А (450 мкл)
2. Выполните секвенирование, используя справочное руководство для вашего прибора для секвенирования нового поколения. Для получения информации о NextSeq 550Dx см. *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Справочное руководство к прибору NextSeq 550Dx) (документ № 1000000009513)* (или см. соответствующий листок-вкладыш, указанный на странице Illumina поддержки www.support.illumina.com).
3. При появлении запроса подтвердите правильную конфигурацию запуска.
4. При необходимости повторите эту процедуру для пула В.
 - Для достижения целевого диапазона плотности кластера планшет библиотеки можно повторно объединить с использованием другой концентрации для объединения на Hamilton. Повторное объединение аннулирует исходный пул.
 - В качестве альтернативы, отношение пула к HT1 (450 мкл + 900 мкл) может быть изменено для достижения целевого диапазона плотности кластера.

Секвенирование нового поколения

VeriSeq NIPT Solution v2 может использоваться с система секвенирования нового поколения со следующими спецификациями:

- Возможность 2x36 парноконцевых прочтений
- Совместимость с адаптерами индекса из набора для подготовки образцов Набор для подготовки образцов VeriSeq NIPT Sample Prep Kit.
- Химический метод с двумя метками
- Автоматическое создание файлов BCL (*.bcl) (необработанные данные из инструмента секвенирования)
- 400 миллионов парноконцевых прочтений на запуск
- Совместим с Программное обеспечение VeriSeq NIPT Assay Software v2

NextSeq 550Dx совместим с VeriSeq NIPT Solution v2

Анализ данных секвенирования

После завершения секвенирования данные секвенирования автоматически отправляются в Программное обеспечение VeriSeq NIPT Assay Software v2 для анализа и создания отчета. Отчет включает классификации для каждого образца в серии, а также оценку всех показателей контроля качества запуска. Процесс анализа от завершения секвенирования до получения окончательных результатов для серии из 48 образцов занимает

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq NIPT Solution v2

приблизительно 4 часа. Для получения подробной информации об анализе данных и файле выходных данных обратитесь к *VeriSeq NIPT Solution v2 Software Guide (Руководство по программному обеспечению VeriSeq NIPT Solution v2)* (документ № 1000000067940).

Интерпретация результатов

Алгоритм VeriSeq NIPT Solution v2 использует сложную статистическую модель, которая объединяет несколько различных типов информации из набора фрагментов библиотеки, секвенированных парноконцевым методом. Эта модель используется для обнаружения областей генома, которые недостаточно или чрезмерно представлены в библиотеке каждого образца. Важно отметить, что эта модель учитывает, соответствует ли степень недостаточного или избыточного представления количественно анеуплоидному явлению в геноме плода на уровне фетальной фракции, рассчитанном для библиотеки.

Данные секвенирования методом парноконцевых прочтений выравниваются с эталонным геномом (HG19) для всех хромосом. Уникальные недуплицированные выровненные прочтения объединяются в группы по 100 кб. Соответствующее количество групп корректируется с учетом смещения GC и в соответствии с ранее установленным охватом генома на конкретном участке. С помощью таких нормализованных количеств групп статистические оценки получают для каждой аутосомы, сравнивая участки охвата, которые могут иметь анеуплоидию, с остальными аутосомами. Логарифм отношения правдоподобия (LLR) вычисляется для каждого образца с учетом этих оценок областей охвата и доли фетальной фракции. LLR – это вероятность того, что образец имеет анеуплоидию с учетом наблюдаемого охвата и доли фетальной фракции по сравнению с вероятностью того, что образец не имеет анеуплоидии с учетом того же наблюдаемого охвата. При вычислении этого соотношения также учитывается расчетная неопределенность доли фетальной фракции. Для дальнейших расчетов используется натуральный логарифм этого соотношения. Программное обеспечение для анализа оценивает LLR для каждой исследуемой хромосомы и каждого образца с целью определения анеуплоидии.

Во время создания партии необходимо определить тип образца (одноплодная или двухплодная беременность), тип скрининга (базовый или геномный) и отчет о половой хромосоме (Yes (Да), No (Нет) и SCA) для каждого образца. В совокупности эти варианты определяют информацию, представленную для каждого образца.

Для всех типов образцов тип скрининга определяет, какие аутосомные аномалии регистрируются. Для базового типа скрининга зарегистрированы только явления трисомии целой хромосомы с вовлечением хромосом 13, 18 и 21. Для геномного типа скрининга регистрируется полная или частичная делеция или дупликация любой аутосомной хромосомы. Длина наименьшей регистрируемой частичной делеции или дупликация хромосомы составляет 7 Mb.

Для одноплодных образцов можно отключить регистрацию половых хромосом. Вы также можете настроить сообщение об анеуплоидии половых хромосом с указанием или без указания пола эуплоидных образцов.

Для образцов двоен, если для сообщения о половой хромосоме выбрано Yes (Да), результат ограничивается сообщением о наличии или отсутствии Y-хромосомы в библиотеке. Для образцов двоен анеуплоидия половых хромосом не может быть зарегистрирована.

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq ^{illumina} NIPT Solution v2

ПРИМЕЧАНИЕ Если все образцы в партии имеют один и тот же зарегистрированный пол, уведомление об ошибке по электронной почте/веб-интерфейсу предупредит пользователя с предупреждением о смешивании/загрязнении образца. Партия будет признана недействительной, и отчет не будет создан. (Применимо для VeriSeq NIPT Solution v2 серверного программного обеспечения версии 2.2 и выше.)

Результат АНОМАЛИИ ОБНАРУЖЕНЫ указывает на положительный результат скрининга образца на одну или несколько аномалий, соответствующих выбранному типу экрана и параметру отчетности по половой хромосоме. При обнаружении аномалии в отчете приводится описание аномалии в цитогенетическом обозначении.

В Программное обеспечение VeriSeq NIPT Assay Software v2 используется статистика, полученная в ходе секвенирования, для оценки фетальной фракции (FFE) для каждого образца. FFE – это расчетный компонент cfDNA плода, который извлекается с помощью анализа и сообщается в виде округленного процента для каждого образца. Среднее стандартное отклонение этой оценки для всех образцов составляет 1,3 %. FFE не следует использовать отдельно для исключения образцов при регистрации результатов.

Для выполнения распознаваний с целью представления хромосомы Программное обеспечение VeriSeq NIPT Assay Software v2 использует индивидуальный тест достоверности анеуплоидии плода (iFACT) – динамический пороговый показатель, который указывает, создала ли система достаточный охват секвенирования, учитывая оценку фетальной фракции для каждого образца. Отрицательные распознавания регистрируются только в том случае, если образец соответствует пороговому значению iFACT. Если образец не достигает этого порогового значения, в оценке контроля качества отображается сообщение FAILED iFACT, и система не генерирует результат.

В дополнение к iFACT, в ходе анализа Программное обеспечение VeriSeq NIPT Assay Software v2 оценивает несколько других показателей контроля качества. Дополнительные показатели включают оценки однородности охвата референсных геномных областей и распределение длин фрагментов cfDNA. Оценка контроля качества отображает флаг контроля качества или непрохождение контроля качества для любых показателей, выходящих за пределы допустимого диапазона. В случае неудачного контроля качества система не генерирует результат для образца. Если образец не проходит контроль качества, образец можно обработать повторно при условии, что в пробирке для сбора крови находится достаточный объем плазмы.

VeriSeq NIPT Solution v2 создает данные для использования в окончательном отчете. Он не создает окончательный отчет для пациента. Клиенты несут ответственность за дизайн и содержание заключительного отчета, который должен быть доставлен врачу-терапевту. Illumina не несет ответственности за точность формулировок в заключительном отчете для клиентов.



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Проверьте расчетные значения фетальной фракции для всех образцов. Если расчетные значения фетальной фракции будут схожими для всех образцов в запуске, возможно, произошла амальгамация образцов, что повлияло на результаты. Обратитесь в службу технической поддержки Illumina для поиска и устранения неисправностей.

Рабочие характеристики

Следующие данные, описанные в разделах «Клиническая эффективность» и «Аналитическая эффективность», были получены с использованием протоколов и материалов, описанных в Инструкции по применению, начиная с плазмы. Все данные секвенирования для этого раздела были созданы в системе секвенирования NextSeq 500/550 или системе секвенирования NextSeq 550Dx Sequencing System со следующими конфигурациями:

	NextSeq 500/550	NextSeq 550Dx
Программное обеспечение на приборе	Управляющее программное обеспечение NextSeq 4.0	Программное обеспечение NextSeq 1.3
Версия набора реагентов	Набор реагентов NextSeq 500/550 High Output Reagent Kit v2.5 (75 cycles)	Набор реагентов NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 cycles)
Метод секвенирования	Запуск парноконцевого секвенирования 2×36 в режиме высокой производительности	Запуск парноконцевого секвенирования 2×36 в режиме высокой производительности

Клиническое исследование

Клиническая точность VeriSeq NIPT Solution v2 была продемонстрирована путем оценки образцов плазмы беременных женщин с одноплодной и двухплодной беременностью. Образцы были получены из деидентифицированных образцов плазмы, которые были ранее обработаны из образцов периферической цельной крови. Для включения в исследование рассматривалось более 45 000 образцов. Эти образцы прошли пренатальный скрининг на хромосомные анеуплоидии плода, а также частичные делеции и дупликации 7 Mb или более. Все образцы, полученные в ходе беременностей, на которые распространяется действие препарата, и подгруппа последовательных образцов, полученных в ходе беременностей, на которые распространяется действие препарата, соответствовали критериям для анализа, если были получены клинические исходы и были соблюдены критерии для выборки. В общей сложности в анализируемой выборке было 2335 образцов. Из этой выборки 2328 образцов были взяты при одноплодной беременности, а семь образцов были взяты при двухплодной беременности.

Из этих образцов 28 (1,2 %, 28/2335) образцов не прошли контроль качества при первом прохождении анализа во время анализа завершенных данных секвенирования:

- 27 отказов iFACT (один ХО, 26 отказов)
- Один сбой данных за пределами ожидаемого диапазона

Демографические данные и характеристики беременности

Возраст матери, гестационный возраст и триместр беременности обобщены в [Таблица: 7](#) для образцов геномного скрининга, включая известные образцы с мозаицизмом. Большинство (98 %) образцов для анализа представляют собой беременность в первом триместре.

Демографические данные оценивались между базовыми и геномными когортами и не показали статистических различий. Демографические данные и характеристики беременности были схожими независимо от того, были ли включены или исключены известные мозаицизмы.

Таблица: 7 Демографические данные и характеристики беременности

Сводная статистика	Геномный (включая известный мозаицизм)
Количество образцов	2307*
Возраст матери - лет	
Среднее значение	35,08
Стандартное отклонение	4,04
Медианное значение	34,95
25-й перцентиль, 75-й перцентиль	32,31, 37,79
Минимум, максимум	20,22, 53,02
Гестационный возраст на момент забора крови – недель	
Среднее значение	10,93
Стандартное отклонение	1,20
Медианное значение	10,57
25-й перцентиль, 75-й перцентиль	10,29, 11,14
Минимум, максимум	10,00, 27,86
Триместр беременности – n (%)	
< Первый (< 14 недель)	2252 (98 %)
Второй	54 (2 %)
Третий (≥ 27 недель)	1 (0 %)

* Представленные окончательные образцы содержали 7 образцов двоен.

Клинические рабочие характеристики

Результаты, указанные в VeriSeq NIPT Solution v2, сравнивали с результатами клинического референсного стандарта. Все исследуемые образцы имели клинические исходы референсного стандарта (клиническая истина), связанные со статусом хромосомной анеуплоидии плода, а также частичными делециями и дупликациями 7 Мб или более. Результат клинического референсного стандарта для образцов, включенных в это исследование, зависел от результатов хромосомного анализа или физикального обследования новорожденного с отрицательным результатом NIPT на основе СНП. Обученный персонал исследовательского центра проводил классификацию данных клинических референсных стандартов в соответствии с документом спонсора по медицинскому кодированию.

Методы хромосомного анализа включали кариотипирование, флуоресцентную гибридизацию in situ (FISH) или сравнительную микроматричную геномную гибридизацию хромосом (СМА). Хромосомный анализ проводили на образцах периферической крови или слюны новорожденных или младенцев, образцах продуктов зачатия (ПК), амниоцитах, ворсинах хориона, плацентарных тканях или постнатальной пуповинной крови.

Мозаицизм определяется как наличие двух или более клеточных линий различного хромосомного состава у индивидуума. Клеточные линии происходят из одной и той же зиготы. Тип и уровень мозаицизма варьируются и зависят от времени мозаичных явлений во время эмбриогенеза и развития плода. Различные типы мозаицизма появляются в пренатальных диагнозах в зависимости от распределения аномальных и нормальных клеточных линий по цитотрофобластам, мезенхим, или плода.¹⁰ Хотя мозаицизм можно наблюдать при любой хромосомной аномалии, распространенность мозаицизма при редких трисомиях выше, чем при трисомиях хромосом 21, 18, и 13 (Т21, Т18, и Т13).¹¹ При оценке рабочих характеристик случаи мозаицизма были включены в геномный анализ, в качестве цели этого типа скрининга для этого анализа является выявление редких аутосомных анеуплоидий (РАА).

Рабочие характеристики базового скрининга

Для базового скрининга аномалии включают Т21, Т18 и Т13. В анализ было включено в общей сложности 2243 образца одноплодной и двуплодной беременности. Все семь случаев двуплодной беременности были правильно обнаружены как Т21 и не указаны в следующей таблице.

Таблица: 8 Чувствительность и специфичность VeriSeq NIPT Solution v2 для обнаружения трисомий 21, 18 и 13 при базовом скрининге для одноплодной беременности (за исключением известного мозаицизма)

	T21	T18	T13
Чувствительность	> 99,9 % (130/130)	> 99,9 % (41/41)	> 99,9 % (26/26)
2-сторонний 95%-й ДИ	97,1 %, 100 %	91,4 %, 100 %	87,1 %, 100 %
Специфичность	99,90 % (1982/1984)	99,90 % (1995/1997)	99,90 % (2000/2002)
2-сторонний 95%-й ДИ	99,63 %, 99,97 %	99,64 %, 99,97 %	99,64 %, 99,97 %

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq ^{illumina} NIPT Solution v2

Рабочие характеристики базового скрининга, как показано на [Таблица: 8](#), рассчитывается без учета подгруппы из 64 образцов, затронутых РАА, аутосомными частичными делециями или дупликациями, или известным мозаицизмом. Эти 64 образца включали восемь вариантов мозаицизма Т21 и три мозаицизма Т18. Пять из этих 11 образцов были идентифицированы как затронутые аномалией, обнаруженной Программное обеспечение VeriSeq NIPT Assay Software v2.

Рабочие характеристики геномного скрининга

Для геномного скрининга любая аномалия включает трисомии, моносомии и частичные делеции или дупликации размером 7 Mb или больше. Образцы для геномного скрининга содержали 36 образцов с известным мозаицизмом. Всего было протестировано 2307 образцов одноплodной и двуплодной беременности. Все семь образцов двуплодной беременности были правильно обнаружены как имеющие аномалии хромосомы 21 и не указаны в следующих таблицах.

Рабочие характеристики геномного скрининга для любых аномалий

Таблица: 9 Чувствительность и специфичность VeriSeq NIPT Solution v2 для обнаружения любых аномалий при геномном скрининге (включая известный мозаицизм)

	Чувствительность	Специфичность
Расчетный % (n/N)	95,5 % (318/333)	99,34 % (1954-1967 гг.)
2-сторонний 95%-й ДИ	92,7 %, 97,3 %	98,87 %, 99,61 %

Рабочие характеристики геномного скрининга для редкой аутосомной анеуплоидии

Таблица: 10 Чувствительность и специфичность VeriSeq NIPT Solution v2 для редкой аутосомной анеуплоидии (РАА) при геномном скрининге (включая известный мозаицизм)

	Чувствительность	Специфичность
Расчетный % (n/N)	96,4 % (27/28)	99,80 % (2001/2005 гг.)
2-сторонний 95%-й ДИ	82,3 %, 99,4 %	99,49 %, 99,92 %

Рабочие характеристики геномного скрининга для частичной делеции и дупликации

Таблица: 11 Чувствительность и специфичность VeriSeq NIPT Solution v2 для частичных делеций и дупликаций 7 Mb или более при геномном скрининге (с известным мозаицизмом)

	Чувствительность	Специфичность
Расчетный % (n/N)	74,1 % (20/27)	99,80 % (2000/2004)
2-сторонний 95%-й ДИ	55,3 %, 86,8 %	99,49 %, 99,92 %

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq NIPT Solution v2

Различия по рабочим характеристикам между базовым и геномным скринингом

Методология оценки распространенных трисомий и анеуплоидий половых хромосом одинакова как для базового, так и для геномного скрининга. При базовом скрининге алгоритм применяется только к Т21, Т18 и Т13. Тем не менее, геномный скрининг расширяет эту методологию для оценки всех трисомий и PAA, а также частичных дупликаций и делеций.

Существует два различия отчетов о рабочих характеристиках между базовым и геномным скринингом. Во-первых, для геномного скрининга были включены образцы с известным мозаицизмом как для распространенных трисомий, так и для PAA, а также частичных делеций и дупликаций для показателей рабочих характеристик. Во-вторых, геномный скрининг может предпочтительно сообщать об обнаружении частичной дупликации или делеции по полной трисомии. Наличие полной трисомии в дополнение к частичной дупликации или делеции можно увидеть, ссылаясь на балл LLR, представленный в дополнительном отчете.

Включение мозаицизма в геномный скрининг

Мозаицизм указан как ограничение этого анализа. При наличии мозаицизма фетальный сигнал аномалии уменьшается и, следовательно, может быть более сложным для обнаружения без ущерба для общей специфичности анализа. Однако, поскольку мозаицизм более важен для расширенного содержания, образцы с мозаицизмом были включены в геномный скрининг.

Из 64 образцов, включенных в геномный скрининг, но не в базовый скрининг, 36 образцов были идентифицированы как имеющие мозаицизм по клиническому референсному стандарту. Из этих 36 образцов 23 распознавания соответствовали клиническому референсному стандарту.

Частичная делеция или дупликация по сравнению с обнаружением анеуплоидии всей хромосомы

Параметры меню VeriSeq NIPT Solution v2 для базового и геномного скрининга. При базовом скрининге результат ANOMALY DETECTED (ОБНАРУЖЕНА АНОМАЛИЯ) регистрируется только в том случае, если полная анеуплоидия обнаружена на хромосомах 21, 18 или 13 и если все показатели контроля качества соблюдены. При геномном скрининге система обнаруживает анеуплоидию во всех аутосомах и явления частичной делеции и дупликации не менее 7 Mb.

При использовании геномного скрининга в случаях, когда как событие всей хромосомы, так и событие CNV в одной хромосоме превышает порог LLR, система предоставляет приоритет отчетности о событии частичной делеции или дупликации в течение всего распознавания хромосомы, если размер частичной делеции или дупликации охватывает приблизительно 75 % или менее хромосомы, на которой обнаружено событие. Если обнаруженная область частичной делеции и дупликации превышает 75 % размера хромосомы, явление регистрируется как полная трисомия или моносомия всей хромосомы, если одновременно превышен порог LLR для всей хромосомы. В связи с этим, существенно большие делеции и дупликации, которые меньше или равны 75 % размера хромосомы, могут указывать на анеуплоидию всей хромосомы.

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq NIPT Solution v2

Во всех образцах показатель LLR для всей классификации хромосом доступен в дополнительном отчете. Перед интерпретацией результата следует проанализировать показатель LLR в отношении указанного порогового значения в *95 % вероятности обнаружения для средних регионов по размеру для VeriSeq NIPT Solution v2 на странице 66*. Например, распознавание CNV, при котором баллы LLR на уровне хромосом, превышающие пороговое значение, обеспечивают дополнительную поддержку интерпретации, соответствующей анеуплоидии всей хромосомы, см. [Таблица: 12](#) в качестве примера.

В клиническом исследовании было два одноплодных образца беременности с существенно большими дупликациями (один на хромосоме 21 и один на хромосоме 18), которые составляли менее 75 % относительного размера хромосомы (см. [Таблица: 12](#)). Оба явления были зарегистрированы как частичные дупликации, а не как полная трисомия для этой хромосомы. Баллы LLR для этих явлений были выше порогового значения, что согласуется с затронутым исходом для полной трисомии. Для частичной дупликации или полной трисомии контрольное лечение положительного результата NIPT предполагает проведение подтверждающего анализа посредством пренатальной диагностики.

Таблица: 12 Примеры крупных событий дупликации, выявленных геномном скрининге

	Клиническая правда	Выходные данные геномного скрининга	Размер аномалии (Mb)	% хромосомы	Баллы LLR
Образец 1	Трисомия 21, одноплодная	Частичная дупликация 21	22,50	48,9	19,43
Образец 2	Трисомия 18, одноплодная	Частичная дупликация 18	47,00	60,2	12,99

Для получения дополнительной информации о показателях контроля качества, используемых для сообщения результатов анеуплоидии, см. *VeriSeq NIPT Solution v2 Software Guide (Руководство по программному обеспечению VeriSeq NIPT Solution v2) (документ № 1000000067940)*.

Половые хромосомы

Результаты VeriSeq NIPT Solution v2 по половым хромосомам сравнивали с результатами клинического стандартного образца и обобщали в следующей таблице. Процент совпадения рассчитывали для каждой половой хромосомы в пределах каждого результата клинического референсного стандарта. Процент совпадения рассчитывали как количество образцов, в которых распознавание VeriSeq NIPT Solution v2 половых хромосом соответствовало классификации клинического референсного стандарта, разделенное на общее количество образцов с такой же классификацией клинического референсного стандарта.

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq NIPT Solution v2 illumina®

Таблица: 13 Процент соответствия для классификации полов плодов*

Классификация полов плодов		Фенотип по результатам физикального обследования новорожденного		Цитогенетические результаты								
				Женский	Мужской	XX	XY	XO	XX X	XX Y	XY Y	Другое**
Аномалии не обнаружены	XX	997	0	21	0	2	0	0	0	0	0	0
Аномалии не обнаружены	XY	0	966	0	15	0	0	0	0	0	0	1
Аномалия обнаружена	XO	0	0	0	0	19	0	0	1	0	0	0
Аномалия обнаружена	XXX	0	0	0	0	0	17	0	0	1	0	0
Аномалия обнаружена	XXY	0	0	0	0	0	0	23	0	1	0	0
Аномалия обнаружена	XYY	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0
Итого		997	966	21	15	21	17	23	12	2	1	
Процент соответствия		100	100	100	100	90,5	100	100	91,7	Неприменимо	Неприменимо	

* Пять образцов двуплодной беременности были правильно классифицированы как имеющие Y хромосому. Два образца были правильно классифицированы как не имеющие Y хромосому.

** Другие результаты цитогенетического анализа были следующими: XXXXX и XXYY.

Положительная прогностическая ценность и отрицательная прогностическая ценность VeriSeq NIPT Solution v2

Положительная прогностическая ценность (PPV) и отрицательная прогностическая ценность (NPV) теста предоставляют информацию о способности теста предоставлять клинические решения на основании чувствительности теста, специфичности и предтестовой вероятности того, что плод затронут трисомией (распространенность). Поскольку PPV и NPV зависят от распространенности, а распространенность этих анеуплоидий может варьироваться в разных популяциях пациентов, PPV и NPV были рассчитаны для

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq NIPT Solution v2

диапазона правдоподобных значений распространенности на основании значений чувствительности и специфичности, наблюдаемых в базовом скрининге (без известного мозаицизма) в исследовании клинической точности. Таблица: 17 основан на геномном скрининге (с известным мозаицизмом).

Таблица: 14 Распространенность трисомии 21, PPV и NPV на базовом скрининге (за исключением известного мозаицизма)

Распространенность (%)	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

Таблица: 15 Распространенность трисомии 18, PPV и NPV на базовом скрининге (за исключением известного мозаицизма)

Распространенность (%)	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

Таблица: 16 Распространенность трисомии 13, PPV и NPV на базовом скрининге (за исключением известного мозаицизма)

Распространенность (%)	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

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq ^{illumina} NIPT Solution v2

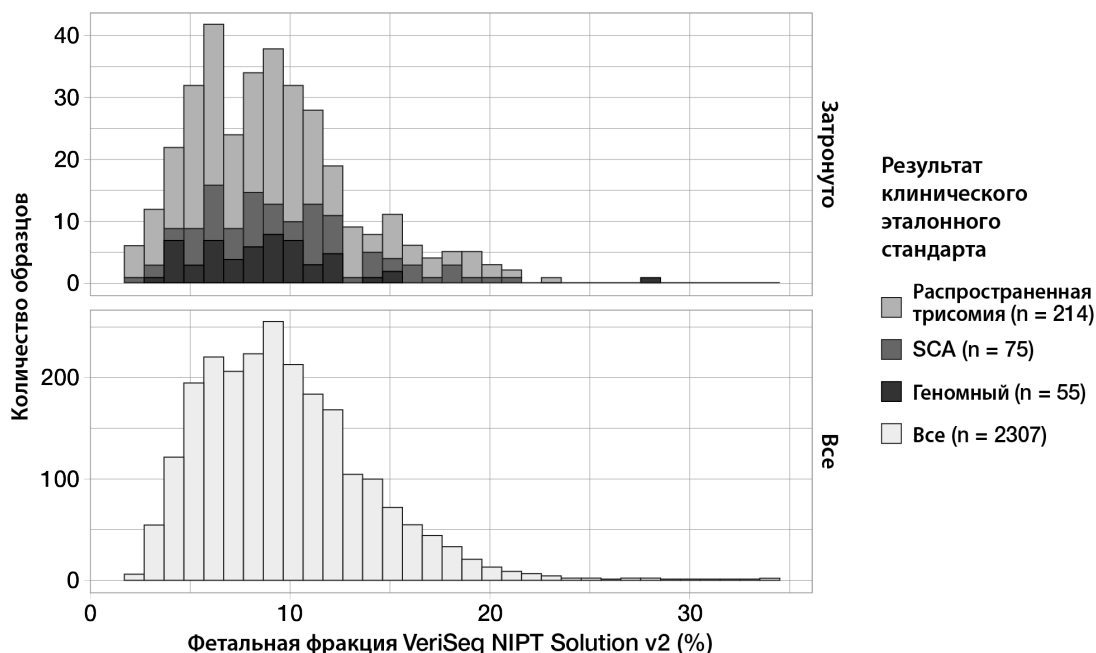
Таблица: 17 Распространенность любых аномалий, PPV и NPV по результатам геномного скрининга (включая известный мозаицизм)

Распространенность (%)	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

Распределение фетальной фракции

Расчетные значения распределения фетальной фракции (ФФ) VeriSeq NIPT Solution v2 по результатам геномного скрининга с мозаицизмом представлены по категориям результатов клинических референсных стандартов в [Рисунок 1](#).

Рисунок 1 Распределение фетальной фракции



У 5 образцов были аномалии в различных категориях.

Распространенная трисомия включает образцы с трисомией 21, 18 и/или 13.

Общий анализ генома включает образцы с RAA или частичными делециями и/или дупликациями.

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq NIPT Solution v2

Расчетные значения ФФ находились в диапазоне от 2 % до 34 % в целом с медианой 9 % и межквартильным (IQ) диапазоном от 6 % до 12 %. Медиана ФФ для распространенных трисомий и явлений, обнаруженных при геномном скрининге, составляет 8 %, а для SCA – 9 %. Диапазон оценок ФФ был сопоставимым для всех исходов. Не наблюдается явного сдвига в распределении ФФ среди распространенных трисомий, SCA, явлений, обнаруженных при геномном скрининге, или во всех образцах в геномном анализе.

Рабочие характеристики при двуплодной беременности

Рабочие характеристики в отношении оценки трисомии 13, 18 и 21 и хромосомы Y при двуплодной беременности

В связи с низкой распространенностью трисомии 21, 18 и 13 при двуплодной беременности в клиническом исследовании было доступно лишь небольшое количество таких образцов. Для оценки рабочих характеристик VeriSeq NIPT Solution v2 при двуплодной беременности использовались модели *in silico* на основе наблюдений из клинических образцов для моделирования популяций при двуплодной беременности. Это моделирование соответствовало предполагаемой популяции применения. Распределение фетальной фракции определялось приблизительно из 4500 образцов двуплодной беременности, и сравнивалось с распределением приблизительно из 120 000 образцов одноплодной беременности. Распределение фетальной фракции, обусловленное статусом анеуплоидии, определяли по предполагаемым одноплодным распознаваниям (1044 трисомия 21, 307 трисомия 18 и 192 трисомия 13). Объединение этих двух распределений позволило сделать выводы о выявлении анеуплоидии у двойни. Смоделировали наборы дизиготных и монозиготных близнецовых пар, и для оценки чувствительности использовали средневзвешенное значение, представляющее их распространенность в популяции предполагаемого применения (2 дизиготных: 1 монозиготный). Для специфичности моделировались наборы близнецовых пар без нарушений.

Фракция каждого смоделированного образца, затронутого трисомией (т. е. фракция с аномалией), рассчитывалась по-разному для каждой категории образцов:

- Для монозиготных близнецов доля клеток с аномалией в каждом образце была установлена равной 1,0, поскольку в этом случае трисомия затрагивает обоих близнецов.
- Для дизиготных близнецов предполагалось, что аномалия только у одного близнеца близнец (аномалия у обоих близнецов является крайне редким явлением). Значения доли клеток с аномалией моделировались с использованием известного распределения соотношений фракций плодов, определенного по клиническим образцам разнополых двоен. Был принят консервативный подход, при котором предполагалось, что у плода с аномалией из двойни всегда самая низкая фетальная фракция среди двух плодов. Поправочный коэффициент применялся для фетальных фракций, которые были в среднем ниже при трисомии 13 и 18 беременностей.
- Для плодов с аномалией из двойни доля материала с аномалией в каждом образце принималась равной нулю

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq ^{illumina} NIPT Solution v2

Для двойни, в которой один из плодов имеет трисомию 18 или 13, фетальная фракция, соответствующая доле аномального компонента образца, снижалась. Снижение было пропорционально среднему снижению фракции плода, наблюдаемому в клинических данных при трисомии 18 или 13 при одноплодной беременности по сравнению с эуплоидной одноплодной беременностью.

Затем для расчета анеуплоидии с использованием стандартного алгоритма VeriSeq NIPT Solution v2 использовали как общую фракцию плода, так и фракцию с аномалией каждого моделируемого образца. Чувствительность рассчитывали как частоту, с которой значения показателя анеуплоидии для смоделированных плодов с аномалией из двойни превышали соответствующий пороговое значение анеуплоидии. Соответственно, специфичность рассчитывали как частоту, с которой значения показателя анеуплоидии для смоделированных плодов без аномалий из двойни были ниже соответствующего порогового значения анеуплоидии (Таблица: 18). 95 % доверительные интервалы рассчитывались на основании количества реальных клинических образцов близнецов в исходном наборе данных, которые были классифицированы как имеющие или не имеющие соответствующую трисомию.

Для оценки чувствительности в отношении хромосомы Y в образцах двуплодной беременности моделировались наборы близнецов XY/XY и XX/XY. Было взято средневзвешенное значение, представляющее их распространенность в популяции предполагаемого применения (1 XY/XY: 1 XX/XY). Для оценки специфичности в отношении хромосомы Y у двуплодной беременности имитировали набор из XX/XX двоен. Общие значения фетальной фракции были смоделированы в соответствии с известным распределением фетальной фракции в клинических образцах двоен.

Для близнецов XY/XY и XX/XY соответствующие показатели по хромосоме Y оценивались с использованием известной зависимости между фракцией плода и показателями хромосомы Y в клинических образцах одноплодных беременностей, классифицированных как мужские. Только для близнецов XX/XY значения фракции плода с аномалией (т. е. мужского) моделировались с использованием известного распределения соотношений фракций плода между близнецами из одной беременности, определенного по клиническим образцам разнополых двоен. Был принят консервативный подход, при котором фракция с аномалией была выбрана таким образом, чтобы она соответствовала меньшему из двух близнецов. Для каждого смоделированного образца XX/XY балл по хромосоме Y умножали на пораженную фракцию.

Для двуплодной беременности XX/XX были взяты оценки хромосомы Y из оценок, наблюдаемых в клинических одноплодных образцах, классифицированных как женские. Затем оценку хромосомы Y и общую фракцию плода использовали для классификации каждого смоделированного образца как присутствующей или отсутствующей хромосомы Y с использованием стандартного алгоритма VeriSeq NIPT Solution v2.

Чувствительность рассчитывалась путем определения того, как часто смоделированные близнецы XY/XY или XX/XY были правильно классифицированы как имеющие хромосому Y. Специфичность рассчитывали как частоту правильной классификации смоделированных двоен XX/XX как не имеющих хромосомы Y. 95%-е доверительные интервалы определяли на основании числа реальных клинических образцов двоен в исходном наборе данных, классифицированных как с присутствующей хромосомой Y или без нее.

Таблица: 18 Оценки трисомии 21, 18 и 13 в смоделированной популяции случаев двуплодной беременности

	Трисомия 21	Трисомия 18	Трисомия 13	Наличие Y
Чувствительность	96,4 %	95,7 %	93,6 %	> 99,9 %

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq ^{illumina} NIPT Solution v2

	Трисомия 21	Трисомия 18	Трисомия 13	Наличие Y
2-сторонний 95%-й ДИ	(86,4 %, 98,9 %)	(68,3 %, 99,4 %)	(64,1 %, 98,9 %)	(99,9 %, > 99,9 %)
Специфичность	99,9 %	> 99,9 %	> 99,9 %	> 99,9 %
2-сторонний 95%-й ДИ	(99,8 %, > 99,9 %)	(99,9 %, > 99,9 %)	(99,9 %, > 99,9 %)	(99,7 %, > 99,9 %)

В [Таблица: 18](#) представлены точечные оценки и расчетные 95%-е доверительные интервалы для чувствительности и специфичности VeriSeq NIPT Solution v2 в отношении обнаружения трисомии 21, 18, 13 и наличия Y в смоделированной популяции двуплодной беременности, что согласуется с популяцией предполагаемого использования. Доверительные интервалы рассчитывали на основании количества образцов двоен, прошедших контроль качества и классифицированных как имеющие или не имеющие соответствующую трисомию. При расчете чувствительности предполагается, что две трети двуплодных беременностей являются dizиготными, а одна треть беременностей близнецов – монозиготными, причем оба близнеца имеют аномалию.

Оценки, перечисленные в [Таблица: 18](#), относятся только к двуплодным беременностям. Из-за еще более низкой распространенности данных о беременностях более высокого порядка (трехплодные или более) было недостаточно для установления соответствующих статистических моделей для оценки точности выявления анеуплоидии.

Аналитические рабочие характеристики

Прецизионность

Для оценки и количественной оценки прецизионности анализа был проведен повторный анализ данных с использованием программного обеспечения конвейера VeriSeq NIPT Solution v2 анализа из двух предыдущих исследований раствора VeriSeq NIPT Solution:

- Многоцентровое исследование воспроизводимости, которое включало три запуска, выполненных тремя операторами в трех центрах с использованием одной партии реагента, в общей сложности девять запусков.
- Внутрилабораторное исследование прецизионности, включавшее 12 запусков в одном центре с использованием двух ML STAR, двух систем секвенирования и трех партий реагентов для секвенирования.

Целью исследования прецизионности было количественное определение прецизионности анализа в отношении трисомии 21 (T21) и хромосомы Y и оценка вариабельности между различными приборами, наборами для приготовления библиотек и партиями реагентов для секвенирования. Воспроизводимость для условий, не описанных выше, не оценивалась в рамках исследований.

Пул фетальной фракции T21 5 % был создан путем объединения cfDNA, извлеченной из плазмы матери у беременных женщин (плодом с T21), и cfDNA, извлеченной из плазмы у небеременных женщин. Также был создан пул cfDNA женщин, беременных мужским плодом (XY плод) с фетальной фракцией 10 %. Панель образцов для каждого исследования в каждом запуске включала 4 повторности пула образцов с фетальной

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq NIPT Solution v2

фракцией 5% (с T21) и 20 повторов пула cfDNA женщин, беременных мужским плодом (XY плод) с фетальной фракцией 10%. Испытания проводились в течение 10 дней, в общей сложности 21 запуск для двух объединенных исследований.

T21 и наличие хромосомы Y были выбраны для оценки на основании репрезентативности клинических состояний и сложности обнаружения аномалий. Как наименьшая аутосома человека, размер хромосомы 21 оказывает прямое влияние на чувствительность обнаружения T21, особенно при низких значениях фетальной фракции, таких как используемые в этом исследовании. Хромосома Y, присутствующая в плазме матери, имеет исключительно эмбриональное происхождение и, следовательно, легче обнаруживается в анализе.

Наблюдаемые средние значения и стандартные отклонения для оценки LLR хромосомы 21 и нормализованных хромосомных значений (NCV) хромосомы Y показали, что стандартное отклонение (CO) повторности было самым большим источником вариабельности. Разница между центрами, приборами и партиями реагентов привела к незначительной вариабельности, о чем свидетельствует разница между общим CO и CO повторности в [Таблица: 19](#) и [Таблица: 20](#).

Таблица: 19 Обзор стандартного отклонения (CO) отклика при секвенировании в нескольких лабораториях (воспроизводимость)

Отклик	N	Среднее значение	CO повторности	Общая воспроизводимость, CO*
Оценка LLR хромосомы 21	36	34,43	11,36	11,36
NCV хромосомы Y	180	190,56	7,96	10,20

* Общее значение включает вариабельность по центру, оператору, запуску, дню и повторности.

Таблица: 20 Сводные данные по прецизионности отклика при секвенировании в пределах лаборатории

Отклик	N	Среднее значение	CO повторности	Общая CO в пределах лаборатории*
Оценка LLR хромосомы 21	48	36,01	9,07	10,25
NCV хромосомы Y	240	198,68	7,63	7,82

* Общее значение включает вариабельность по прибору для секвенирования, партии реагента, оператору, запуску, дню и повторности.

Было проведено дополнительное исследование для сравнения прецизионности секвенирования VeriSeq NIPT Solution v2 (общее стандартное отклонение) с использованием версии 2.0 проточной ячейки и версии 2.5. Исследование включало два типа проточных ячеек (вер. 2.0 и вер. 2.5), три партии наборов для секвенирования, четыре системы приборов и два запуска секвенирования на комбинацию, всего 48 запусков в одном центре. Один пул секвенирования готовили из планшетов cfDNA, которые готовили вручную. Панель образцов включала 4 повторности пула образцов, с 5% фетальной фракцией T21, и 20 повторностей пула cfDNA женщин, беременных мужским плодом (XY плод) с фетальной фракцией 10%. Результаты

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq NIPT Solution v2

исследования представлены в [Таблица: 21](#) и подтверждают отсутствие различий в прецизионности секвенирования при использовании проточной ячейки версии 2.0 по сравнению с проточной ячейкой версии 2.5.

Таблица: 21 Сводные данные по прецизионности отклика секвенирования проточной ячейки ред. 2.0 по сравнению с проточной ячейкой ред. 2.5

Отклик	Количество наблюдений на версию	v2.0 Общее CO*	v2.5 Общее CO*	Статистический результат**
Оценка LLR хромосомы 21	96	9,56	8,44	Статистически эквивалентная (р-значение = 0,25)
NCV хромосомы Y	480	7,74	7,38	Статистически эквивалентная (р-значение = 0,38)

* Общее значение включает вариабельность из-за прибора для секвенирования, партии реагента, запуска, дня, повторности

**На основании F-критерия для равенства дисперсий (квадратичные стандартные отклонения)

Перекрестное загрязнение

Перекрестное загрязнение оценивалась в процессе приготовления образца раствора VeriSeq NIPT Solution. Пулы плазмы небеременных женщин (XX) и взрослых мужчин (XY) были протестированы в шахматном порядке в формате 96-луночных планшетов на 4 планшетах. N = 48 образцов для женщин и мужчин на чашку, в общей сложности 192 образца для женщин и 192 образца для мужчин. Ни один из образцов женщин не продемонстрировал охват хромосомы Y, который был статистически выше, чем расчетный фон, что указывает на отсутствие перекрестного загрязнения из образцов мужчин в пределах одного планшета. В растворе VeriSeq NIPT Solution не наблюдалось поддающегося обнаружению перекрестного загрязнения.

Потенциально мешающие вещества

Влияние потенциально мешающих веществ оценивали в растворе VeriSeq NIPT путем оценки эффективности анализа в присутствии таких веществ.

Альбумин, билирубин, гемоглобин и триглицериды (эндогенные) были добавлены в пулы плазмы матери, полученные во время беременностей у женщин (плод XX). Их испытывали в двух концентрациях для каждого исследуемого вещества (n = 16 для каждого). Не наблюдалось влияния на эффективность анализа.

Таблица: 22 Потенциально мешающие вещества (эндогенные)

Испытуемое вещество	Низкая концентрация исследуемого препарата (мг/мл)	Высокая испытуемая концентрация (мг/мл)
Альбумин	35	50
Билирубин	0,01	0,15

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq ^{illumina} NIPT Solution v2

Испытуемое вещество	Низкая концентрация исследуемого препарата (мг/мл)	Высокая испытуемая концентрация (мг/мл)
Гемоглобин	100	200
Триглицериды	1,5	5

Природная геномная ДНК матери (гДНК) в плазме также может потенциально влиять на эффективность анализа, поскольку она может быть извлечена вместе с фетальной cfDNA. Уровни геномной ДНК при 1,6, 3,3 и 4,9 нг на образец (соответствует 1, 2 и 3 стандартным отклонениям от средней ожидаемой концентрации гДНК через 7 дней хранения цельной крови¹²) добавляли к cfDNA, выделенной из плазмы материнского организма из незатронутой беременности у женщин (плод XX). Затем образцы тестировали в растворе VeriSeq NIPT (n = 16 для каждой концентрации). В присутствии повышенных уровней гДНК не наблюдалось никакого влияния на эффективность анализа.

Двадцать лекарственных веществ, потенциально способных препятствовать проведению анализа (экзогенных), обычно используемых или назначаемых во время беременности, были протестированы в соответствии с EP7-A2 (Анализ на интерференцию в клинической химии; утвержденное руководство, второе издание). 20 потенциальных мешающих веществ были объединены в четыре пула, добавлены в плазму материнского организма из незатронутых беременностей женского пола (XX плодов) и протестированы в растворе VeriSeq NIPT (N = 16 для каждого пула). В присутствии этих экзогенных веществ не наблюдалось влияния на эффективность анализа.

Таблица: 23 Потенциально мешающие вещества (экзогенные)

Пул 1	Пул 2	Пул 3	Пул 4
Ацетаминофен	Дифенгидрамин	Альбутерол	Цетиризин
Ацетилцистеин	Эритромицин	Бупропион	Декстрометорфан
Бисопролол	Гвайфенезин	Кофеин	L-аскорбиновая кислота
Циталопрам	Гепарин	Сертралин	Метопролол
Дезлоратадин	Лидокаин	Фторид натрия	Надолол

Предел обнаружения

Предел обнаружения (Limit of Detection, LOD) определяется как уровень фетальной фракции, который соответствует 95 % вероятности обнаружения представляющего интерес состояния, такого как T21. Для оценки LOD VeriSeq NIPT Solution v2 для различных распространенных состояний были проведены исследования и статистические анализы.

Вероятность обнаружения состояния, представляющего интерес, в образце с аномалией, обработанном в VeriSeq NIPT Solution v2 главным образом, зависит от трех факторов:

- Фетальная фракция
- Глубина секвенирования
- Размер и сложность представляющего интерес геномного участка

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq ^{illumina} NIPT Solution v2

Предполагая постоянную глубину секвенирования, заданную aberrацию легче обнаружить в образце с более высоким процентом фетальной фракции, чем в образце с более низким процентом фетальной фракции. И наоборот, при условии постоянной фетальной фракции заданную aberrацию легче обнаружить в образце с более высокой глубиной секвенирования, чем в образце с более низкой глубиной секвенирования. Наконец, aberrации в меньших или более сложных геномных областях сложнее обнаружить, чем aberrации в более крупных или менее сложных геномных областях, при условии постоянной фетальной фракции и глубины секвенирования.

Для определения LOD для обнаружения T21 анализировали образцы, содержащие смеси объединенных образцов T21 и объединенных не затронутых образцов. Два типа анализатора смешивали в серии титрования для создания набора из семи уровней фетальной фракции (0, 2, 3, 4, 5, 6 и 10 %). Каждый уровень был представлен в общей сложности 10 повторностями.

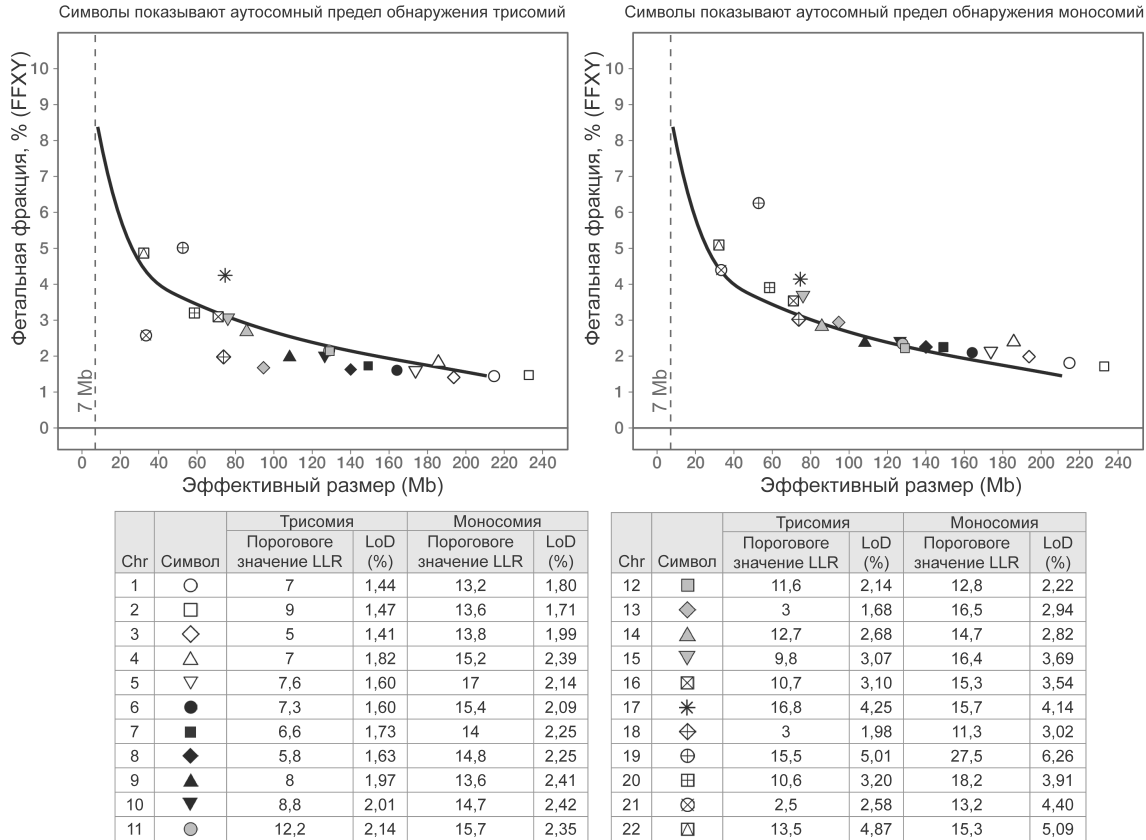
Для дальнейшего увеличения разрешения сетки фетальной фракции для анализа LOD данные этого исследования были дополнены данными, полученными при разведении *in silico*. Эффекты экспериментального разведения и титрования моделировали путем контролируемого смешивания данных секвенирования. Данные этого титрования *in silico* охватывали набор из 14 уровней фетальной фракции (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 и 4,50 %) с 32 повторностями для каждого уровня. Для определения LOD для T21 был применен пробит-анализ полученных данных.

Независимо была разработана статистическая модель с использованием фетальной фракции, глубины секвенирования и геномного размера/сложности для прогнозирования вероятности обнаружения любой aberrации в любом образце. Эта модель была установлена на основании данных, соответствующих набору из 1405 образцов XY. Было установлено, что LOD для T21, прогнозируемый с помощью этой модели, согласуется с вышеописанной оценкой на основе пробитов. Эта статистическая модель использовалась для оценки значений LOD для анеуплоидий на всех аутосомах и для частичных делеций и дупликаций.

На [Рисунок 2](#) показана 95 % вероятность обнаружения для средних регионов по размеру и аутосомные пределы обнаружения для всех трисомий и всех моносомий. Пороговое значение LLR CNV 15.1.

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq NIPT Solution v2 illumina®

Рисунок 2 95 % вероятности обнаружения для средних регионов по размеру для VeriSeq NIPT Solution v2



Поиск и устранение неисправностей

Поиск и устранение неисправностей VeriSeq NIPT Solution v2

Режим отказа	Возможный результат	Интерпретация	Рекомендованное действие	Комментарии
Недостаточно входной плазмы	Образец Сбой контроля качества	Недостаточный объем плазмы.	Повторно наберите образец.	На основании визуального контроля объема плазмы.
Несостоятельность пробирки с кровью	Кровь не разделена на слои	Образец не центрифугирован.	Убедитесь, что центрифуга запущена и пробирка центрифугирована с правильной силой. Повторно наберите образец.	
		Неправильное хранение или транспортировка образца (гемолиз образца).	Повторно наберите образец.	Замороженные образцы не разделены. Неправильные условия транспортировки или хранения могут привести к гемолизу образцов.

Режим отказа	Возможный результат	Интерпретация	Рекомендованное действие	Комментарии
Закупорка или замедленный поток образца	Загрязнение плазмы	Отдельные образцы могут закупорить связывающий планшет, если в образце плазмы наблюдается значительное загрязнение.	Осмотрите образец. Если оставшаяся в пробирке плазма красного или молочного цвета, отмените образец и запросите повторное взятие. Если образец выглядит нормальным, повторите анализ образца.	
	Переполнение образца	Неадекватный визуальный осмотр каждой пробирки на предмет пригодности образца.	Делает недействительным все образцы в близлежащих лунках, затронутых переполнением.	Может указывать на неправильную транспортировку или хранение образцов перед обработкой. Исключить неподходящие образцы из обработки.
	Неисправность оборудования	Неадекватное расщепление материала во время экстракции.	Выполните повторный анализ образца. Если проблема сохраняется в месте расположения лунки с другими образцами, обратитесь в службу технической поддержки Illumina.	

Режим отказа	Возможный результат	Интерпретация	Рекомендованное действие	Комментарии
Сбой контроля качества анализа отдельного образца	Сбой контроля качества секвенирования	Возможные причины: <ul style="list-style-type: none"> • Недостаточный генетический вклад • Неправильный перенос во время работы с образцом • Сбой реагента секвенирования 	Проверьте аннотацию образца. Проверьте аналогичные рабочие характеристики предыдущих образцов в относительном положении планшета. Выполните повторный анализ образца.	Указывает либо на недостаточный вход образца, либо на неправильный перенос на ML STAR. Недостаточное количество генетического материала может быть обусловлено недостаточным количеством бесклеточной ДНК в плазме или клеточной ДНК, что приводит к чрезмерному разведению образца для секвенирования.
	Низкое количество FF или неисключенных участков (NES)	Недостаточно данных для точного отчета.	Выполните повторный анализ плазмы.	

Режим отказа	Возможный результат	Интерпретация	Рекомендованное действие	Комментарии
Сбой контроля качества количественного определения	Не удалось выполнить количественное определение. Медиана партии ниже минимального значения	Недостаточный выход процесса.	Повторите количественное определение. Если повторное определение не удалось, обратитесь в службу технической поддержки Illumina.	Показатели стандартной кривой, не соответствующие требованиям, либо указывают на проблемы с подготовкой библиотеки (т. е. использование этанола небιологической степени чистоты), либо на проблемы с процессом количественного определения.
	Не удалось выполнить количественное определение	Сбой стандартной кривой.	Повторите количественное определение. Если повторное определение не удалось, обратитесь в службу технической поддержки Illumina.	
Сбой объединения	Не удалось объединение образцов	Анализ пула не может рассчитать правильные объемы пула.	Выполните повторную оценку целевой концентрации пула. Повторите анализ объединения.	

Поиск и устранение неисправностей VeriSeq NIPT Microlab STAR

Этап процесса	Код ошибки	Диалог ошибки	Описание	Разрешение пользователя
Создание серии	EM0044	Введенный Batch ID (Идентификатор серии) содержит запрещенные символы.	Для всех полей данных VeriSeq NIPT Solution v2 принимает только цифры, буквы, подчеркивания и тире.	Переименуйте серию, используя имя, которое не содержит специальных символов.
Создание серии	EM0051	Batch ID (Идентификатор серии) содержит более 36 символов.	VeriSeq NIPT Solution v2 ограничивает длину названий партий до 36 символов или менее.	Переименуйте серию, используя имя длиной менее 36 символов.
Создание серии	EM0076	Невозможно подключиться к Серверу VeriSeq Onsite Server v2	Сервер VeriSeq Onsite Server v2 не отвечает на запросы данных от диспетчера рабочих процессов.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Убедитесь, что ML STAR подключен к сети. 2. Убедитесь, что Сервер VeriSeq Onsite Server v2 включен. 3. Убедитесь, что ML STAR может подключиться к Серверу VeriSeq Onsite Server v2 (по запросу ping). 4. Если предыдущие шаги не помогли решить проблему, обратитесь в службу технической поддержки Illumina.

Этап процесса	Код ошибки	Диалог ошибки	Описание	Разрешение пользователя
Создание серии	EM0118	Серия не прошла проверку и не может быть обработана в дальнейшем.	Указанная серия уже не прошла проверку и не может быть обработана далее.	Запись о серии в Сервер VeriSeq Onsite Server v2 указывает на сбой выбранной партии. Дальнейшая обработка запрещена. Создайте новую серию с необходимыми образцами.
Создание серии	Неприменимо	Обработка этой серии уже завершена. Вы хотите повторно объединиться?	Указанная серия была обработана путем объединения. Единственной допустимой обработкой является повторное объединение.	Выполните повторное объединение следующим образом. <ul style="list-style-type: none"> • Выберите Re-Pool (Повторное объединение). • Прервать метод и убедиться в правильности названия серии перед повторным объединением.
Выделение плазмы	WP0087	Загружены дублирующиеся штрих-коды образцов.	В систему загружены образцы с идентичными штрихкодами.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Следуйте подсказкам Workflow Manager, чтобы определить, какие пробы являются дубликатами. 2. Удалите дубликаты и перемаркируйте или замените их. 3. Перезагрузите образцы.

Этап процесса	Код ошибки	Диалог ошибки	Описание	Разрешение пользователя
Выделение плазмы	EP0102	Образцы, указанные в протоколе анализа, не были загружены.	Образцы, включенные в протокол анализа, не были включены в загруженные штрихкоды.	<ol style="list-style-type: none">1. Следуйте подсказкам Workflow Manager, чтобы определить недостающие образцы.2. Выберите один из нижеследующих вариантов:<ul style="list-style-type: none">• Добавьте отсутствующие образцы в серию и повторно загрузите образцы.• Прервите метод, при необходимости измените протокола анализа. Перезапустите метод.
Загрузка планшета	Неприменимо	Ошибка маски штрихкода Venus	Workflow Manager обеспечивает правильную связь между планшетами и сериями с помощью масок штрихкодов Venus.	<ol style="list-style-type: none">1. Проверьте расположение планшета, чтобы убедиться в правильности расположения планшета.2. Убедитесь, что загруженный планшет является правильным планшетом для указанной серии.

Этап процесса	Код ошибки	Диалог ошибки	Описание	Разрешение пользователя
Экстракция cfDNA	WE0150	Слишком низкое давление в вакуумной камере.	Диспетчер рабочего процесса не работает, если датчик давления в вакуумной линии в состоянии покоя < 400 торр.	<ol style="list-style-type: none">1. Проверьте вакуумную линию на наличие перегибов или других препятствий.2. Откройте зажимы разжима линии отходов, дайте давлению сброситься, а затем полностью закройте зажимы разжима линии.3. Убедитесь, что вакуумный контроллер и насос включены.4. Проверьте бутылку для вакуумных отходов. Если бутылка для отходов заполнена более чем наполовину, опорожните ее.5. Если проблема не исчезла, свяжитесь со службой технической поддержки компании Illumina.
Экстракция cfDNA	WE0153	Слишком высокое давление в вакуумной камере.	Если измеренное давление вакуума слишком высокое до запуска регулятора давления, возможно, система неисправна.	На задней панели контроллера убедитесь, что все вакуумные соединения и линии надежно закреплены.

Этап процесса	Код ошибки	Диалог ошибки	Описание	Разрешение пользователя
Экстракция cfDNA	WE0996	Вакуум не герметизируется.	Прежде чем продолжить, необходимо устранить неисправность уплотнения.	<p>Прежде чем нажать ОК, убедитесь, что неисправность уплотнения устранена.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Убедитесь, что планшет для связывания находится заподлицо с вакуумным коллектором. Рукой в перчатке с усилием надавите на планшет для связывания. 2. Слушайте вакуумный увлажнитель и наблюдайте за потоком воды через связывающую пластину. 3. Откройте вид трассировки в диспетчере рабочих процессов. После того, как фактическое значение давления достигнет по меньшей мере на 50 единиц давления меньше значения, полученного при температуре окружающей среды, нажмите ОК, чтобы продолжить экстракцию cfDNA. 4. Если требуемое значение давления не достигнуто в течение отведенного времени, нажмите ОК, чтобы продолжить работу с первой нагрузкой лизата. 5. Приостановите метод после распределения лизата на связывающий планшет. Снова установите и с усилием надавите на планшет для связывания. 6. Если лизат не проходит через планшет, обратитесь в службу технической поддержки Illumina.

Этап процесса	Код ошибки	Диалог ошибки	Описание	Разрешение пользователя
Экстракция cfDNA	WM0219	Если вакуум включен, вручную остановите насос.	Вакуум может оставаться включенным после отмены метода во время экстракции.	<ol style="list-style-type: none"> 1. На вакуумном контроллере нажмите кнопку Power (Питание), чтобы выключить вакуум. 2. Подождите 10 секунд, а затем снова нажмите кнопку Power (Питание), чтобы включить вакуум.
Экстракция cfDNA	EE0477	При перемещении планшета произошла ошибка. (ошибка iSWAP)	При возникновении ошибки iSWAP (сброс планшета, неудавшийся захват и т. д.) система предложит выполнить перемещение планшета вручную.	<p>Убедитесь, что планшет может быть извлечен (без пролитого материала).</p> <ul style="list-style-type: none"> • Если планшет не может быть восстановлен, прервите запуск. • Если планшет можно восстановить, следуйте отображаемым инструкциям, чтобы завершить перенос планшета вручную.
Экстракция cfDNA	EE0519	Отсканированный штрих-код не соответствует зарегистрированному штрих-коду планшета для связывания.	Загруженный планшет для связывания не соответствует штрих-коду извлеченного планшета.	Убедитесь, что загружаемый планшет соответствует записанному штрихкоду (ожидаемый штрихкод см. в журнале трассировки).

Этап процесса	Код ошибки	Диалог ошибки	Описание	Разрешение пользователя
API	EA0372	Невозможно подключиться к серверу данных.	Сервер VeriSeq Onsite Server v2 не отвечает на запросы данных от диспетчера рабочих процессов.	1. Убедитесь, что ML STAR подключен к сети. 2. Убедитесь, что Сервер VeriSeq Onsite Server v2 включен. 3. Убедитесь, что ML STAR может подключиться к Сервер VeriSeq Onsite Server v2 (по запросу ping).
	EA0774	Ошибка подключения. Не удалось проверить соединение с сервером API.	Сервер VeriSeq Onsite Server v2 перестал отвечать на запросы данных от диспетчера рабочего процесса.	Убедитесь, что: 1. Убедитесь, что ML STAR подключен к сети. 2. Убедитесь, что ML STAR может подключиться к Сервер VeriSeq Onsite Server v2 (по запросу ping). 3. Убедитесь, что Сервер VeriSeq Onsite Server v2 включен.
	EA0780	403: Недопустимый запрос Текущая транзакция недействительна.	Отправленные данные нарушают логику рабочего процесса системы.	Для получения дополнительной информации см. сведения об ошибке. Распространенными причинами являются слишком длинные входные данные или нарушения допустимого списка символов.

Литература

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

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

История изменений

Документ	Дата	Описание изменений
Документ № 1000000078751, версия 09	Апрель 2024 г.	<p>Удалено</p> <ul style="list-style-type: none">Устаревший номер по каталогу 20030577.Максимальная вместимость пробирки для центрифугирования пробирки для взятия крови. <p>Добавлено</p> <ul style="list-style-type: none">Новый номер по каталогу 20101927 для сервера VeriSeq Onsite Server v2.Единица измерения для пробирок для взятия крови объемом 10 мл.Разъяснение относительно совместимых версий SoftMax Pro.Пояснительное примечание о том, что для обеспечения взаимозаменяемости с VeriSeq NIPT MicroLab STAR следует использовать только совместимую пластиковую посуду.Примечание относительно предупреждения о загрязнении смеси образцов в разделе «Интерпретация результатов».Предупреждение: не замораживать образец цельной крови, собранный в Streck Cell-Free DNA BCT.Предостережение о том, чтобы избежать воздействия повышенных температур на образец.Уточнение относительно ограничений анализа и условий воспроизводимости.Разъяснение относительно порогового значения CNV LLR к рис. 2 в разделе «Предел обнаружения». <p>Обновлено</p> <ul style="list-style-type: none">Совместимая ссылка на пробирку с реагентом из пробирки с реагентом Roche в пробирку с реагентом Illumina и добавлен новый каталожный номер.Номер по каталогу Thermo Fisher Multifuge X4 Pro-MD: # 75016034.Предостережение о том, что несогласованные объемы лунок могут привести к непрохождению образцами автоматического контроля качества.См. инструкции по применению инструмента.

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq ^{illumina} NIPT Solution v2

Документ	Дата	Описание изменений
Документ № 1000000078751, версия 08	Август 2022 г.	Обновлен каталожный номер рабочего процесса Удалена инструкция по пипетированию для перемешивания, если планшет библиотеки был заморожен.

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq ^{illumina} NIPT Solution v2

Документ	Дата	Описание изменений
Документ № 1000000078751, версия 07	Май 2022 г.	<p>Разделены ограничения процедуры на VeriSeq NIPT Solution v2 Reporting и включены первые два пункта. Оставшийся текст размещен под новым заголовком «Ограничения анализа».</p> <p>Удалено</p> <ul style="list-style-type: none"> • VeriSeq из всей маркировки реагентов. • При подготовке библиотек нанесите штрих-код на переходный планшет VeriSeq NIPT. <p>Добавлено</p> <ul style="list-style-type: none"> • Слово «сертифицировано» для воды, не содержащей ДНКазу/РНКазу. • Один из следующих считывателей микропланшетов или эквивалентный и SpectraMax M2, M3, M4, M5 и примечание. • В раздел VeriSeq NIPT Microlab STAR, чтобы объяснить, что делать во время ошибки. • Примечание для визуального осмотра лунок. • Инструкции для партий на 24 и 48 образцов во всех разделах протокола. • Этапы использования фиолетового переходного планшета или эквивалента. • Формулировка раздела «Демографические данные и характеристики беременности» для включения результатов первого триместра беременности. • Пункт в раздел спецификаций планшета с глубокими лунками для включения информации об устойчивости к крутящему моменту. <p>Обновлено</p> <ul style="list-style-type: none"> • Формулировка для уникальных названий партий для ясности и включение примера. • Символы и форматирование примечаний, предостережений и предупреждений. • Подпункты результатов тестова. • Гуанидин тиоцианат заменен на гуанидина гидрохлорид. • CVS заменено на BVS (базовая вакуумная система) • Формулировка для использования геномного скрининга и балла LLR. • Спецификации: Технические характеристики флаконов с реагентами, планшеты с глубокими лунками, 384-луночных планшетов, 96-луночные планшетов

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq NIPT Solution v2

Документ	Дата	Описание изменений
Документ № 1000000078751, версия 06	Август 2021 г.	Обновлен адрес уполномоченного представителя в ЕС.
Документ № 1000000078751, версия 05	Декабрь 2020 г.	<p>Обновлены разделы «Принципы проведения процедуры», «Предупреждения и меры предосторожности» и «Маркировка изделия» с дополнительными разъяснениями для выполнения нормативных запросов. Незначительные обновления содержания протокола для соответствия текущему стилю и организации Illumina.</p> <p>Описание хромосомы 21 изменено с «вторая наименьшая аутосома человека» на «самая маленькая аутосома человека» в разделе «Точность» раздела «Аналитическая эффективность».</p> <p>Добавлены предупреждения о неправильном использовании резервуаров и рисках амальгамации образца в разделы «Подготовка плазмы изолята» и «Интерпретация результатов».</p> <p>Добавлены новые номера по каталогу сервера и программного обеспечения для выпуска новой модели сервера и обновления номера по каталогу программного обеспечения.</p> <p>Добавлены предостережения к протоколу и информации о поиске и устранении неисправностей для устранения и предотвращения переполнения образца.</p> <p>Обновлены активные ингредиенты в реагенте DNA Quantification Standard в комплекте принадлежностей Accessory Box для приведения в соответствие с паспортом безопасности.</p> <p>Обновлены правила наименования модуля NIPT VeriSeq Local Run Manager для приведения в соответствие с другой документацией.</p> <p>Добавлена «История изменений».</p>
Документ № 1000000078751, версия 04	Октябрь 2020 г.	Незначительные исправления.

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq NIPT Solution v2

Документ	Дата	Описание изменений
Документ № 1000000078751, версия 03	Сентябрь 2020 г.	Обновлен список материалов для представления спецификаций лабораторной посуды вместе с известными совместимыми опциями.
Документ № 1000000078751, версия 02	Февраль 2020 г.	Обновлено представление информации о клинических рабочих характеристиках для лучшего представления различий между базовым и геномным скринингом. Добавлены новые различия по рабочим характеристикам между базовым и геномным скринингом. Удалена противоречивая информация о необязательности дополнительного отчета из раздела «Принципы проведения процедуры». Обновлены правила наименования программного обеспечения VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 по всему документу для обеспечения стилистической согласованности. Обновлена маркировка адресов Illumina в Австралии и Нидерландах для отражения последних изменений.
Документ № 1000000078751, версия 01	Август 2019 г.	Удален повторяющийся шаг в экстракции cfDNA, вызванный ошибкой публикации программного обеспечения.
Документ № 1000000078751, версия 00	Май 2019 г.	Первый выпуск.

Вкладыш в упаковку программного обеспечения VeriSeq NIPT Solution v2

Патенты и товарные знаки

Настоящий документ и его содержание являются собственностью компании Illumina, Inc. и ее аффилированных лиц (Illumina) и предназначены для использования исключительно в рамках договора заказчиком при эксплуатации изделия (-й), описанного (-ых) в настоящем документе, и ни для какой иной цели. Настоящий документ и его содержание не подлежат использованию или распространению не по назначению и/или передаче, раскрытию или воспроизведению каким-либо способом без предварительного письменного согласия компании Illumina. Настоящим документом компания Illumina не передает никаких лицензий на свои патенты, товарные знаки, авторские права или права, признаваемые общим правом, или аналогичные права третьих лиц.

Инструкции, изложенные в настоящем документе, должны строго и точно соблюдаться квалифицированным и прошедшим соответствующее обучение персоналом для обеспечения правильной и безопасной эксплуатации изделий, описанных в настоящем документе. Перед началом работы с оборудованием пользователь обязан тщательно изучить данный документ.

НЕВЫПОЛНЕНИЕ ТРЕБОВАНИЙ ПО ПОЛНОМУ ПРОЧТЕНИЮ И ТОЧНОМУ ВЫПОЛНЕНИЮ ВСЕХ ИНСТРУКЦИЙ, СОДЕРЖАЩИХСЯ В НАСТОЯЩЕМ ДОКУМЕНТЕ, МОЖЕТ ПРИВЕСТИ К ПОВРЕЖДЕНИЮ ИЗДЕЛИЙ, ТРАВМАМ (ПОЛЬЗОВАТЕЛЯ ИЛИ ИНЫХ ЛИЦ) И ПОВРЕЖДЕНИЮ ИМУЩЕСТВА И ПРИВЕДЕТ К ОТМЕНЕ ЛЮБЫХ ГАРАНТИЙНЫХ ОБЯЗАТЕЛЬСТВ, ПРИМЕНИМЫХ К ИЗДЕЛИЯМ.

КОМПАНИЯ ILLUMINA НЕ НЕСЕТ НИКАКОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТИ, ВОЗНИКАЮЩЕЙ ВСЛЕДСТВИЕ НЕНАДЛЕЖАЩЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИЗДЕЛИЙ, ОПИСАННЫХ В НАСТОЯЩЕМ ДОКУМЕНТЕ (ВКЛЮЧАЯ ИХ ЧАСТИ ИЛИ ЧАСТИ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ).

© 2024 Illumina, Inc. Все права защищены.

Все товарные знаки являются собственностью компании Illumina, Inc. или их соответствующих владельцев. Информацию о конкретных товарных знаках см. на веб-сайте www.illumina.com/company/legal.html.

Контактная информация



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 США
+1-800-809-ILMN (4566)
+1-858-202-4566 (за пределами Северной Америки)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Спонсор в Австралии
Illumina Australia Pty Ltd
Nursing Association Building
Level 3, 535 Elizabeth Street
Melbourne, VIC 3000
Австралия

Маркировка изделия

Полную информацию о символах, которые изображены на упаковке и этикетке изделия, см. в описании условных обозначений по адресу support.illumina.com на вкладке *Documentation* (Документация) для вашего набора.

Краткий обзор безопасности и эффективности (SSP) см. по адресу <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> после запуска Европейской базы данных медицинских изделий (Eudamed). Он связан с базовым идентификатором UDI-DI (0081627002NIPTRP).